Das BPLF1-Gen des Epstein-Barr-Virus

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

vorgelegt von

Susanne Schmaus aus Regensburg

2002

Promotionsgesuch eingereicht am: 06. Februar 2002

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

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Inga Neumann	Vorsitzende
PD Dr. Charalampos Aslanidis	1.Prüfer
Prof. Dr. Hans Wolf	2. Prüfer
Prof. Dr. Armin Kurtz	3. Prüfer

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

_____

Susanne Schmaus

Die Betreuung der Arbeit erfolgte freundlicherweise durch PD Dr. Charalampos Aslanidis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... *I*

Abkürzungsverzeichnis ..... *III*

Zusammenfassung ..... *VII*

1 Einleitung *1*

1.1 Das Epstein-Barr-Virus **1**

1.1.1 Die Entdeckung des Epstein-Barr-Virus 1

1.1.2 Die Assoziation des Epstein-Barr-Virus mit weiteren Erkrankungen des Menschen 2

1.2 Die Biologie der EBV-Infektion **4**

1.2.1 Model der EBV-Infektion im Menschen 4

1.2.2 Struktur und Organisation des Epstein-BarrVirus 5

1.2.3 Der Infektionszyklus des Epstein-Barr-Virus 7

1.3 Zielsetzung **17**

2 MATERIAL UND METHODEN *18*

2.1 Biologisches Material **18**

2.1.1 Bakterienkultur 18

2.1.2 Zelllinien 19

2.1.3 Antikörper und Seren 20

2.2 Oligo-Desoxynukleotide **20**

2.3 Plasmide und Cosmide **23**

2.4 Zellkultur **24**

2.4.1 Suspensionskultur und adhärente Zellen 24

2.4.2 Induktion der lytischen Replikation von EBV 25

2.4.3 Transiente Transfektion von adhärenten Cos7-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation 26

2.5 Allgemeine Methoden **27**

2.5.1 Bakterien und DNA 28

2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion 34

2.6 Spezielle Methoden **43**

2.6.1 Northernblot Analysen 43

2.6.2 Herstellung von cDNA mittels *SMART™PCR cDNA-Synthese Systems* 49

2.6.3 Expression und Analyse von Proteinen 51

2.6.4 Herstellung BPLF1-spezifischer Antikörper 59

3 ERGEBNISSE *60*

3.1 Das BPLF1-Gen **60**

3.1.1 Das BPLF1-Gen – eine Datenbank-Analyse 60

3.1.2 Nachweis der transkriptionellen Aktivität des BPLF1-Gens 62

3.1.3 Synthese der BPLF1-cDNA 69

3.1.4 Überprüfung des Spleißens durch transiente Transfektion 72

3.2 Das BPLF1-Protein **78**

3.2.1 Das BPLF1-Protein - eine Datenbank-Analyse 78

3.2.2 Der indirekte Nachweis des BPLF1-Proteins durch Westernblot-Analysen mit verschiedenen humanen Patientenseren 82
3.2.3 Nachweis des BPLF1-Proteins mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchenserums 92

4 Diskussion 95
4.1 Der Leserahmen BPLF1- ein spätes Gen des Epstein-Barr-Virus 95
4.2 Das BPLF1-Protein – eine Tegumentkomponente 102

LITERATURVERZEICHNIS 110

Anhang 122
A.1. Homologievergleich der BPLF1-Nukleinsäuresequenz aus den Virus-Stämmen M-ABA und B95-8 122
A.2. Nukleinsäuresequenz des BPLF1-cDNA-Abschnittes aus dem Virus-Stamm P3HR-1 136
A.3. Sekundärstrukturen des BPLF1-Proteins 137
A.4. Ausgangsplasmide 139
A.5. Plasmide zur Herstellung von in vitro-transkribierten RNA-Sonden 140
A.6. Expressionsplasmide 141
A.7. Plasmide für die homologe Rekombination zur Herstellung eines rekombinanten EBV 142

Danksagung 144

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb	Abbildung
AIDS	aquired immunodeficiency syndrome
Ak	Antikörper
amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(rest)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat
BL	Burkitt`s Lymphom
Bp	Basenpaare
BS	n-Buttersäure
BSA	Rinderserum-Albumin (*bovine serum albumine*)
BZLF1	Z-Transaktivator
°C	Grad Celsius
CAEBV	chronisch aktive Epstein-Barr-Virus-Infektion
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalie-Virus
cpm	*counts per minute* (Impulse pro Sekunde)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes)*
CTP	Cytidin-5`triphosphat
d	desoxy
Da	Dalton
dATP	2`-Desoxy-Adenosin-5`-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
EA	frühe EBV-Antigene (*early antigen*)
EBER	Epstein-Barr virus- encoded RNA
EBNA	Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (TitriplexIII)
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fötales Käberserum
g	Gramm
(x) g	Erdbeschleunigung
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
h	Stunde(n)
H_2O bid.	zweifach destilliertes Wasser aus einer Millipore-Anlage
HD	Hodgkin Disease
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immunschwäche Virus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IFN	Interferon
IM	Infektiöse Mononukleose
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IR	internal repeats
k	kilo
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	ß-Galactosidase-Gen
LB	Luri Bertani-Medium
LCL	lymphoblastoide Zellinie

LMP	Latentes Membranprotein
M	Molar (Mol pro Liter)
µ	mikro (10^{-6})
m	Meter oder milli
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNS (*messenger*)
MW	Molekulargewicht
N	Normal
n	nano (10^{-9})
NBT	4-Nitro blue tetrazolium chlorid
NK	Natürliche Killer Zellen
NPC	Nasopharynxkarzinom
OD_x	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (*open reading frame*)
ori	Replikationsursprung (*origin of replication*)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (*phosphate-buffered saline*)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase-chain reaction*)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonz.
pmol	picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium Dodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*)
Sek	Sekunde
ss	Einzelstrang
Tab	Tabelle
TAE	Tris / Acetat / EDTA-Puffer
Taq	DNS-abhängige DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TGF-ß	Tumor Growth Factor ß

TPA	12-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TR	terminal repeats
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTP	Thymidin-5`-triphosphat
U	Einheit enzymatischer Aktivität (*Units*)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
VCA	Viruskapsid-Antigen
Vol	Volumen
VZV	Varizella-Zoster-Virus
W	Watt
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Die Vertreter innerhalb der Familie der Herpes-Viren weisen neben ihrer einheitlichen Partikelmorphologie und vergleichbaren biologischen Eigenschaften auch ähnliche Mechanismen in ihrer Genregulation auf. Durch Homologie-Vergleiche konnten oftmals ähnliche Funktionen oder Regulationsmechanismen einzelner Gene bei den verschiedenen Vertretern identifiziert werden. Den Anstoß zu der vorliegenden Arbeit, der Charakterisierung des BPLF1-Gens von EBV, gab ein Hinweis auf eine Homologie von BPLF1 zu VP16 von Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV-1). Dabei handelt es sich um ein spätes Gen des Virus, dem während der lytischen Vermehrung eine Funktion als Transaktivator für die sehr frühen Gene des Virus zukommt und das eine zentrale Rolle für das Virusassembly spielt (Kieff, 1996). Übereinstimmungen von etwa 30 % auf Proteinebene zwischen BPLF1 und VP16 deuteten darauf hin, dass das EB-virale Gen ähnlich wie VP16 an der frühen Kontrolle von Latenz oder lytischer Vermehrung beteiligt sein könnte. Um jedoch Aussagen über die Funktion des Gens machen zu können, musste zunächst seine Aktivität und die Existenz eines Genprodukts *in vivo* nachgewiesen werden.

Grundlage für alle experimentellen Untersuchungen war eine ausführliche Computeranalyse, die sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Proteinebene durchgeführt wurde. So konnten bereits vorab wichtige Eigenschaften des BPLF1-Gens identifiziert werden. Die Genstruktur von BPLF1, d.h. Größe, Spleißstellen, Polyadenylierung etc., war dabei ebenso von Interesse wie die Charakterisierung der Sekundärstrukturen und Modifikationen des BPLF1-Proteins.

Das Ziel der praktischen Arbeit bestand darin, sowohl die Transkription als auch die Expression eines Genprodukts *in vivo* nachzuweisen. Mit Hilfe von RT-PCR und Northernblot-Analysen konnten zunächst zwei BPLF1-spezifische Transkripte nachgewiesen werden. Trotz fehlender *consensus*-Spleißstellen zeigte sich neben dem erwarteten Vollängetranskript von 9,5 kbp auch eine gespleißte, polyadenylierte BPLF1-mRNA mit einer Größe von ca. 3 kbp. Der Nachweis der Genaktivität von BPLF1 zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Virusvermehrung wurde mittels einer Reversen-Tranksriptions-PCR und anschließender Southernblot-Hybridisierung, sowie durch Northernblot-Analysen mit BPLF1-spezifischen Sonden durchgeführt. Als Ausgangspunkt dienten unterschiedliche Burkitt`s-Lymphom- und lymphoblastoide Zellinien mit latenter bzw. (chemisch induzierter) lytischer Virusvermehrung. Der Nachweis der RNA lieferte Informationen über das Transkriptionsmuster des Gens in diesen Zellen. So konnte ausschließlich nach chemischer Induktion in der Burkitt`s-Lymphom-Zellinie P3HR1/16 Genaktivität gezeigt werden. Dadurch war eine Eingrenzung der Transkription auf die späte lytische Phase der Virusvermehrung möglich.

Das Genprodukt des BPLF1-Leserahmens konnte durch einen indirekten Nachweis gezeigt werden. Dazu wurde in Bakterien kloniertes, exprimiertes und gereinigtes BPLF1-Protein als Antigen für verschiedene Westernblot-Analysen mit Humanseren eingesetzt. Der Nachweis von Antikörpern gegen das Protein lieferte indirekt den Beweis für ein BPLF1-spezifisches Genprodukt *in vivo*. Weder in seronegativen noch seropositiven Gesunden konnten Antikörper gegen BPLF1 detektiert werden. Hingegen wurden in Seren von Patienten mit starker lytischer Virusvermehrung, z.B. aufgrund einer Reaktivierung oder bei NPC-Patienten (Nasopharynxkarzinom), Antikörper gegen das BPLF1-Protein nachgewiesen. Ein direkter Nachweis des BPLF1-Proteins mit Hilfe von BPLF1-spezifischen Antikörpern wurde angestrebt. Dazu wurde ein bakteriell exprimiertes und

aufgereinigtes BPLF1-Proteinfragment für die Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Mit Hilfe des polyklonalen Serums konnte aufgereinigtes BPLF1-Protein eindeutig detektiert werden, ein Nachweis des BPLF1-Proteins in verschiedenen Zellinien bzw. in Viruspartikeln war jedoch nicht erfolgreich.

Insgesamt konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei BPLF1 um ein aktives Gen des Epstein-Bar-Virus handelt. Die enorme Größe des Gens, seine Expression während der späten lytischen Vermehrungsphase des Virus und der Vergleich mit anderen herpesviralen Proteinen, bestätigte Vermutungen, dass es sich bei BPLF1 möglicherweise um ein Strukturprotein oder eine Tegumentkomponente des Virus handelt. Des weiteren zeigte das BPLF1-Gen eine völlig neue Spleißvariante, bei der die Ausgangs-RNA trotz fehlender bekannter *consensus*-Spleißstellen in einer reifen, prozessierten mRNA resultierte. Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei BPLF1 keineswegs um ein Pseudogen des Virus handelt, sondern dass diesem Leserahmen offensichtlich vielmehr eine Funktion im viralen Lebenszyklus von EBV zukommt.

1 Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr-Virus

1.1.1 Die Entdeckung des Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) wurde im Jahre 1964 durch M.A. Epstein, B.G. Achong und Y.M. Barr entdeckt und erstmals beschrieben (Epstein und Barr, 1964 b; Epstein *et al*., 1965). Der Weg, der zur Entdeckung des Virus führte, geht über den englischen Chirurgen Denis Burkitt, der sich im Mulago Hospital in Kampala, der Hauptstadt Ugandas, mit der Verbreitung bestimmter Krebserkrankungen in Afrika beschäftigte. Insbesondere kam er zu dem Schluss, dass mehrere Tumorarten, die gehäuft bei Kindern auftraten, als einheitliches malignes Lymphom eingeordnet werden sollten, also als Krebserkrankungen eines Typs der weißen Blutkörperchen, nämlich der B-Zellen (später als Burkitt`s Lymphom (BL) bezeichnet) (Burkitt, 1958). Burkitt erkannte, dass mehrere Faktoren im Zusammenhang mit dem Auftreten der Krankheit standen: Temperatur (geringe Höhe), häufige Regenfälle und reichliche Wasservorkommen (Burkitt, 1962). Es zeigte sich eine Übereinstimmung mit dem afrikanischen Malariagürtel. Burkitt behauptete: "Die Tatsache, dass die Verteilung der Krebserkrankung von klimatischen Faktoren abhängt, legt den starken Verdacht nahe, dass ein Überträger, vielleicht eine Mücke, für ihre Verbreitung verantwortlich ist. Das lässt vermuten, dass der Erreger ein Virus sein könnte".

Als Burkitt diese Vermutung äußerte, kannte man bereits zahlreiche Viren, die bei Tieren Tumoren hervorriefen, aber noch kein einziges menschliches Tumorvirus. Im Jahr 1964 berichteten Epstein und Barr (Epstein und Barr, 1964 a), sowie unabhängig von ihnen auch R.J.B. Pulvertaft (Pulvertaft, 1964), sie hätten die krebsartig veränderten B-Zellen eines Patienten mit Burkitt`s-Lymphom unbegrenzt lange in Zellkulturen weitergezüchtet. Nach zytologischer Charakterisierung wurden die Zellen von beiden Arbeitsgruppen als schwach differenzierte, primitive Lymphoblasten beschrieben. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gelang es Anthony Epstein und seiner Assistentin Yvonne Barr außerdem in einer kleinen Burkitt`s-Lymphom-Zellpopulation virale Partikel nachzuweisen, die aufgrund ihrer morphologischen Beschaffenheit den Herpesviren zugeordnet werden konnten. (Epstein und Barr, 1964 b). Die Viruspartikel waren jedoch mit einem Durchmesser von etwa 110 nm bis 115 nm kleiner als das bereits bekannte Herpes-Simplex-Virus (HSV). Somit war zu diesem Zeitpunkt weder die Identität des Virus noch eine mögliche Rolle in der Pathogenese des Burkitt`s Lymphom geklärt. In den Jahren nach der ersten Beschreibung der viralen Partikel hatten verschiedene Arbeitsgruppen das Virus, das später nach seinen Entdeckern als Epstein-Barr-Virus (EBV) bezeichnet wurde, untersucht. Die Wissenschaftler Werner und Gertrude Henle, die beide am Kinderkrankenhaus von Philadelphia arbeiteten, entwickelten einen Test, mit dem sich bei Patienten mit Burkitt`s-Lymphom Antikörper nachweisen ließen, die nicht mit gesunden B-Zellen, aber mit solchen, die aus dem Burkitt`s-Lymphom stammten, reagierten. Dies war möglicherweise ein Nachweisverfahren für den Erreger in den Zellen des Burkitt`s-Lymphoms. Dann erlebten die Henles eine Überraschung. Nachdem sie zuerst feststellten, dass die meisten Afrikaner Antikörper hatten, die Burkitt`s-Lymphom-Zellen erkannten, fanden sie diese auch bei ihren Labormitarbeitern und schließlich bei einem hohen Anteil der Bevölkerung aus aller Welt, von denen man nach dem Zufallsprinzip Proben entnommen hatte (Henle und Henle, 1966; Levy und Henle, 1966). Die Untersuchungen ergaben, dass das Epstein-Barr-Virus ein neues, vermutlich menschliches Herpesvirus sein musste, das offensichtlich

überall auf der Welt verbreitet war. Wie so oft in der Geschichte kam auch den Henles der Zufall zu Hilfe. Eine ihrer technischen Assistentinnen erkrankte 1967 an Pfeiffer`schem Drüsenfieber (Infektiöser Mononukleose). Als sie wieder zur Arbeit kam und man ihr routinemäßig eine Blutprobe entnahm, um sie auf Viren zu untersuchen, enthielt das Blut in hoher Konzentration Antikörper gegen die B-Zellen des Burkitt`s-Lymphoms, obwohl der gleiche Test vor der Erkrankung negativ war. Die B-Zellen der Assistentin wurden in Gewebekulturschalen gezüchtet. Sie vermehrten sich unbegrenzt weiter (sie waren immortalisiert), enthielten ein Antigen, das mit den Antikörpern aus Patienten mit Burkitt`s-Lymphom reagierte und setzten schließlich Viruspartikel frei, die von dem EBV aus dem Burkitt`s-Lymphom nicht zu unterscheiden waren. Weitere Untersuchungen von Blutproben im Rahmen einer prospektiven Studie zu Infektiöser Mononukleose erhärteten den Verdacht der Henles, dass EBV der Erreger des Pfeiffer`schen Drüsenfiebers war. (Henle *et al*., 1968). Eine weitere Beobachtung, nämlich dass Antikörper gegen das Epstein-Barr-Virus sehr lange bzw. lebenslang nachweisbar blieben, deutete darauf hin, dass EBV nach der Erstinfektion eine Persistenz in den Zellen des hämatopoetischen Systems etablierte, wie sie für andere Herpesviren bereits bekannt war.

1.1.2 Die Assoziation des Epstein-Barr-Virus mit weiteren Erkrankungen des Menschen

Das Epstein-Barr-Virus zählt zu den am häufigsten auftretenden Viren des Menschen. Aufgrund der serologischen Untersuchungen, die zeigten, dass EBV weltweit verbreitet ist und dass Antikörper gegen EBV auch in mononukleären Zellen des peripheren Bluts gesunder Menschen nachgewiesen werden können (Diehl *et al*., 1968), wird heute davon ausgegangen, dass weltweit bis zu 95 % der erwachsenen Bevölkerung mit EBV infiziert sind. Neben Erkrankungen, die gekennzeichnet sind durch eine lytische Vermehrung des Virus (z.B. Infektiöse Mononukleose, siehe Tabelle 1.1) treten auch immer mehr EBV-assoziierte Tumorerkrankungen in den Vordergrund. Diese Erkrankungen basieren auf der Eigenschaft des Virus, latent infizierte Zellen zur Proliferation anzuregen. In Folge der Expression latenzassoziierter Genprodukte von EBV wird die Zellteilung stimuliert und gleichzeitig die apoptotische Eliminierung der infizierten Zellen unterdrückt. Maligne Tumoren oder anderweitige proliferative Erkrankungen treten jedoch nur auf, wenn die Infektion mit unzureichender Immunkompetenz einhergeht. Einige EB-virale Mechanismen tragen dabei direkt zur Störung der immunologischen Kontrolle bei. In den letzten 10 bis 15 Jahren wurde EBV in einer Vielzahl von Tumorzellen verschiedenster Neoplasien detektiert. Neben dem seit langem bekannten Burkitt`s-Lymphom (BL) und dem Nasopharynxkarzinom (NPC) reihen sich nun auch die Hodgkin-Erkrankung (HD), lymphoproliferative Erkrankungen nach Organtransplantation (*post transplant lymphoproliferative disease*, PTLD); AIDS-assoziierte Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), verschiedene T-Zell-Lymphome und möglicherweise Brust- und Leberzell-Karzinome, in die Liste der EBV assoziierten Tumoren. Die Rolle, die EBV in der Pathogenese dieser verschiedenen Tumorarten spielt, ist in den meisten Fällen nicht geklärt. Lediglich im Falle des Burkitt`s-Lymphoms und dem Nasopharynxkarzinom kann bislang von einer ursächlichen Beteiligung des Virus bei der Ausbildung des Tumors ausgegangen werden. Das *International Agency for Research on Cancer* (IARC) klassifizierte EBV als ein Gruppe I Karzinogen. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die durch EBV induzierten Krankheiten bzw. über die mit EBV-assoziierten Tumoren.

Tabelle 1.1 Epstein-Barr-Virus-assoziierte Erkrankungen

Erkrankung	Ursachen und Symptome
Erkrankungen charakterisiert durch eine lytische Vermehrung des Virus	
Infektiöse Mononukleose (IM, Pfeiffer`sches Drüsenfieber, *kissing disease*)	Selbstlimitierende lymphoproliferative Erkrankung, die bei 50 % der Erstinfektionen mit EBV im Erwachsenenalter auftritt. Die charakteristischen Symptome (Schwellung der lymphatischen Organe v.a. Tonsillen und Lymphknoten, Rachenentzündung, Fieber, Leukozytose, evtl. Milz- und Lebervergrößerung) sind auf eine massive T-Zell-Antwort gegen die virusinfizierten Zellen zurückzuführen.
Chronisch aktive EBV-Infektion (CAEBV)	Das Krankheitsbild ähnelt häufig der IM, es kann aber auch zu schwerwiegenden Verläufen mit Entstehung EBV-assoziierter Tumoren kommen. Wichtigstes Kriterium für eine CAEBV: serologischer und molekularbiologischer Nachweis der lytischen Vermehrung des Virus über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten. Ursachen: vermutliche eine verminderte Aktivität von zytotoxischen T-Zellen und Natürlichen Killerzellen, sowie eine Störung der Immunglobulinsynthese.
X-gebundenes lymphoproliferatives Syndrom (XLPS, *Duncan Syndrom*)	Seltene Erbkrankheit bei Männern. Durch die Mutation eines x-chromosomal codierten T-Zell-spezifischen Proteins kommt es zu einer unkontrollierten Proliferation virusinfizierter B-Zellen. Das Krankheitsbild resultiert in einer fatalen IM, bei der die starke Proliferation der lymphoiden Zellen nicht kontrolliert werden kann. Dies führt zur Zerstörung des peripheren Immunsystems und zur Infiltration und zum Versagen verschiedener Organe wie Leber, Niere, Thymus und des Knochenmarks.
EBV-assoziierte Tumoren und Erkrankungen bei immunsupprimierten Personen	
Burkitt`s Lymphom	Schnell wachsender, monoklonaler B-Zell-Tumor, von dem eine endemische (97 % EBV-assoziiert, in Äquatorial Afrika und Papua Neu-Guinea), eine sporadische (15-85 % EBV-assoziiert) sowie eine AIDS-assoziierte Variante existiert (30–40 % EBV-assoziiert). Bei allen drei Formen ist eine Chromosomentranslokation nachweisbar, bei der das auf Chromosom 8 befindliche Protoonkogen *c-myc* in die Nachbarschaft genregulatorischer Abschnitte der Immunglobulin-Gene auf den Chromosomen 1, 2 oder 22 gebracht wird.
Halsrachen-Karzinom (Nasopharynx-Karzinom, NPC)	Stark metastasierender Tumor von meist undifferenzierten Epithelzellen des Halsrachenraums. In allen Biopsien undifferenzierter NPCs konnte EBV-DNA nachgewiesen werden. Weltweit verbreitete Erkrankung mit besonders hoher Inzidenz in Bevölkerungsruppen Südchinas, Nord- und Ostafrikas und bei Eskimos. Neben einer genetischen Prädisoposition scheinen Umwelteinflüsse und Ernährungsgewohnheiten eine wichtige Rolle zu spielen.
Lymphoproliferative Erkrankungen nach Organtransplantationen	Diese Erkrankungen werden bei Organ- und Knochenmarksempfängern, sowie bei HIV-infizierten Patienten beobachtet und sind auf eine mangelnde oder fehlende immunologische Kontrolle der EBV-induzierten Zellproliferation zurückzuführen
Hodgkin Lymphom (HD)	Sporadisch auftretendes Lymphom, das gekennzeichnet ist durch das Auftreten von Reed-Sternberg-Zellen (RS-Zellen). In den vier histologisch unterscheidbaren HD-Subtypen kann EBV mit unterschiedlicher Häufigkeit und nur in den RS-Zellen nachgewiesen werden.
Orale Haarleukoplakie (OHL)	Infolge einer lytischen EBV-Vermehrung kommt es zu gutartigen Läsionen des lateralen Zungengrundes. Diese Erkrankung tritt vor allem bei AIDS- und immunsupprimierten Patienten auf.

1.2 Die Biologie der EBV-Infektion

1.2.1 Model der EBV-Infektion im Menschen

EBV ist, wie andere Herpesviren auch, ein wenig umweltresistentes Virus und ist deshalb so gut wie nie frei nachzuweisen. Die Übertragung von EBV erfolgt in erster Linie über den Speichel, insbesondere beim Küssen oder engem körperlichen Kontakt. Eine Übertragung durch Blutprodukte oder Knochenmarkstransplantationen ist nicht auszuschließen (Qu und Rowe, 1992; Masucci und Ernberg, 1994) Durch zwei völlig verschiedene Vermehrungsstrategien gelingt es dem Virus nach dem Eindringen in den Wirtsorganismus seine Erbinformation zu vermehren und Nachkommenviren freizusetzen. Die lytische Infektion dient der Produktion und Freisetzung infektiöser Viruspartikel, durch die latente Infektion wird in der Wirtszelle ein viraler Ruhezustand etabliert, der sich der immunologischen Kontrolle des Wirtsorganismus weitgehendst entzieht. Auf diese Art und Weise steht ein permanentes Virusreservoir zur Verfügung, das nach geeigneter Reaktivierung in eine produktive Phase mit erneuter Virusfreisetzung zurückkehren kann

Initial infiziert das EBV Epithelzellen und B-Lymphozyten im Oropharyngealtrakt über den Komplementrezeptor CD21. Dabei ist die Identität der primären Zielzellen von EBV bislang nicht eindeutig geklärt. Früher wurden differenzierte Epithelzellen der Parotis als Hauptort der lytischen Virusvermehrung *in vivo* und damit Epithelzellen des Halsrachenraums als primäres Ziel während der Infektion angesehen (Sixbey *et al*., 1984; Allday *et al*., 1988). Neuere Studien postulieren jedoch, dass die Primärinfektion auch direkt über die Infektion epithelständiger B-Zellen erfolgen kann, welche insbesondere in den Tonsillen in großer Zahl vorhanden sind (Rickinson und Kieff, 1996; Anagnostopoulos *et al*., 1995). Infolge der Primärinfektion kommt es neben der Produktion und Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln aufgrund lytischer Vermehrung des Virus auch zur Ausbildung einer persistierenden Infektion. Als Ort der Persistenz von EBV im Körper werden heute ruhende B-Gedächtnis-Zellen angesehen (Babcock *et al*., 1998; Yao *et al*., 1989; Gratama *et al*., 1988). Ca. 1-50 pro 10^6 B-Zellen im peripheren Blut sind mit EBV infiziert und die Zahl dieser latent infizierten Zellen in einem Patienten bleibt über Jahre hinweg stabil (Babcock *et al.*, 1998; Birx *et al*., 1986). Um der Eliminierung durch das Immunsystem zu entkommen, werden während dieser persistierenden Vermehrungsphase verschiedene latente Genprodukte exprimiert, die die Erkennung virusinfizierter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten verhindern (siehe unten). Durch Reaktivierung können während dieser asymptomatischen Persistenz des Virus in den ruhenden B-Gedächtniszellen auch immer wieder B-Zellen erfolgreich in den lytischen Zyklus übergehen. Die Produktion von Nachkommenviren bleibt dann jedoch 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 Gebärmutterschleimhaut, produziert, ohne vom Immunsystem erkannt zu werden. Im peripheren Blut manifestiert sich die lytische Replikation nur in Abwesenheit einer EBV-spezifischen Immunantwort. Genprodukte der lytischen Vermehrung können daher in der Regel nur bei Patienten mit IM, bei Immunsupprimierten nach Organtransplantation, sowie im Falle einer CAEBV im peripheren Blut nachgewiesen werden (Prang *et al.,* 1997). Die lytische Replikation des Virus führt letztendlich zur Infektion differenzierter Epithelzellen der Speicheldrüsen und zur Freisetzung infektiöser Viruspartikel in die Speichelflüssigkeit des Wirts.

Die Untersuchung der Infektionsabläufe von EBV wird durch den Umstand erschwert, dass viele Infektionsmechanismen *in vivo* nicht zugänglich und *in vitro* nicht nachvollziehbar sind. Einerseits steht kein permissives Zellkultursystem zur Verfügung, das den natürlichen Ablauf des lytischen Zyklus vollständig reproduzieren könnte, andererseits beschränken sich latente Infektionsstadien *in vitro* auf wenige Phänotypen. Diese Phänotypen zeichnen sich aus durch diskrete virale Expressionsmuster, sind jedoch nicht in der Lage, ein vollständiges Abbild der Interaktionen zwischen Virus und verschiedenartigen Wirtszellen wie sie *in vivo* auftreten, wiederzugeben.

1.2.2 Struktur und Organisation des Epstein-BarrVirus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV, humanes Herpesvirus 4) bildet mit Herpes-Simplex-Virus 1 und 2, dem Varicella-Zoster-Virus (humanes Herpesvirus 3), dem Zytomegalievirus (humanes Herpesvirus 5) und den Herpesviren 6, 7 und 8 die Gruppe der humanen Herpesviren. Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften (Zelltropismus, Neigung zu lytischer Infektion, Persistenz oder Tumorigenese) werden die Herpesviren in drei Subfamilien Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae eingeordnet. Mit einigen anderen Primatenherpesviren gehört das EBV zur Subfamilie der *Gammaherpesvirinae*, hier wieder in die Gattung *Lymphocryptovirus*.

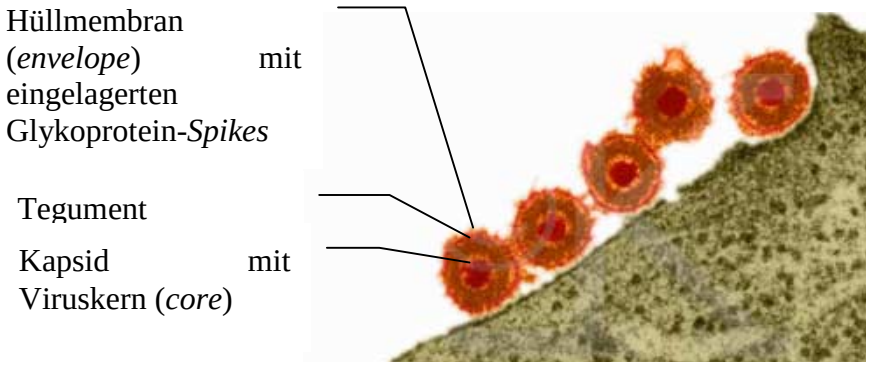


Abbildung 1.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Herpesviren bei der Adsorption an die Wirtszelle.

Das Epstein-Barr-Virus zeigt den klassischen Aufbau der Herpesviren (siehe Abbildung 1.1). Die Virionen haben einen Durchmesser von 120 bis 180 nm und bestehen aus insgesamt mehr als 30 Strukturproteinen. Sie sind von einer Hüllmembran (*envelope*) umgeben, die sich wahrscheinlich von der inneren Kernmembran der Wirtszelle ableitet und in die verschiedene glykosylierte und nicht glykosylierte Proteine eingelagert sind (Roizman, 1996). Letztere, auch als *spikes* bezeichnete Strukturen, erfüllen wichtige Funktionen bei der Adsorption der Partikel an die Zellrezeptoren, bei der Penetration und der Aufnahme in die Zelle. Im Falle von EBV dominiert das Glykoprotein gp 350/220 in der äußeren Hüllmembran. Unter der Membran folgt eine Tegumentschicht, die das Viruskapsid von der Hüllmembran trennt. Hierbei handelt es sich um eine unstrukturierte Proteinmatrix, die bis zu 20 Virusproteine enthält und unterschiedlich dick sein kann (Roizman, 1996). Die in ihr eingelagerten Proteine gelangen bei der Infektion mit in die

Zelle und übernehmen zum Teil wichtige regulatorische Funktionen während der Frühphase des Replikationszyklus. Das Kapsid aller Herpesviren weist eine ikosaedrische Struktur auf. Es besteht aus 162 Kapsomeren und besitzt einen Durchmesser von ca. 100 nm (Wildy und Watson, 1963). Im Inneren des Kapsids findet man das Virus-*Core* (Viruskern), eine fibrilläre Proteinmatrix mit der das doppelsträngige DNA-Genom assoziiert ist (Furlong *et al*., 1972).

Das Genom des Epstein-Barr-Virus liegt in den Virionen als lineare, doppelsträngige DNA mit einer Länge von 172 281 Basenpaare vor (Baer *et al*., 1984) (siehe Abbildung 1.2). Durch homologe Rekombination terminaler Sequenzwiederholungen (*terminal repeats*, TR) wird die lineare DNA bei der Infektion in ein zirkuläres Molekül überführt, das dann als Episom im Kernplasma vorliegt (Lindahl *et al*., 1976). Für EBV konnte in einigen Fällen auch die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom beobachtet werden (Delecluse *et al*., 1993). Neben den *terminal repeats*, denen auch eine funktionelle Bedeutung bei der Verpackung der DNA in die Viruspartikel zukommt (Hammerschmitdt und Sugden, 1989), wird das Genom von EBV durch vier interne Sequenzwiederholungen (*internal repeats*, IR) in fünf nicht repetitive Bereiche (*unique* U1-U5) unterteilt. Innerhalb des Genoms konnten drei Replikationsstartpunkte identifiziert werden. Im Verlauf der latenten Infektion wird ein als *oriP* bezeichneter Startpunkt verwendet (Yates *et al*., 1984), während die Replikation im lytischen Zyklus alternativ an einer der beiden homologen *oriLyt*-Sequenzen (Hammerschmitdt und Sugden, 1988) erfolgt.
Beide Stränge des EBV-Genoms codieren für insgesamt über 100 Genprodukte, die teilweise unter Verwendung unterschiedlicher Leseraster von miteinander überlappenden Leserahmen exprimiert werden. Dabei werden die viralen Leserahmen nach Lage und Orientierung im Genom bezeichnet. Die Spaltung des Genoms von EBV mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* resultierte in 29 Fragmenten, die entsprechend ihrer Größe mit einem Buchstaben bezeichnet wurden (*BamHI* A [für das längste Fragment], B, ...Z, a,b, bis *BamHI* h). Zusätzlich wird die Orientierung des jeweiligen Leserahmens nach rechts (*right frame*, RF) oder links (*left frame*, LF) für die Nomenklatur herangezogen (z.B. BPLF1: *BamHI*-Fragment P, erster Leserahmen in linker Orientierung). Als Standard für diese Nomenklatur wurde der Laborstamm B95-8 (Baer *et al*., 1984) verwendet, der eine 11,8 kbp lange Deletion besitzt. *BamHI*-Fragmente in diesem Bereich werden mit einem Apostroph gekennzeichnet (z.B. das sehr frühe Genprodukt BI`LF4). Eine schematische Übersicht des EBV-Genoms mit den wichtigsten Leserahmen und deren Genprodukten ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

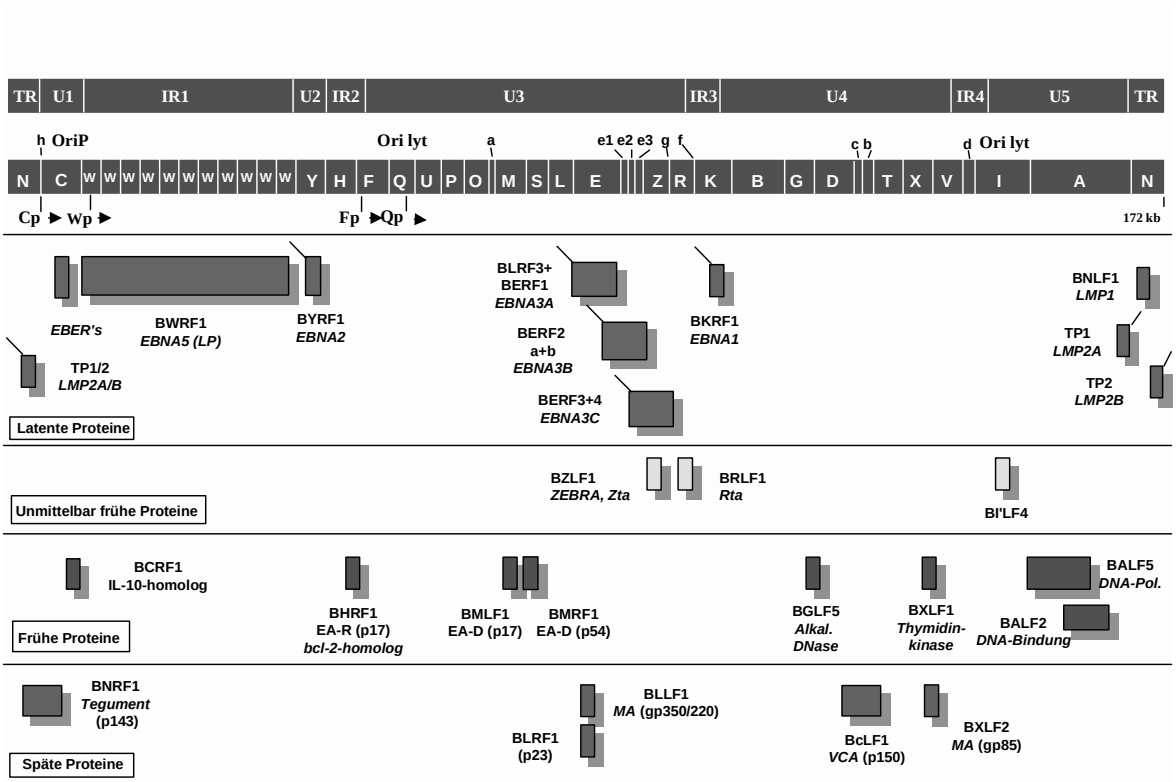


Abbildung 1.2 Das EBV-Genom mit den wichtigsten Leserahmen und deren Genprodukten. TR = *Terminal Repeat*; IR = *Internal Repeat*; U = *Unique Region*; Ori = *Origin*; Cp, Wp, Fp, Qp = verschiedene EBNA-Promotoren; LMP = Latentes Membranprotein; EBNA = EBV-Nukleäres Antigen; EA = *Early Antigen*; MA = Membranantigen; VCA = *Virus Capsid Antigen*; gp = Glykoprotein.

1.2.3 Der Infektionszyklus des Epstein-Barr-Virus

Adsorption an die Zellmembran, Penetration und *Uncoating*

Als zellulärer Rezeptor für das Epstein-Barr-Virus wurde der Komplementrezeptor CD21 (CR2) identifiziert, dessen eigentliche Funktion in der Bindung des Komplementfaktors C3d liegt (Frade *et al*., 1985). Die Adsorption von EBV an den zellulären Rezeptor erfolgt über einen Komplex aus den Glykoproteinen gp220 und gp350 (Nemerow *et al*, 1987). Dabei ist die Affinität des gp220/350-Glykoproteines zum CD21-Rezeptor im Vergleich zum natürlichen Liganden C3d um ein Vielfaches höher (Cooper *et al*., 1990). CD21 wird primär auf B-Lymphozyten, follikulären dendritischen Zellen, aber auch auf T-Zellen exprimiert (Fingeroth *et al*., 1988; Watry *et al*., 1991). Ob CD21 auch als EBV-Rezeptor epithelialer Zellen fungiert, ist noch nicht eindeutig geklärt. Im Rahmen verschiedenster Studien, die sich mit der Infizierbarkeit von Epithelzellen und deren Bedeutung als Virusreservoir beschäftigen, sollte jedoch geklärt werden, inwieweit der CD21-Rezeptor für die Infektion von Epithelzellen verantwortlich ist (Anagnostopoulus *et al*., 1995; Tao *et al*., 1995; Karajannis *et al*., 1997; Fingeroth *et al*., 1999). Nach der Adsorption an die Wirtszelle erfolgt die Aufnahme der Virionen in zytoplasmatische Vesikel (Carel *et al*., 190). Durch die Fusion von Vesikelmembran und Virushülle werden anschließend Nukleokapsid und Tegumentkomponenten ins Zytoplasma freigesetzt (Tanner *et al*., 1987).

Bei EBV wird diese Reaktion durch das virale Glykoprotein gp85 vermittelt (Miller und Fletcher, 1988). Nach Auflösung des Nukleokapsids und dem Transport der Virus-DNA in den Zellkern kommt es zu einer Zirkularisierung des EBV-Genoms durch Rekombination der TR-Sequenzen. In episomaler Form verbleibt das Genom in den meisten Fällen extrachromosomal in der Zelle. Welche Vermehrungsstrategie das Virus daraufhin verfolgt, ist im Wesentlichen davon abhängig, welche EB-viralen Genprodukte exprimiert werden. Entweder Produktion und Freisetzung infektiöser Viruspartikel aufgrund einer lytische Genkaskade oder die Etablierung einer persistierenden Infektion durch Expression latenter Genprodukte.

Die Latenz des Epstein-Barr-Virus

Die latente Vermehrung des Epstein-Barr-Virus ist dadurch gekennzeichnet, dass es in dieser Phase zu keiner Produktion infektiöser Viruspartikel kommt. Die Virus-DNA liegt in den Zellen als extrachromosomales Episom im Kernplasma vor, wird parallel mit dem Zellgenom repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Im Gegensatz zu anderen Herpesviren, wie z.B. Herpes-Simplex-Virus, synthetisiert das Epstein-Barr-Virus auch während der latenten Infektion bis zu neun verschiedene Proteine. Die B-Lymphoyzyten, in denen das Virus persistiert, werden durch die Aktivität dieser Proteine immortalisiert. Sie erhalten also die Fähigkeit, sich unendlich zu teilen und *in vitro* zu kontinuierlichen Zellinien auszuwachsen (Pope *et al*., 1967; Lewin *et al*., 1990). Bei den Proteinen der latenten Vermehrungsphase handelt es sich um sechs Kernproteine (EBNA-1 bis 6), zwei Membranproteine (LMP-1 und LMP-2), sowie Transkripte des Leserahmens BARF-0 (Sadler und Raab-Traub, 1995; Fries *et al*., 1997; Kienzle *et al*., 1999), die für ein Protein unbekannter Funktion kodieren [Übersicht in (Rickinson and Kieff, 1996)]. Zusätzlich können zwei untranslatierte RNA-Transkripte detektiert werden (EBER-1 und EBER-2), deren Funktion noch nicht eindeutig geklärt ist. In Abhängigkeit der exprimierten latenten Genprodukte und des Phänotyps der infizierten Zellen werden verschiedene Latenzstufen unterschieden (siehe. Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2 Unterschiedliche Formen der Latenz des Epstein-Barr-Virus.

Latenz-Typ	EBNA-1	EBNA-2	EBNA-3	LMP-1	LMP-2A	EBER	Erkrankung
Lat-0	+/-	-	-	-	+	+	Gesunde serpositive Personen
Lat-I	+	-	-	-	-	+	Burkitt`s Lymphom
Lat-II	+	-	-	+/-	+	+	Nasopharynx-Karzinom, Hodgkin-Erkrankung, peripheres T-Zell-Lymphom
Lat-III	+	+	+	+	+	+	Lymphoproliferative Erkrankungen, XLPS, IM

So wurde der vom Immunsystem unerkannte, virale Ruhezustand in nicht aktivierten B-Gedächtnis-Zellen als Latenz-Typ 0 (Lat-0) eingestuft. In diesen Zellen ist die virale Genexpression vermutlich auf das LMP2A-Protein und die EBER-Transkripte beschränkt. Inwieweit auch das virale EBNA-1-Protein exprimiert wird, ist noch nicht eindeutig geklärt (Qu und Rowe, 1992; Tierney *et a*l., 1994; Thorley-Lawson *et al*., 1996) Durch LMP2-A wird eine Aktivierung der infizierten Zellen durch deren B-Zellrezeptor verhindert, was zur Aufhebung der Latenz und zur Induktion der lytischen viralen Reaktivierung führen würde (Burkhardt *et al*., 1992; Longnecker und Miller, 1996) (siehe auch Abbildung 1.3 B). Während der Erstinfektion, bei B-Lymphozyten in Zellkultur, sowie bei immunsupprimierten Patienten kommt es zur Ausbildung des Latenz-Typs III (Lat III). Hierbei werden alle latenten Genprodukte exprimiert, was eine Aufrechterhaltung der Langzeitpersistenz sichert. Vermutlich gehen auch ruhende B-Zellen der Latenz-Stufe 0 und I nach Aktivierung durch Antigen und T-Helferzellen in diese Latenzstufe über (Thorley-Lawson *et al*., 1996; Rowe, 1999). Burkitt`s-Lymphome sowie Hodgkin-Lymphome und Nasopharynxkarzinome werden den Latenz-Typen I und II zugeordnet, die ebenfalls durch spezifische Expressionsmuster latenter Gene charakterisiert sind (siehe Tabelle 1.2).

Die Expression der latenten Genprodukte hat einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die Regulation des viralen Vermehrungsverhaltens von EBV, als auch auf die Steuerung der infizierten Wirtszelle in Richtung Immortalisierung oder Apoptose bzw. auf die Modulation des Immunsystems. Abbildung 1.3 zeigt einen schematischen Überblick über die wichtigsten latenten Genprodukte und ihre Funktion in diesem komplizierten Regulationsnetzwerk.

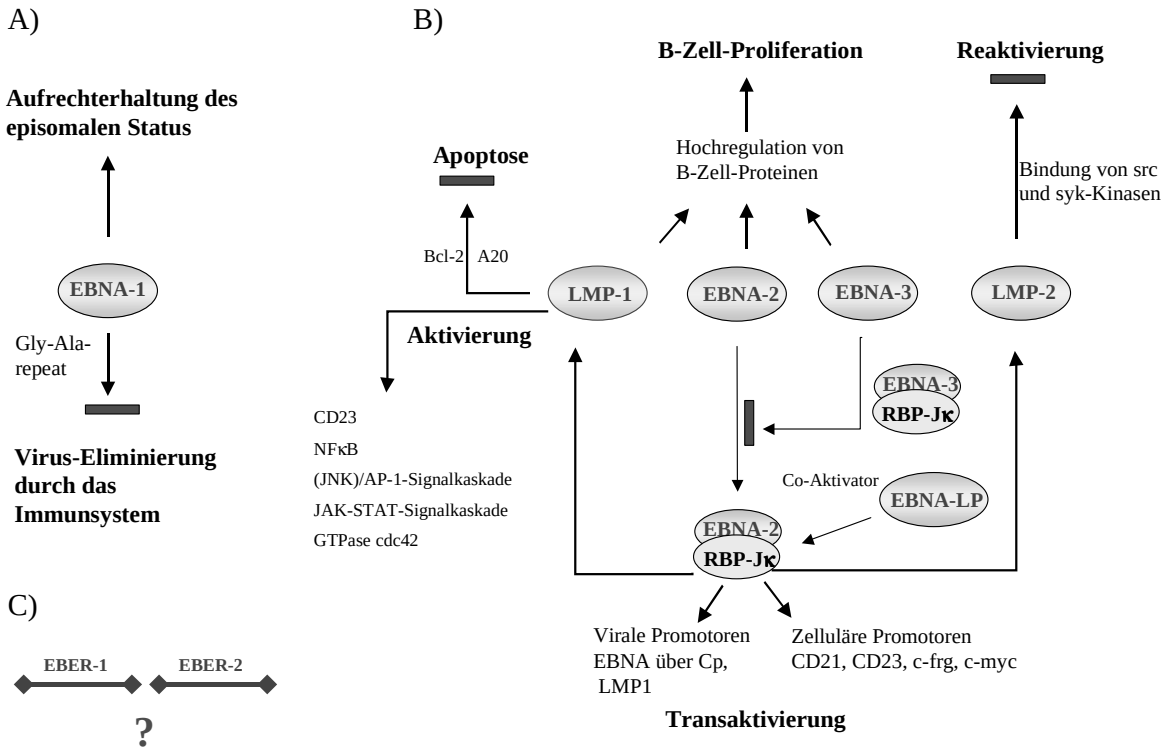


Abbildung 1.3 Wichtige latente Genprodukte und ihre Funktion im Rahmen der latenten Infektion
A) Funktion und Eigenschaften des EBNA-1-Proteins. B) Regulationsnetzwerk der latenten Genprodukte LMP-1, LMP-2, EBNA-2 und EBNA-3 (EBNA-3A, -3B, -3C). C) nicht-translatierte RNA-Transkripte EBER-1 und EBER-2, deren Funktion bislang nicht geklärt ist. Die roten Balken bezeichnen eine Hemmung der entsprechenden Funktion (Erläuterung siehe Text).

Die ersten viralen Genprodukte, die in latent infizierten Zellen nachgewiesen werden können sind EBNA-2 und EBNA-LP (EBNA-5) (Rooney *et al*., 1989; Hitt *et al*., 1989; Alfieri *et al*., 1991) (siehe Abbildung 1.3B) Durch die Wechselwirkung mit dem zellulären Transkriptionsfaktor RBPjκ (CBP-1) (Henkel *et al*., 1994) übt EBNA-2 eine transaktivierende Eigenschaft auf verschiedene zelluläre (CD21, CD23, c-frg, c-myc) und virale Promotoren (Cp-Promotor, LMP-1 und LMP-2) aus (Wang *et al*., 1990b; Abbot *et al*., 1990; Knutson, 1990; Kaiseries *et al*., 1999). Zusammen mit EBNA-5 bewirkt EBNA-2 in der frühen Phase der Infektion von B-Zellen einen Wechsel der Zelle von der Ruhephase G_0 in die Phase G_1 des Zellzyklus (Sinclair *et al*., 1994). EBNA-2 ist absolut essentiell für die Immortalisierung der B-Zellen (Cohen *et al*., 1989; Hammerschmidt und Sugden, 1989).

EBNA-3A, 3B und 3C (= EBNA 3, 4, 6) stellen eine Familie von Genen dar, die nahe verwandt sind. Alle Mitglieder dieser Familie fungieren als Transkriptionsregulatoren mit entweder aktivierenden oder reprimierenden Eigenschaften. Die EBNA-3 Proteine besitzen ebenfalls die Fähigkeit, an RBP-Jκ zu binden (Robertson *et al*., 1995; Robertson *et al*., 1996). Dadurch wird die Bindung von EBNA-2 an den Transkriptionsfaktor verhindert und die Aktivierung der entsprechenden Zielgene unterdrückt. Versuche mit rekombinant

hergestellten Proteinen der EBNA-3-Familie zeigten, dass EBNA-3C essentiell für die Immortalisierung von B-Zellen ist (Tomkinson *et al*., 1993) (siehe Abbildung 1.3B)

Das latente Protein LMP-1 ist das einzige für die Immortalisierung notwendige Protein bei EBV, für das zweifelsfrei onkogenes Potential beschrieben wurde (Wang *et al*., 1985; Kulwichit *et al*., 1998). Es gehört zur Familie von TNF-Rezeptor-ähnlichen Proteinen (TNF-Rezeptor, CD40, Lymphotoxin-Rezeptor) und bindet an verschiedene TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAFs) (Mosialos *et al*., 1995; Liebowitz, 1998). Die Expression von LMP-1 resultiert in einer Aktivierung von NF-κB (Eliopoulos *et al*., 1996; Floettmann *et al*., 1998; Kilger *et al*., 1998) und führt zur Induktion verschiedenster Signal-Transduktions-Kaskaden [JNK/AP1-Signalkaskade (Kieseries *et al*., 1997), JAK-STAT-Signalkaskade, GTPase cdc42 (Gires *et al*., 1999)]. Dabei verhält sich LMP-1 wie ein konstitutiv aktiver Rezeptor, der unabhängig von der Bindung extrazellulärer Liganden seine Funktion ausüben kann (Gires *et al*., 1997). Durch die Hochregulierung von bcl-2 und A20 (Henderson *et al*., 1991; Laherty *et al*., 1992) kann LMP-1 die Apoptose sowohl in Epithelzellen (durch A20) (Fries *et al*., 1996) als auch in B-Zellen (durch A20 und bcl-2) verhindern (siehe Abbildung 1.3B).

Die beiden Proteine LMP-2A und LMP-2B werden von ein und demselben Gen codiert und unterscheiden sich lediglich im ersten Exon, welches LMP-2B fehlt. Aufgrund dieser Tatsache wurde spekuliert, dass LMP-2B als ein negativ wirkender Regulator zu LMP-2A fungieren könnte. Ebenso wie bei LMP-1 handelt es sich bei LMP-2A um ein integrales Membranprotein mit 12 Transmembran-Domänen. Der intrazytoplasmatische Anteil des Proteins enthält eine ITAM-Domäne (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*), die Kinasen der src- und syk-Familien rekrutieren kann. Diese Tyrosin-Kinasen sind involviert in die Signal-Transduktions-Kaskade des B-Zell-Rezeptors. Die Bindung der Kinasen an die phosphorylierte ITAM-Domäne von LMP-2A reprimiert die Aktivierung der B-Zell-Rezeptor-Kaskade und verhindert somit die Induktion der lytischen Replikation des Virus (Fruehling *et al*., 1996; Fruehling und Longnecker, 1997; Fruehling *et al*., 1998) (siehe Abbildung 1.3B).

Bei der Aufrechterhaltung der Latenz spielt auch das EBNA-1-Protein eine große Rolle. Es ist das einzige Protein, das in jeder EBV-infizierten Zelle exprimiert wird. EBNA-1 hält den episomalen Status des EBV-Genoms in der infizierten Zelle aufrecht (Middleton und Sugden, 1992) (siehe Abbildung 1.3A) und stellt somit die Verteilung der viralen Genome auf die Tochterzellen sicher. Die Bindung von EBNA-1 an den Replikationsursprung oriP führt zur Aktivierung des Cp-Promoters (Reisman und Sugden 1986) und initiiert dadurch die Transkription der allgemeinen EBNA-RNA von der die verschiedenen EBNA-Proteine translatiert werden. Um eine Eliminierung des Virus durch EBNA-1 spezifische T-Zellen zu verhindern, besitzt das EBNA-1 Protein eine charakteristische Glycin-Alanin-Sequenzwiederholung. Diese *Repeat*-Sequenz verhindert den Abbau des Proteins durch das Proteasom und somit die Erkennung und Zerstörung der EBV-infizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen (Levitskaya *et al*., 1995; Levitskaya *et al*., 1997) (siehe Abbildung 1.3A).

EBER-1 und EBER-2 sind nicht-polyadenylierte RNA-Moleküle ohne Cap-Struktur (Clarke *et al*., 1992), die hauptsächlich im Zellkern der Wirtszelle lokalisiert sind (Howe und Steitz, 1986). Die genaue Regulation dieser beiden Transkripte, die sowohl im latenten wie im lytischen Zyklus detektierbar sind, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Eine immunologische Funktion der EBER-RNAs ist möglicherweise die Vermeidung der Interferon-induzierten Immunantwort (Rosa *et al*., 1981; Sharp *et al*., 1993).

Die lytische Vermehrung des Epstein-Barr-Virus

Ziel der lytischen Infektion ist die Produktion und Freisetzung infektiöser Virionen, durch deren Übertragung im Speichel die Verbreitung des Epstein-Barr-Virus gewährleistet wird. *In vitro* kann das in den lymphoiden Zellen latent vorliegende Virusgenom durch die Behandlung mit verschiedenen Agentien (z.B. Phorbolester, Buttersäure, Ca-Ionophoren oder durch Quervernetzung von Oberflächenimmunglobulinen) reaktiviert und der lytische Zyklus eingeleitet werden (Luka *et al.*, 1979; Bauer *et al.*, 1982; Mellinghof *et al.*, 1991). Im Verlauf der produktiven Vermehrungsphase erfolgt die Transkription etwa 100 viraler Gene (Baer *et al*., 1984) in einer dreiteiligen Aktivierungskaskade, die aus der „unmittelbar frühen" (*immediate-early*) der „frühen" (*early*) und der „späten" (*late*) Phase besteht.

In der ersten Phase erfolgt die Umstellung von der latenten Genexpression in die lytische Kaskade. Dabei werden zunächst die sehr frühen Gene (*immediate-early*, alpha) abgelesen, die unabhängig von der Synthese anderer Virusproteine exprimiert werden können. Zu ihren wichtigsten Aufgaben zählt zum einen, Gene der Latenz abzuschalten (EBNA-Promotoren im BamHI-C/W-Fragment, LMP-Promotor) und zum anderen die Gene der zweiten Stufe (*early*-Gene) zu aktivieren (Kenney *et al*., 1989). Somit kommt den sehr frühen Genen eine regulatorische Funktion bei der Entscheidung über latente oder lytische Replikation zu. Bei EBV konnten bislang drei funktionell essentielle, sehr frühe Genprodukte identifiziert werden: BZLF-1(Zta, Z-Transaktivator, Z, ZEBRA), BRLF-1 (Rta, R-Transaktivator, R) und BI`LF-4 (I´ta, I´-Transaktivator, I´). Eine besondere Stellung nimmt dabei Zta ein, das unverzichtbar für den Beginn der lytischen Replikation ist. Es ist das einzige der drei sehr frühen Gene von EBV, das in der Lage ist, ohne Mitwirkung weiterer viraler Faktoren, in B-Lymphozyten die Latenz zu beenden (Grogan *et al*., 1987; Countryman *et al*., 1987). Die Regulation des BZLF1-Gens selbst unterliegt dabei einer transkriptionellen (Kenney und Zalani, 1995), einer post-trankriptionellen (Prang *et al*., 1995), einer posttranslationellen (Kenney *et al*., 1989) und einer immunologischen Kontrolle (Bogedain et al., 1995). Für das zweite Genprodukt, Rta, konnte eine ähnliche transaktivierende Eigenschaft in Epithelzellen (Zalani *et al*., 1996) und in B-Zellen (Ragocy *et al*., 1998) nachgewiesen werden. Die Transaktivierung verschiedener früher Gene durch Rta verläuft allerdings in Koordination mit Zta (Holley-Guthrie *et al*., 1990). Auch die Expression später Gene scheint vom Vorhandensein beider Faktoren abhängig zu sein (Delecluse H.J., persönliche Mitteilung). Das dritte *immediate-early*-Gen BI`LF4 scheint für die Induktion der lytischen Vermehrung in B-Lymphozyten nicht essentiell zu sein. Es wurde beobachtet, dass die transaktivierenden Eigenschaften des Genproduktes I`ta zelltypspezifisch sind (Marschall *et al.*, 1991) und man vermutet, dass die Funktion durch andere Faktoren komplementierbar ist. Bisher konnte lediglich die Aktivierung des BMLF1-Promotors (*early*-Gen) und des eigenen Promotors nachgewiesen werden.

Bei anderen Herpesviren, wie z.B. HSV oder VZV, wird die Expression der *immediate-early* Gene durch zusätzliche Transaktivatoren verstärkt. Dabei handelt es sich meist um Tegumentproteine, die bei der Infektion in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen werden und nach dem Import in den Kern transaktivierende Eigenschaften auf die *immediate-early*-Gene ausüben können. Besonders gut untersucht ist diese Aktivierung bei den Herpes-Simplex-Viren. Dabei fungiert die Tegumentkomponente VP16 (α-TIF, Vmw65, ICP25) als Transaktivator (Greaves und O`Hare, 1990). Das Protein, das während der lytischen Replikation selbst erst sehr spät synthetisiert wird (*gamma*-Gen) (Weinheimer *et al*., 1992), ist für die Replikation des viralen Genoms nicht unbedingt erforderlich; das *Virusassembly* jedoch kann ohne VP16 nicht korrekt durchgeführt werden (Smibert *et al*.,

1994). Seine Funktion als Transaktivator übt VP16 aus, indem es mit zwei weiteren Faktoren, dem HCF (*host cell factor*) (Simmen *et al*., 1997) und dem Oct1-Bindeprotein einen Multiproteinkomplex ausbildet (O`Reilly *et al*., 1997; Lai und Herr, 1997) und somit indirekt an spezifische Promotorsequenzen der sehr frühen Gene binden kann. Eine Viruskomponente, die in ähnlicher Weise wie VP16 bei HSV die Regulation der *immediate-early*-Gene übernimmt, konnte auch bei dem Varicella-Zoster-Virus identifiziert werden. Das Genprodukt des *Open Reading Frame* 10 (ORF10) ist im Tegument des Virions lokalisiert und weist große Ähnlichkeiten zu VP16 auf (Moriuchi *et al*., 1993). Ein Protein, das in ähnlicher Art und Weise wie VP16 bei HSV oder ORF10 bei VZV eine zentrale Funktion bei der Aktivierung der *immediate-early* Gene übernimmt, konnte bei EBV bislang nicht identifiziert werden.

In der nächsten Phase der lytischen Genkaskade werden die frühen (*early*, beta) Gene exprimiert. Dabei handelt es sich in erster Linie um Genprodukte, die für die lytische DNA-Replikation benötigt werden wie z.B. die DNA-Polymerase (BALF5), die Ribonukleotid-Reduktasen (BORF2 und BaRF1), die Thymidin-Kinase (BXLF1) und die Alkalische Exonuklease (BGLF5) (Rickinson und Kieff, 1996). Insgesamt konnten bei EBV etwa 30 frühe Gene identifiziert werden. In den meisten Promotorbereichen dieser Gene sind Bindestellen für Zta (*Z-Response-Elements*, ZRE) oder Rta (*R-Response-Element*, RRE) enthalten, so dass diese ihre transaktivierende Funktion ausüben können. Zu den Genprodukten, die durch Zta aktiviert werden, gehören zum Beispiel das post-transkriptionell wirkende Transaktivator-Protein MSta (Buisson *et al*., 1989) und auch das Einzelstrang-DNA-bindende Protein p138 (BALF2) (Fixman *et al*., 1992). Ein weiteres Genprodukt der frühen Phase, BHRF1, besitzt Homologien zu dem zellulären Faktor bcl-2 und scheint *in vivo* in der Lage zu sein, den im Verlauf der lytischen Replikation induzierten apoptotischen Zelltod zu verhindern oder zu verzögern und so die Freisetzung reifer Virionen sicherzustellen (Thoerley-Lawson, 1996).

Nach der DNA-Replikation wird schließlich das Virus-*Assembly* eingeleitet. Die dazu notwendigen Strukturproteine sind in den späten (*late*, gamma) Genen kodiert. Zu ihnen gehören die Glykoproteine gp220/350 (BLLF1), gp85 (BXLF2), gp110 (BALF4), gp 55/80 (BILF2) und das Protein p150 (BcLF1, VCA, *virus capsid antigen*). Regulatorische oder enzymatische Proteine konnten in der späten Replikationsphase nicht gefunden werden (Kieff, 1996).

Virusreifung und Freisetzung

Die lytische Vermehrungsphase resultiert in der Produktion und Freisetzung infektiöser Viruspartikel. Dabei ist über den Prozess der Virusreifung (*Assembly*), dem Transport der Viruspartikel zur und der Freisetzung an der Zellmembran sehr wenig bekannt. Am besten untersucht sind diese Vorgänge bei den Alphaherpesviren zu denen auch HSV-1 gehört. Für die Mitglieder der Beta- (HCMV) und Gammaherpesvirinae (EBV) können zum jetzigen Zeitpunkt kaum Aussagen getroffen werden.

Für alle Herpesviren erfolgt zunächst der Zusammenbau von unreifen Partikelvorläufern im Zellkern. Strukturproteine, kodiert von sehr späten Genen der lytischen Genkaskade, bilden dabei zusammen mit der neusynthetisierten Virus-DNA unreife Nukleokapside aus, die mittels Knospung (*budding)* an der inneren Kernmembran in den perinukleären Raum gelangen (Nii, 1992; Roizman und Sears, 1996). Alle folgenden Ereignisse, wie die Assoziation der Tegumentproteine, der Transport der Vorläuferpartikel zur Zellmembran,

die Ausstattung mit einer Hüllmembran und der darin verankerten Glykoproteine, werden kontrovers diskutiert. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten im Zytoplasma infizierter Zellen sowohl „nackte“ Kapside ohne jegliche Membran, teilweise und komplett umhüllte Virionen detektiert werden (Banfield und Tufaro, 1990; Campadelli-Fiume *et al*., 1991; Johnson und Spear, 1982; Torrisi *et al*., 1992). Zwei wesentliche Modelle zur Virusreifung wurden deshalb für die Familie der Herpesviren aufgestellt (Enquist *et al*., 1998; Whittaker und Helenius, 1998). Das erste Modell wurde vor allem für HSV-1 vorgeschlagen und postuliert ein einziges *budding*-Ereignis. Dabei binden zunächst Tegumentproteine an die DNA-haltigen unreifen Nukleokapside und es kommt zur Assoziation mit der inneren Kernmembran, wobei die Partikel ihre Hüllmembran mit eingelagerten Glykoproteinen erhalten. In Vesikeln verpackt erfolgt der Transport der Virionen über den Golgi-Apparat, in dem die Glykoproteine weiter modifiziert werden, an die Zellmembran, wo durch Exozytose die Freisetzung der reifen Viruspartikel erfolgt (Stephens und Compans, 1988; Campadelli-Fiume *et al*., 1991; Campadelli-Fiume *et al*., 1993; DiLazzaro *et al*., 1995; Johnson und Spear, 1982; Roizman und Sears, 1996). Für andere Herpesviren wie z.B. EBV, Pseudorabies Virus (PrV), VZV und HCMV wurde ein anderes Modell vorgeschlagen. Dabei kommt es zunächst zu einer „Enthüllung“ der Vorläuferpartikel an der perinukleären Membran und in einem zweiten Schritt zur Ausstattung mit einer Hüllmembran in der *Trans*-Golgi-Region (*Deenvelopment-Reenvelopment-Pathway*) (Card *et al*., 1993; Gong und Kieff, 1990; Granzow *et al*., 1997; Johnson und Spear, 1982; Muraki *et al*., 1996; Nii *et al*., 1968; Radsak *et al*., 1996; Whealy *et al*., 1991; Zhu *et al*., 1995). Neuere Studien verweisen auch für HSV-1 auf diesen Reifungsprozess (Browne *et al*., 1996; Whiteley *et al*., 1999).

Unabhängig davon wie die Virusreifung und die Freisetzung der reifen Partikel erfolgt, ist für den Zusammenbau der Virionen eine Komponente von entscheidender Bedeutung: das Tegument. Laut Definition handelt es sich dabei um eine amorphe Region des Viruspartikels, die sich zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran befindet. Die Dicke dieser Schicht hat einen wesentlichen Einfluß auf die Größe der Viruspartikel. Die Gruppe an Proteinen, die diese Struktur ausbilden, ist wenig untersucht und ihre Funktionen meist unbekannt. Insbesondere im Hinblick auf die duale Funktion, die den Tegumentproteinen zukommt: Zum einen ihre Rolle zu Beginn der Infektion, wenn das Kapsid-Tegument in die Zelle eindringt und Tegumentproteine *trans*-aktivierende Eigenschaften auf *immediate early*-Gene ausüben und zum anderen ihre Aufgabe bei der Virusreifung und dem Austritt aus der Wirtszelle.

Für das Herpes-Simplex-Virus-1 konnten bislang die meisten Tegumentproteine identifiziert und untersucht werden. Eine besondere Stellung nimmt dabei das bereits erwähnte VP16-Protein ein, das sowohl als Transaktivator innerhalb eines Multiproteinkomplexes mit HCF (*host cell factor*) und Oct-1 auf die *immediate early*-Gene Einfluss nimmt (Campbell *et al*., 1984; O`Hare *et al*., 1988; Simmen *et al*., 1997; O´Reilly *et al*., 1997; Lai und Herr, 1997), als auch essentiell für die Virusreifung ist. Letztere Funktion bewältigt VP16 indem es in der späten Phase des lytischen Replikationszyklus an das vhs-Protein (*virion host shutoff*) des Herpes-Simplex-Virus bindet. Die Aufgabe dieses Proteins besteht normalerweise darin, den Abbau der zellulären und viralen mRNA zu beschleunigen (Kwong *et al*., 1988). Spät im Infektionszyklus wird es in der Zelle angehäuft und durch die Bindung an VP16 in das Virion-Tegument verpackt. Diese Bindung führt dazu, dass VP16 keinen Multiproteinkomplex mehr ausbilden kann und die Transaktivierung der sehr frühen Gene unterbleibt (Smibert *et al*., 1994).

Weitere wichtige Strukturproteine bei HSV-1 sind VP1/2, VP13/14 und VP22. Charakteristisch für diese Tegumentproteine ist, dass sie als sehr späte Gene (*true late, γ2*) exprimiert, posttranslationell modifiziert (z.B. VP1/2: Phosphorylierung an Serin-Resten) und in relativ geringer Kopienzahl in das Virion eingelagert werden (150 Kopien für VP1/2; 1800 Kopien für VP13/14). Die Funktion der Tegumentkomponenten ist unterschiedlich. So wurde für VP1/2, dem größten Tegumentprotein von HSV-1, ein Komplex mit einem virus-spezifischen 140 kDa-Protein beschrieben, der spezifisch an a-Sequenzen von HSV-1 bindet. Diese Sequenzabschnitte spielen eine wichtige Rolle bei der Spaltung und Verpackung der Virus-DNA in die Kapside während des *Virusassembly* (McNabb und Courtney, 1992). Eine andere Funktion wurde für VP13/14 gefunden. Als bislang einziges Tegumentprotein weist VP13/14 ein Arginin-reiches Kernlokalisations-Signal auf, wie man es bei Rev und Tat von HIV findet. Dies deutet auf ein *Shuttling* des Proteins zwischen Kern und Zytoplasma hin und spricht VP13/14 eine entscheidende Rolle bei der Genexpression zu. Die Aktivität des VP16-Proteins scheint ebenfalls von VP13/14 moduliert zu werden. Dabei konnte in Zellkultur gezeigt werden, dass das Protein nicht essentiell für die Virusvermehrung ist. VP13/14 könnte somit eine Rolle als akzessorisches Protein zukommen (Donelly und Elliott, 2001a). Im Gegensatz zu VP13/14 wurde das Strukturprotein VP22 von HSV-1 ausschließlich im Zytoplasma detektiert. Seine Funktion konnte jedoch bislang nicht geklärt werden (Donnelly und Elliott, 2001b).

Diese Beispiele des Herpes-Simplex-Virus-1 machen deutlich, welche unterschiedlichen Funktionen die Tegumentproteine übernehmen können und inwieweit diesen Strukturproteinen eine entscheidende Rolle bei der Virusvermehrung und der Produktion infektiöser Viruspartikel zukommt. Trotz alledem wurden bei anderen Vertretern der Herpesvirus-Familie bislang kaum Tegumentproteine identifiziert und charakterisiert. Tabelle 1.3 gibt einen schematischen Überblick über bislang bekannte Tegumentkomponenten.

Tabelle 1.3 Wichtige Tegumentproteine von HSV, CMV und EBV und ihre Funktionen

Molekulargewicht (kDa)/Bezeichnung/Genort				
HSV	CMV	EBV	Modifikation	Funktion
54/α-TIF, ICP25, VP16, Vmw65/U_L48	71/-/UL82	-/-/BPLF1?	phosphoryliert	Transaktives Protein, induziert die Transkription der *immediate-early*-Gene
74/VP13-14/U_L47			phosphoryliert, glykosyliert	Moduliert die funktionelle Aktivität von VP16; besitzt ein arginin-reiches Kernlokalisationssignal, das auf ein *Shuttling* des Proteins zwischen Kern und Zytoplasma hindeutet
58/Vhs-Protein/U_L41				*Virus-host-shutoff*, bewirkt Abbau und Destabilisierung der mRNA-Spezies der Wirstzelle
270/VP1-2/UL36	212/-/UL48		phosphoryliert	Beteiligung an der Verpackung der Virus-DNA in das Kapsid
18/-/U_S11			myristyliert	Bindet sich an die große Ribosomenuntereinheit und an die mRNA des U_L34-Gens, Antiterminator-funktion?
	150/-/UL32		phosphoryliert, glykosyliert	Akzeptor von Phosphatgruppen durch die virion-assoziierte Proteinkinase, induziert virustyp-übergreifende Antikörperbildung
57/VP18,8/U_L13	65/-/UL83		phosphoryliert	Proteinkinase und Akzeptor von Phosphatgruppen (bei CMV)
		152/-/-		Hauptkomponente des Teguments
	85/-/UL25		phosphoryliert	
38/VP22/ UL 49			phosphoryliert, mono(ADP)-ribosyliert	Während der frühen Phase der Infektion im Zytoplasma lokalisiert; in der späten Phase akkumuliert es im Kern

Ein weiteres erwähnenswertes, jedoch wenig verstandenes Phänomen ist die Ausbildung von sogenannten *Dense*- bzw. L-Partikeln. Dabei handelt es sich um Tegument-haltige Partikel, die weder Kapsid- noch Nukleokapsidstrukturen besitzen. Für das Equine-Herpes-Virus 1, HSV-1, PrV und HCMV wurden solche Formen beschrieben (Irmiere and Gibson, 1983; McLauchlan und Rixon, 1992; Rixon *et al*., 1992; Szilagyi und Cunningham, 1991; Talbot und Almeida, 1977). Die Interaktion zwischen Tegumentproteinen und Membranproteinen, unabhängig von der Anwesenheit der Kapsidstrukturen, scheint dabei ausreichend für den intranukleären und intrazytoplasmatischen Knospungs-Prozess (Granzow *et al*., 2001).

1.3 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel angefertigt, ein bislang unbekanntes Gen des Epstein-Barr-Virus zu identifizieren. Auf verschiedenen Ebenen sollte der offene Leserahmen BPLF1 genauer charakterisiert werden. Dabei stand eine zentrale Frage im Mittelpunkt der Untersuchungen:

> Handelt es sich bei BPLF1 um ein tatsächlich existierendes Gen, das auch *in vivo* transkribiert und exprimiert wird?

Literaturrecherchen lieferten nur wenige Hinweise auf die Existenz bzw. die Funktion des BPLF1-Gens. In einem einzigen Verweis wurde eine Homologie von BPLF1 zu dem Transaktivator VP16 von Herpes-Simplex-Virus 1 aufgeführt.

Grundlage für alle experimentellen Arbeiten bildete deshalb eine ausführliche Computeranalyse des Gens, durch die der Leserahmen von BPLF1 eingehend auf strukturelle Eigenschaften und Funktionen überprüft werden sollte. Dabei stand sowohl die Analyse der Genstruktur (Größe, Exon-Intron-Strukturen, Promotor-Elemente, usw.) als auch die Untersuchung des BPLF1-Proteins im Vordergrund. Neben der Charakterisierung auf Nukleinsäure- und Proteinebene sollte in den Computeranalysen auch die in der Literatur beschriebene Homologie zu VP16 genauer analysiert werden. Dadurch konnten eventuell erste Hinweise auf die Funktion des BPLF1-Proteins erhalten werden.

Das Ziel der praktischen Arbeit bestand in erster Linie darin, sowohl die Transkription als auch die Expression eines Genprodukts *in vivo* nachzuweisen.

Mit Hilfe von RT-PCR und Northernblot-Analysen konnten sowohl Aussagen bezüglich des BPLF1-Transkripts selbst, d.h. Größe, Spleißvarianten, Polyadenylierung etc., als auch bezüglich der Aktivität des Gens getroffen werden. Der Einsatz verschiedenster Zellinien erlaubte die Eingrenzung der Aktivität des BPLF1-Gens auf einen definierten Zeitpunkt während der Virusvermehrung.

Im Anschluss an die genaue Charakterisierung der BPLF1-RNA und ihrer Eigenschaften sollte dann das BPLF1-Protein identifiziert werden. Von besonderem Interesse war dabei, ob es tatsächlich zur Expression eines BPLF1-spezifischen Genproduktes kommt und welche Funktion dieses Protein im viralen Lebenszyklus übernimmt. Auch die in den Computeranalysen identifizierten Eigenschaften und Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung oder Lokalisation in der Wirtszelle, sollten genauer untersucht werden.

Durch die Charakterisierung des BPLF1-Leserahmens sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationeller Ebene sollte somit ein Gesamtüberblick über die Aktivität und die Funktion des BPLF1-Gens geschaffen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Bakterienkultur

Für Klonierungen und Plasmid-Präparationen wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5α verwendet, der sich vom Sicherheits-Stamm K12 ableitet. Die DH5α–Kulturen entstammten dem Vorrat der Arbeitsgruppe und wurden ursprünglich aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in Göttingen bezogen. Spezielle Klonierungen erforderten den Einsatz Methylierungs-sensitiver Restriktionsenzyme. Zu diesem Zweck wurde der Bakterienstamm SCS 110 eingesetzt, dem die Gene für die Adenin- (*dam*) und Cytosin-Methylierung (*dcm*) fehlen. Für sämtliche Klonierungen mit Hilfe des *TOPO TA Cloning® Kit* der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) wurde der Bakterienstamm TOP10 verwendet. Die rekombinante Expression verschiedener BPLF1-Fragmente wurde im Bakterienstamm TOPP3 durchgeführt. Dieser Stamm ist kein Derivat des *E.coli* K12 Sicherheitsstammes und eignet sich besonders für die Produktion schwer exprimierbarer Proteine (Er wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Thomas Dobner zur Verfügung gestellt).

E.coli K12 DH5α (Woodcock *et al*., 1989)

F`endA1 hsdR17(r_k-m_k^+) supE44 thi recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ(lacZYA –argF) U169 (∅80d lacΔ(lacZ) m15)

SCS 110 (Stratagene™ , Heidelberg)

rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm

supE44Δ(lac-proAB)[F`traD36proAB $lacI^qZ\Delta M15$]

E. coli TOPP 3 (Stratagene™ , Heidelberg)

Rif^r [F`proAB $lacI^q$ ZΔ M15Tn10(Tet^r)(Kan^r)]

E. coli TOP10 (Invitrogen, Groningen, Niederlande; http://www.invitrogen.com)

F^-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR

araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1nupG

Die Anzucht von Flüssigkulturen, Herstellung von Agar-Nährböden und die Konservierung von Bakterienklonen erfolgte nach Angaben des Herstellers bzw. nach Standardprotokollen (Sambrook *et al*., 1989).

2.1.2 Zelllinien

Die nachfolgenden Zelllinien wurden im Rahmen dieser Dissertation für Arbeiten wie Transfektionsexperimente, zur Gewinnung von Nukleinsäuren und Proteinextrakten verwendet.

B95-8 (Miller *et al*., 1972)

Die Zelllinie wurde durch Infektion von B-Lymphozyten aus Marmoset-Affen (*Callithrix jacchus*) mit Rachenspülwasser eines Spenders mit akuter IM gewonnen. In einem Prozentsatz von 3-5 % der Zellen repliziert EBV lytisch, wodurch sich die Zellen zum Nachweis lytischer Antigene, auch ohne chemische Induktion, eignen. Suspensions-Zelllinie.

Raji (Pulvertaft, 1964)

Die Raji-Zelllinie wurde aus einem afrikanischen Burkitt`s Lymphom etabliert. Die Zelllinie besitzt eine Deletion in der BALF2-Region, die für das frühe Protein p138 kodiert. Die Zellen können daher keine infektiösen Viruspartikel produzieren. Suspensions-Zelllinie.

LCL-EM (entspricht ATCC CRL 721.221)

Diese lymphoblastoide Zelllinie (LCL) stammt von einem Spender des Institutspersonals und wurde mittels Immortalisierung der B-Lymphozyten durch Infektion mit dem EBV-Stamm B95-8 gewonnen. In diesen Zellen persistiert EBV strikt latent. Suspensions-Zelllinie.

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

Diese latent mit EBV infizierte Burkitt`s-Lymphom Zelllinie ist ein Subklon der Daudi-Zelllinie. Sie besitzt eine Deletion im rechten Teil des IR1, in der gesamten U2-Region und ist vollständig in IR2 deletiert. Dieser Zelllinie fehlen damit die für die Immortalisierung von lymphoiden Zelllinien entscheidenden Proteine EBNA5 und EBNA2. Durch chemische Induktion mit TPA und Buttersäure lässt sich EBV in dieser Zelllinie gut in den lytischen Zyklus überführen. Suspensions-Zelllinie.

DG75 (Ben-Bassat *et al*., 1977)

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine EBV-negative Zelllinie, die aus einem Burkitt`s Lymphom gewonnen wurde. Suspensions-Zelllinie.

COS7 (Gluzman, 1981)

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Affen-Nieren-Zelllinie, die durch Transformation der CV-1-Zelllinie (ATCC CCL-70) mit einer *origin*-defekten Mutante des SV40-Virus, das für das Wildtyp T-Antigen kodiert, gewonnen wurde. Die Zellen weisen eine Fibroblasten ähnliche Morphologie auf. Die Zelllinie ist besonders geeignet für

Transfektionen mit Vektoren, die die Expression des SV40 T-Antigens benötigen. Adhärente Zelllinie (siehe Kapitel 2.4.3).

2.1.3 Antikörper und Seren

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper und Seren

Bezeichnung	Ziel	Firma
Maus-anti-BZ1 (Mak)	BZLF1-Protein	Dako Diagnostika, Hamburg
Maus-anti-PE2 (Mak)	EBNA2-Protein	Dako Diagnostika, Hamburg
Maus-anti-GST	GST	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
NPC-Serum (polyklonales Serumgemisch von NPC-Patienten)	Humane Antigene	Max von Pettenkofer Institut, München
Polyklonales Kaninchen-Serum anti-BPLF1	BPLF1-Protein	Eigene Arbeitsgruppe
Anti-Digoxigenin, AP konjugiert, Fab-Fragments	Digoxigenin	Roche Diagnostics, Mannheim
Kaninchen-anti-Maus, AP konjugiert	FC-Anteil von Maus-AK´s	Dako Diagnostika, Hamburg
Kaninchen-anti-Mensch IgA, IgG, IgM, HRP konjugiert	Fc-Anteil von humanen IgA-, IgG-IgM-Antikörpern	Dako Diagnostika, Hamburg
Kaninchen-anti-Mensch IgA, IgG, IgM; AP konjugiert	Fc-Anteil von humanen IgA-, IgG-, IgM-Antikörpern	Dako Diagnostika, Hamburg
Esel-anti-Kaninchen Ig, HRP konjugiert	Fc-Anteil von Kaninchen Antikörpern	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg

2.2 Oligo-Desoxynukleotide

Die Oligo-Desoxynukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als 30 Basen wurden HPLC gereinigt verwendet. In den folgenden Tabellen sind die Oligo-Desoxynukleotide mit ihrer genauen Bezeichnung, ihrer Lage innerhalb des EBV-Gesamtgenoms und ihrer Basenabfolge in 5`-3`Orientierung aufgeführt.

Tabelle 2.2 PCR-Primer für die Klonierung verschiedenster Abschnitte des BPLF1-Gens

Bezeichnung	Genomkoordinaten	Oligonukleotid-Sequenz (5`- 3`)
bplf1-I 5`	71509-71527	CGCGGATCCAAGCTTATGAGTAACGGCGACTGGG
bplf1-I 3`	69470–69487	CGCGGATCCGGTGGGGATATCGGAGGC
bplf1-II 5`	69514–69532	GAAGATCTAAGCTTCCTTTCCTATCCATGTCCG
bplf1-II 3`	67508–67526	GAAGATCTTGGGATGAGCGTTTGGGAG
bplf1-III 5`	67544–67564	GAAGATCTAAGCTTGATGCCCTGAGACTACTCTC
bplf1-III 3`	64565–64582	GAAGATCTCCAGAGCTGCTGAAGGGC
bplf1-IV 5`	64638–64657	GAAGATCTAAGCTTCTGGTCCACAACCAAAGTAC
bplf1-IV 3`	62885–62901	GAAGATCTCAAGCCGGACCCCAGGG
bplf1-V 5`	62961–62977	GAAGATCTAAGCTTGGCGCAGCAGCCTCCGC
bplf1-V 3`	62078–62100	GAAGATCTTTACAGATACAAAAACTTGAGTC
BPLF1-long 5`	71516–71536	CCGCCGAAGATGAGTAACGGC
BPLF1-long 3`	61990–62009	GGACAACCCCACGACACCGC
BPLF1-long2 5`	71633–71652	AGACAGAGGAGAGGCGGAGG
BPLF1-long2 3`	61900–61921	TCATCTATTAGCAGCCTCCGGG
BPLF1-ClaI 5`	67835–67857	CCATCGATAACTACATTGCCTCC
BPLF1-ClaI 3`	67848–67872	TTATCGATGGTGTAGAAGGTGATGG
BPLF1-ClaI/2 3`	67794–67814	ACCGGCAAGTCACGATAGAGG
rek1 5`	72420-72437	GTTCAAGCTTCGGGATTACACATTCGC
rek1 3`	71439-71456	GGTTCAAGCTTCCGGGGGCATTCACATCC
rek2 5`	68176-68194	GAACCCGGGGAGACCACCAGAGAAAACG
rek2 3`	67334-67351	CTTGAGCTCTTTGTTGGG
rek3 5`	68047-68063	CGCAAGCTTCAACCACGACAACCCCG
rek3 3`	67008-67025	TCCCTCAAGCTTCTCACCCTCGTTATTCCC
rek4 5`	62641-62657	GGAACCCGGGCAGGAGCAGACAGCAAC
rek4 3`	61633-61651	CGGAGCTCGCTCAAAGAAGTTACCTGG
5` rabbit	66080-66097	CGCGGATCCGGTCTTTCCGAAGGAGCC
3` rabbit	64547-64554	CGCGGATCCCAGCGGGCGCAATGAGTG

Tabelle 2.3 Oligonukleotide als Primer für RT-PCR, Mutagenese-PCR und als Hybridisierungssonden für Southernblot-Analysen

Bezeichnung	Genomkoordinaten	Oligonukleotid-Sequenz (5`-3`)
BPLF1-5` RT	64880-64898	AGATGGGGGTTTGGGAGAC
BPLF1-3` RT	64547-64555	CAGCGGGCGCAATGAGTG
SMART II Oligo		AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG
CDS		AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC$T_{(30)}N_{-1}N$[1]
5` Quick rek2/3		GGCGGGCTTAAAGCCTTCGGCCTCCAGG
3` Quick rek2/3		CCTGGAGGCCGAAGGCTTTAAGCCCGCC
DIG	64638-64657	CTCGTCCACAACCAAAGTAC
DIG-Bio-Sonde	64639–64668	bio[2]-TACTTTGGTTGTGGACCAGGCCCAAGAACT

[1] (N= A, C, G oder T; N_{-1} = A, G oder C

[2] bio= biotinyliert

Tabelle 2.4 Sequenzierprimer für Abschnitte des BPLF1-Gens und verschiedener Expressionsplasmide

Bezeichnung	Genomkoordinaten	Oligonukleotid-Sequenz (5`-3`)
Seq 1	70567-70584	CGGCAGGGAATGAGTCGG
Seq 2	70212-70229	GTGGTGGAGGACAGAGGG
Seq2.2	70127-70144	GATTACTGGAGGGGGAAG
Seq 3	69796-69814	GCTGCTGAGGAAGAAGTGG
Seq 3.2	69746-69763	CTGCTGAGGAGGAAGAGG
Seq 3.3	70381-70397	TGAAGAGGGGAGGGCTGG
Seq 4	68569-68586	CAAAGGGGGGCACTGAGG
Seq 5	68218-68237	CTGTCTCAAACTCTGGAAGG
Seq 6	66464-66482	CTCTCGCCTTGTCAGCAGC
Seq 7	65995-66011	CCAGGAGCCGTGTTAGC
Seq 7.2	65939-65957	GCCAACCTCAGCTCCTCC
Seq 8	65067-65084	GAGGCGATGAGACTGGCG
Seq 9	65466-65484	GTTTCCAGCCAGAGGGTGC
Seq 10	64198-64214	CCTCTACTGCGACGGGC
Seq 11	63698-63715	CAGTTGGGAGGAGGGGAG
Seq 12	71346-71364	CACTGGATGCCGGCAAAGC
pGEX 5` Sequencing		GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX 3` Sequencing		CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
pcp16mucrek5` V		TGTTGGGAAGGGCGATCG
pcp16mucrek3` V		GAGCGAGGAAGCGGAAGA
pcp16mucrek5` Tc		ATAGATCGGGGATCTTGAAG
pcp16mucrek3` Tc		GCTTCAAATAAAACCTATCTATT
T7		TAATACGACTCACTATAGGG
M13 *reverse*		CAGGAAACAGCTATGAC

2.3 Plasmide und Cosmide

Die folgenden Plasmide und Cosmide wurden für Klonierungsarbeiten, Expression rekombinanter Proteine und für *in vitro*-Transkriptionen eingesetzt.

pCR®II-TOPO (Invitrogen, Groningen Niederlande; http://www.invitrogen.com)

Klonierungsvektor für *Taq*-amplifzierte oder nachträglich adenylierte PCR-Produkte (TOPO TA-Klonierung); bidirektionaler Expressionsvektor mit T7- und Sp6-Promotor, geeignet für *in vitro* Transkription.

pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, Niederlande; s. http://www.invitrogen.com)

Bidirektionaler Expressionsvektor mit T7- und Sp6-Promotor sowie einem CMV-Promotor-*Enhancer* und einem SV40 *origin of replication.* Dieser Vektor wurde verwendet für Transfektionsexperimente in die Zelllinie Cos 7 zur Expression des gesamten BPLF1-Gens.

pGEX2T (Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, s. http://www.apbiotech.com)

Dieses Plasmid ist geeignet zur bakteriellen Expression von Genen oder Genfragmenten als Fusionsproteine mit *Schistosoma japonicum GST*. Neben dem *tac*-Promotor zur chemischen Induktion der Expression mit IPTG, besitzt das Plasmid ein *lacI*^{q}-Gen zur konstitutiven Produktion des *lac*-Repressors, sowie eine Erkennungssequenz für die Thrombin-Protease zur Abspaltung des GST-Anteils.

pcp16 (Cherepanov und Wackernagel, 1995)

Dieses Plasmid basiert auf pUC19 und enthält eine Kassette mit dem Tetracyclinresistenzgen aus dem Transposon Tn10, welches von zwei FRT-Sequenzen flankiert wird. Diese Zielsequenzen für die *flp* Rekombinase ermöglichen, die einklonierte Resistenz wieder aus zu rekombinieren. Die Tc^R-FRT-Kasette kann mit Hilfe der Restriktionsenzyme *HindIII* und *SmaI* wieder aus dem Vektor herausgeschnitten werden. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. H.-J. Delecluse an der GSF in München zur Verfügung gestellt.

Cosmid cMB14 (Polack *et al.*, 1984)

Konstrukt aus einer Reihe von sechs überlappenden Cosmidklonen, die aus dem EBV-Stamm M-ABA gewonnen wurden. Es enthält die Bereiche des EBV-Genoms *BamHI* H bis M.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Suspensionskultur und adhärente Zellen

Die Kultivierung der Suspensions-Zelllinien erfolgte in supplementiertem RPMI-1640-Medium. Je nach Wachstumseigenschaften der Zellen wurden diese alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:3 mit frischem Medium versetzt. Die adhärente Zelllinie COS7 wurde als Einschichtkultur in supplementiertem *Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium/NUT MIX F-12* (DMEM/NUT MIX F-12) kultiviert. Bei 80 bis 90 % Konfluenz wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und 5 Minuten in 2 bis 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05/0,02 %; PAN Biotech, Aidenbach) inkubiert. Klopfen der Kulturflasche beschleunigte das Ablösen der Zellen, die durch mehrmaliges Spülen aus einer Glaspipette vereinzelt und mit einem 4fachen Volumen frischen DMEM-Mediums aufgefüllt wurden. 4/5 dieser Suspension wurden abgegossen und die verbleibende Lösung mit frischem, vorgewärmtem Medium auf das Ausgangsvolumen der Kultur aufgefüllt. Die Anzucht aller Kulturen erfolgte im Inkubator bei 7 % CO_2 und 37 °C.

RPMI-1640-Medium (suppl.):500 ml RPMI-Medium/L-GLN (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
50 ml Fötales Kälberserum (Gibco Life Technologies, Karlsruhe), hitzeinaktiviert
5 ml Antibiotikum 10 mg/ml (PAN Biotech, Aidenbach)
(Gentamycin, Kanamycin oder Penicillin/Streptomycin)

DMEM/NUT MIX F-12 (suppl.): 500 ml Dulbecco`s modified Eagle`s Medium/NUT MIX F-12 (Gibco Life Technologies)
50 ml Fötales Kälberserum (Gibco Life Technologies, Karlsruhe), hitzeinaktiviert
10 ml L-Glutamin 200 mM (PAN Biotech, Aidenbach)
5 ml Antibiotika Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach)
(Penicillin (10000U)/Streptomycin (10mg) pro 100 ml)

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden 50 µl Zellsuspension steril entnommen, in Trypanblau-Lösung (0,5 % Trypanblau in PBS) verdünnt und unter dem Lichtmikroskop im Raster einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Dabei wurden nur vitale Zellen berücksichtigt, die keinen Farbstoff aufgenommen hatten. Die Zellzahl pro ml Ausgangskultur ergab sich nach Auszählen von 16 Kleinquadraten durch Multiplikation mit Faktor 10^4 und dem Verdünnungsfaktor. Die Kryokonservierung von Kulturen erfolgte in fötalem Kälberserum (FKS), dem 20 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt war. Von der jeweiligen Kultur wurden 2 x 10^7 Zellen abzentrifugiert (5 Min., 20 °C, 1200 Upm, Ausschwingrotor) und die Zellen in 4 ml vorgekühlter FKS/DMSO-Lösung resuspendiert, so dass die Zelldichte bei $5x10^6$/ml lag. Um die Proben schonend einzufrieren, wurden 1 ml Aliquots dieser Suspension (Einfriergefäße von Nunc, Wiesbaden) in Zellstoff gewickelt, in einer Styroporschachtel über Nacht bei –80 °C eingelagert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

2.4.2 Induktion der lytischen Replikation von EBV

Latent infizierte Lymphozyten-Zelllinien konnten mit chemischen Induktoren zur Umschaltung in den lytischen Vermehrungszyklus des Virus angeregt werden. Hierzu wurden in einer Endkonzentration von 40 ng/ml 12-O-Tetradecanoylphorpbol-13-Acetat (TPA, gelöst in DMSO), 3 mM Buttersäure (Sigma-Aldrich Firmengruppe, Deisenhofen) und aktivierter TGFß (TGFß*, *Tumor-growth-factor*, 50 µl/ml Zellen) zu exponentiell wachsenden Kulturen zugegeben. Für die Aktivierung des *Tumor-growth-factors* wurden 10 ml fötales Kälberserum mit 1/10 Volumen 2 N NaOH (1 ml) versetzt und kurz gemischt. Die pH-Wert-Änderung führte zur Aktivierung von TGFß. Zur Neutralisierung wurde 1 ml (1/10 Vol.) 2 N HCl zugegeben. Damit sich die Zellen zum Zeitpunkt der Induktion in der exponentiellen Vermehrungsphase befanden, wurden sie 24 h vor Zugabe der Reagenzien mit frischem Medium auf eine Zelldichte von 3 x 10^5 Zellen/ml verdünnt. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und z.B Gesamt-RNA wie unter 2.6.1 beschrieben, isoliert.

2.4.3 Transiente Transfektion von adhärenten Cos7-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation

Durch die transiente Transfektion kann DNA bzw. ein Plasmid in höhere Zellen eingeschleust werden. Im Gegensatz zur stabilen Transfektion sind hier die eingeschleusten Gene nur vorübergehend in der Wirtszelle aktiv und gehen im Verlauf weiterer Zellteilungen wieder verloren. Für die Transfektion stehen verschiedene Methoden und Zelllinien zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transfektion adhärenter Cos7-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation durchgeführt. Bei dieser Technik wird die DNA in Form von feinkörnigen Calciumphosphat-Präzipitaten auf die Zellen aufgebracht und von diesen durch Endocytose aufgenommen. Das Präzipitat erhält man durch Mischung einer DNA/Calciumchlorid-Lösung mit einer Lösung, die Phosophat-Ionen enthält. Bis zu 80% der Zellen nehmen das DNA-Präzipitat auf. Der Mechanismus ist bislang unbekannt. Bei den verwendeten Cos7-Zellen (siehe Kapitel 2.1.2) handelt es sich um eine Affen-Nieren-Zelllinie, die mit einem *origin*-defektem SV40-Virus transformiert wurde, welches in die chromosomale DNA der Cos7–Zellen integrierte. Deshalb produzieren Cos7-Zellen das große Wildtyp SV40 T-Antigen, aber keine viralen Partikel. Transfektionsplasmide, die einen SV40-*origin* tragen, replizieren hingegen in diesen Zellen in hoher Kopienzahl. Trägt das Plasmid eine cDNA oder genomische DNA, so wird das gewünschte Protein, unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors (z.B. CMV), in großen Mengen über kurze Zeit produziert. Bereits 24 h nach der Transfektion kann ein biologisch aktives und teilweise posttranslationell modifiziertes Protein nachgewiesen werden. Als Transfektionsplasmid wurde in dieser Arbeit der Vektor pCDNA3 eingesetzt, der das komplette BPLF1-Gen enthielt (siehe Kapitel 2.3 und Anhang A.6). Dieser Vektor besitzt neben einem SV40 Replikations-*origin* einen *Enhancer*, Promotor und ein Polyadenylierungs-Signal. Für die Selektion in Bakterien ist zudem ein prokaryotischer *origin* und eine Ampicillin-Resistenz als genetischer Marker vorhanden. Im folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte der transienten Transfektion von BPLF1 in adhärente Cos7-Zellen genauer beschrieben.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so gesplittet, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 40-60% aufwiesen (siehe Kapitel 2.1.2.). Dazu wurden in einer Petrischale (Zellkulturschale, ∅ ca 10 cm, Falcon, Becton Dickinson and Company) $1x10^6$ Zellen bzw. in einer Vertiefung einer Sechslochplatte (Multiwell™6well; Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen, Falcon, Becton Dickinson and Company) $3x10^5$ Zellen ausgesät. Um die Wahrscheinlichkeit der DNA-Aufnahme zu erhöhen, sollten die Zellen möglichst vereinzelt vorliegen. Am Tag der Transfektion wurde das Medium der Zellen durch frisches DMEM/NUT MIX F-12-Medium ersetzt (ca. 14 ml bzw. 2,5 ml).

In Transfektionsröhrchen (5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol, nicht pyrogen, Falcon, Becton Dickinson and Company) wurden 300 µl 2x HEPES-Puffer vorgelegt. Anschließend erfolgte die Vorbereitung des DNA/Calciumchlorid Gemisches. Dazu wurden je nach Zellzahl 45 µg DNA für eine Petrischale bzw. 15 µg DNA für eine Vertiefung einer Sechslochplatte eingesetzt. Die Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge pipettiert und durch vortexen gut gemischt: 300 µl Wasser wurden mit 30 µl $CaCl_2$-Lösung und 15 µg DNA versetzt. Dieses DNA/Calciumchlorid-Gemisch wurde dann unter ständigem vortexen (Vortex Genie 2™, BENDER & HOBEIN, Zürich, Schweiz; Stufe 4-5) zu dem vorgelegten 2x HEPES-Puffer getropft und weitere 5 Sek. gevortext. Nach 20 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Präzipitat

vorsichtig auf die Zellen gegeben und gut durchmischt. Das Präzipitat war im Lichtmikroskop auf den Zellen sichtbar. Nach ca. 12 h wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS_{ohne} gewaschen und anschließend für ca. 48 h bis 72 h weiterkultiviert. Die Ernte und Auswertung des gesuchten Proteins erfolgte wie unter Kapitel 2.6.3.2 beschrieben.

PBS $_{ohne}$: *140 mM NaCl*
2,7 mM KCl
10 mM Na_2HPO_4
1,8 mM KH_2PO_4 pH 7,4

$CaCl_2$: *2,5 M (steril filtriert, Lagerung bei –20°C)*

2 x HEPES: *0,28 M NaCl*
0,05 M HEPES
1,5 mM Na_2HPO_4
ad 400 ml
pH 7,05 genauestens mit 5 N NaOH einstellen
ad 500 ml (steril filtriert, Lagerung in 5 ml Aliquots bei –20°C)

DMEM-Medium (suppl.):500 ml Dulbecco`s modified Eagle`s medium/NUT MIX F- 12 (Gibco Life Technologies)
10% Fötales Kälberserum, (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) hitzeinaktiviert
2% L-Glutamin 200 mM (PAN Biotech, Aidenbach)
1% Antibiotika Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach)
(Penicillin (10000U)/Streptomycin (10 mg) pro 100 ml)

2.5 Allgemeine Methoden

Im Rahmen dieses Material und Methoden Teils wurde explizit darauf verzichtet, allgemein bekannte und etablierte Methoden detailliert darzustellen. Folgende Techniken und Experimente wurden entweder nach Angaben des Herstellers oder nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt:

Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen, Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Enden, Ligation freier Enden, Alkohol-Präzipitation, Phenolextraktion, Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (photometrisch oder durch Mengenvergleich), Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien, Schnellisolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mittels alkalischer Lyse, Isolierung von genomischer DNA aus eukaryontischen Zelllinien.

2.5.1 Bakterien und DNA

2.5.1.1 Chemische Transformation von Bakterien (Rubidium-Chlorid-Methode)

Für chemische Transformationen wurden neben dem *E. coli*-Stamm DH5α auch TOPP3- und SCS 110-Bakterien verwendet (siehe Kapitel 2.1.1). Für die Herstellung Transformations-kompetenter Bakterien wurden 100 ml LB-Medium ohne Antibiotika mit 5 ml Übernachtkultur eines *E. coli*-Stammes beimpft. Beim Erreichen einer OD_{600} von 0,5 bis 0,6 wurden die Bakterien mit 500 x g für 10 Min. bei 4 °C abzentrifugiert und in 10 ml Lösung A resuspendiert. Im folgenden wurde stets zügig und auf Eis gearbeitet. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien vorsichtig in 20 ml auf Eis vorgekühlter Lösung B aufgenommen und 10 Min. auf Eis inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation wurden die Bakterien in 5 ml Lösung B resuspendiert und mit 575 µl sterilem 87 %igem Glycerin (Endkonzentration 10 %) versetzt. Die Suspension aus kompetenten Bakterien wurde in 200 µl Aliquots in vorgekühlte Reaktionsgefäße transferiert und bis zur Transformation bei –80 °C eingelagert. Die erzielte Kompetenz der Bakterien wurde durch Transformation von 5 µg eines Testplasmids überprüft. Die Ausbeute sollte bei bis zu 500 stabilen Transformanden pro 10^6 behandelter Zellen liegen.

LB_0-Medium:
5 g Bacto-Trypton (Difco, Detroit, USA)
5 g Bacto-Yeast Extract (Difco, Detroit, USA)
5 g NaCL (Roche Diagnostics, Mannheim)
ad 1l in H_2O_{bid}, pH 7,3

Lösung A:
10 mM MOPS/NaOH pH 7,0
10 mM Rubidiumchlorid
steril filtriert

Lösung B:
10 mM MOPS/NaOH pH 6,5
10 mM Rubidiumchlorid
50 mM Calciumchlorid
steril filtriert

Zur Transformation wurden 200 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, in ein 15 ml Plastik-Reaktionsgefäß überführt, mit bis zu 100 ng DNA vermischt und 45 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 Min. 42 °C für DH5α bzw. 1 Min. 42 °C für TOPP3- und SCS 110-Bakterien, wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt, bevor sie mit 1 ml LB-Medium versetzt und für mindestens 60 Min. im 37 °C Schüttler inkubiert wurden. Je 200 µl der Suspension wurden auf LB_{amp}-Platten ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C belassen.

Am folgenden Tag konnten Klone zur genaueren Charakterisierung in 5 ml LB_{amp}-Medium angeimpft und Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse präpariert werden. Die isolierte DNA wurde im Anschluß daran mit geeigneten Kombinationen unterschiedlicher Restriktionsendonukleasen so geschnitten, dass nach Agarose-Gelelektrophorese anhand des Spaltungsmusters auf Länge des Vektors, sowie Länge und gegebenenfalls Orientierung der inserierten Fremdsequenzen geschlossen werden konnte. Zur genaueren Charakterisierung, insbesondere zur Überprüfung von Leserastern und auftretenden

Mutationen, wurden alle neuen Plasmidkonstrukte mit geeigneten Oligonukleotiden in den wichtigen Bereichen sequenziert (siehe Kapitel 2.5.1.4).

Ampicillin: *100 mg/ml in 70% ETOH (1:1000 in LB)*

2.5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Agarose-Gelelektrophorese. Das Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese wurde sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt. Dazu zählten vor allem die Analyse von Restriktionsverdauen bzw. DNA-Charakterisierungen, die Überprüfung von PCR-Produkten, die Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung von DNA, sowie die Isolierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen. Im Molekularsieb der Agarosepolymere wandern Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Eigenladung in einem elektrischen Feld zur Anode und werden dabei entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente variierte die Agarosekonzentration zwischen 0,7 % und 2,0 %. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 DNA-Auftragspuffer gemischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TAE-Puffersystem und Flachbrettapparaturen (Hölzl, Dorfen) für Gele mit 50 ml oder 100 ml Volumen verwendet. Die anzulegende Spannung berechnete sich aus dem jeweiligen Abstand der Elektroden und betrug 5 V/cm. Um die DNA im UV-Licht sichtbar zu machen wurde dem Gel Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Um UV-induzierte Schäden zu vermeiden wurden präparative Gele nur längerwelligem, energieärmerem UV-Licht ausgesetzt und grundsätzlich so kurz wie möglich exponiert.

DNA-Laufpuffer 1 X TAE:

40 mM Tris-HCl pH 7,8
20 mM Natriumacetat
2 mM EDTA

DNA-Auftragspuffer:

10 mM Tris-HCl pH 7,9
5 mg/ml Bromphenolblau
5 mg/ml Xylencyanol
50 % Glycerin

Ethidiumbromid-Lösung: 10 mg / ml

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten (von 100 bp bis 10000 bp Länge) aus Agarosegelen wurde der *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Nach der Auftrennung der DNA in einem TAE-Agarosegel, wurde das zu isolierende Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und nach Anleitung des Herstellers präpariert. Das Prinzip des Kits besteht in einer Affinitätsreinigung der DNA über eine Säulenmatrix. Im Anschluß an die Elution der DNA von der Säule wurde die Konzentration des isolierten DNA-Fragments abgeschätzt,

indem ca. 1/10 Vol. des Gesamteluats gleichzeitig mit einer definierten Menge an DNA auf einem Agarosegel aufgetragen wurde. Ca. 100 bis 150 ng dieser DNA wurden für weitere Klonierungsschritte eingesetzt.

2.5.1.3 TOPO TA-*Cloning®* und *Tailing*-Reaktionen

TOPO TA-*Cloning®*. Da eine direkte Klonierung von PCR-Produkten über Restriktionsendonuklease-Schnittstellen oft nur sehr ineffizient funktioniert, wurde der Klonierung in die entsprechenden Expressionsvektoren eine Zwischenklonierung in einen sogenannten TOPO TA-Vektor vorgeschaltet. Zu diesem Zweck wurde der *TOPO TA Cloning®-Kit* (Invitrogen, Groningen, Niederlande) eingesetzt. Das Prinzip dieses Vektorsystems beruht darauf, dass während der PCR von der *Taq*-Polymerase an die 3`-Enden der Amplifikationsprodukte ein Adenin-Rest angefügt wird. Der TOPO TA-Vektor (pCR®II-TOPO siehe Kapitel 2.3) hingegen besitzt einen überhängenden Thymidin-Rest, so dass eine Ligation zwischen Vektor- und Insert-DNA unabhängig von jeglichen Schnittstellen erfolgen kann. In die Reaktion wurden stets neu synthetisierte PCR-Fragmente eingesetzt, um einen Verlust des Adenin-Restes zu vermeiden. Die Klonierungsreaktion und die anschließende Transformation in TOP10 Bakterien (siehe Kapitel 2.1.1) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Verwendung des TOP10-Bakterienstamms erlaubte die Selektion mittels Blau-Weiss-*Screenings* ohne Zugabe von IPTG. Positive Klone wurden durch Alkalische Schnellyse und Restriktionsverdaue identifiziert. Für die Weiterklonierung wurden die PCR-Fragmente mittels geeigneter Restriktionsendonukleasen wieder aus dem TOPO-TA-Vektor herausgeschnitten und für die Ligation mit dem entsprechenden Expressionsvektor eingesetzt.

Tailing-Reaktion. Da die *Taq*-Polymerase während ihrer Amplifikations-Tätigkeit eine sehr hohe Fehlerrate aufweist, wurde für die meisten PCR-Reaktionen ein Gemisch aus einem *proof-reading*-Enzym und der *Taq*-Polymerase eingesetzt (siehe Kapitel 2.5.2). Dies hatte zur Folge, dass der von der *Taq*-Polymerase angehängte Adenin-Rest sofort von dem *proof-reading* Enzym entfernt wurde und eine Klonierung in den TOPO-TA-Vektor nicht mehr möglich war. Um diesen Misstand zu umgehen, wurden die amplifzierten PCR-Fragmente einer *Tailing*-Reaktion unterzogen. Dazu wurden entweder nach der Amplifikation zu dem Reaktionsansatz 5 U der *Taq*-Polymerase zugefügt und weitere 10 Min. bei 72 °C inkubiert oder nach Aufreinigung der PCR-Fragmente über ein Agarosegel eine getrennte *Tailing*-Reaktion durchgeführt.

Tailing-Reaktion:

DNA in H_2O

0,2 mM dATP

2,5 mM $MgCl_2$

1x PCR-Puffer

0,05 U/µl *Taq*-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 30 µl

30 Min. 72 °C

1x PCR-Puffer: *50 mM KCl*
10 mM Tris-HCl, pH 8,3

2.5.1.4 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem institutseigenen Sequenzierautomaten 373A der Firma PE Applied Biosystems (Langen) nach dem „*Taq Cycle-Sequencing-Prinzip*" durchgeführt. Durch die hohe Sensitivität des Verfahrens reichten geringe DNA-Mengen von 0,3 µg bis 0,8 µg und 6 bis 10 pMol Primer in 8 µl $H_2O_{bid.}$ aus, Sequenzanalysen von über 700 bp Länge durchzuführen. Bei der mit thermostabiler *Taq*-Polymerase durchgeführten DNA-Amplifzierung waren der Polmyerisierungsreaktion fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (*DYE-Terminatoren*) beigemischt, die zu einem Kettenabbruch nach dem *Sanger*-Prinzip (Sanger, *et al.*, 1992) führten. Dadurch, dass die Didesoxynukleotide aller vier Basen jeweils mit einem individuellen Fluoreszenzfarbstoff markiert waren, konnten die entstehenden Fragmente in einer einzigen Spur eines hochauflösenden, harnstoffhaltigen Sequenzgels aufgetrennt werden und die Basenabfolge der Abbruchsleiter lasergestützt ausgewertet werden.

2.5.1.5 Southern-Blot-Analysen und DIG-Detektion

Bei der Southernblot-Analyse werden DNA-Fragmente zunächst durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und anschließend aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägermembran aus Nitrozellulose oder Nylon übertragen. Um genspezifische DNA-Stücke sichtbar zu machen, bedient man sich der Nukleinsäure-Hybridisierung. Als Gensonde dient hierzu zB. ein Digoxygenin- (DIG), endmarkiertes Oligonukleotid. Der Nachweis erfolgt dann mit Hilfe eines gegen Digoxygenin gerichteten, spezifischen Antikörpers, der seinerseits mit einem Enzym (Alkalische Phosphatase) gekoppelt ist. Die enzymatische Spaltung eines chromogenen Substrates durch das am Antikörper gebundene Enzyms führt zur Bildung eines Reaktionsproduktes, das autoradiographisch nachgewiesen werden kann.

Southernblot mit *Vacu Blot* (Biometra®, Götingen). Die auf einem Agarosegel aufgetrennten DNA-Proben wurden mit Hilfe der Vakuum-Blottechnik auf eine positiv

geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) übertragen und immobilisiert (*Southernblot*). Das ursprünglich im Gel enthaltene Trennmuster der Moleküle blieb nach der Übertragung auf den Filter erhalten, so dass man eine exakte Replik des ursprünglichen Gels erhielt.

Vor dem Transfer auf die Membran wurde die DNA einer Vorbehandlung unterzogen. Dazu wurde das Gel mit den aufgetrennten Proben bei Raumtemperatur für jeweils 45 Min. in Denaturierungs-Lösung und Renaturierungs-Lösung geschwenkt. Dabei wurden die doppelsträngigen DNA-Moleküle im Trenngel zu Einzelsträngen denaturiert und beim anschließenden *Blotting* auch in einzelsträngiger Form auf die Trägermembran übertragen. Dies war eine wichtige Voraussetzung für die nachfolgende Hybridisierung mit spezifischen Sonden. Nach der Vorbehandlung der DNA, erfolgte der Aufbau der Transfereinheit und der Transfer selbst nach Angaben des Herstellers. Für die *Blotting*-Reaktion wurde 20-fach konzentrierter SSC-Puffer verwendet, da einzelsträngige DNA bei Verwendung niederer Ionenstärke weniger gut an die Trägermembran bindet. Bei einem Vakuum von 500 mbar wurde für 1 h geblottet. Das Vakuum sollte nicht größer als 500 mbar sein, da es bei hohem Unterdruck zu Geltorsionen kommen kann, wodurch die Transfereffizienz stark abnimmt. Die DNA wurde anschließend durch UV-Quervernetzung (UV Stratalinker™ 2400; Stratagene™, Heidelberg) mittels *Auto-Crosslinking* auf der Nylonmembran fixiert.

Denaturierungslösung:

1 M NaOH
1 M NaCl

Renaturierungslösung:

0,5 M Tris-HCl pH 7,5
3 M NaCl

20 x SSC: *3 M NaCl*
0,3 M Natriumcitrat

Digoxygenin-Markierung der Oligo-Sonde. Zur Herstellung der Oligo-Sonde wurde das Verfahren der Endmarkierung angewandt. Dabei konnten mit Hilfe der Terminalen

Transferase die Enden des eingesetzten Oligonukleotids mit Dig-dUTP markiert werden. Die Zusammensetzung der Reaktion zur Markierung war wie folgt:

100 pmol	DIG-Oligonukleotid (siehe Tabelle 2.3)
4 µl	5 x TDT-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim)
4 µl	$CoCl_2$ (25 mM)
1 µl	Digoxygenin-11-2`-desoxy-uridin-5`triphosphat (Roche Diagnostics, Mannheim)
1 µl	10 mM dATP (PE Applied Biosystems, Langen)
2 µl	20 U Terminale Transferase (Roche Diagnostics, Mannheim)
---	
ad 20 µl mit H_2O_{bid}.	

Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 gestoppt und mit 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl 100 % Ethanol für 2 h bei –20°C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation von 30 Min. mit 15000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 4°C. Der Niederschlag wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und in 50 µl H_2O_{bid}. gelöst. Zur Überprüfung der Markierungseffizienz wurde eine Verdünnungsreihe des Digoxygenin-markierten Oligonukleotids (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 in Wasser) hergestellt und je 1 µl auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgebracht. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung im UV Stratalinker™ 2400 (Stratagene™, Heidelberg) mittels *Auto-Crosslinking* mit der Membran quervernetzt. Der Nachweis der markierten Sonde erfolgte wie unten beschrieben (Hybridisierung und Digoxygenin-Nachweis). Als Kriterium für eine erfolgreiche Markierung wurde der Nachweis einer 1:10000 Verdünnung herangezogen.

5 x TdT-Puffer: *1 M Kaliumkakodylat*
125 mM Tris
Rinderserumalbumin 1,25 mg/ml

Hybridisierung der BPLF1-Sonde und Digoxygenin-Nachweis. Zur Sondenhybridisierung wurde die Membran des Southernblots (siehe oben) 5 h in 5 ml Hybridisierungslösung zum Absättigen der freien Bindungsstellen der Membran bei 25 °C gerollert. 10 µl der markierten Sonde wurden 5 Min. bei 95 °C in 500 µl Hybridisierungslösung denaturiert und zur Prähybridisierungslösung zugefügt. Die Hybridisierung erfolgte für markierte Oligos bei 25 °C über Nacht.

Zur Detektion der Signale auf dem Blot wurde die Membran 30 Min. in 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des anti-DIG-Antikörpers (siehe Tabelle 2.3) wurde die Membran nachfolgend 1 h bei Raumtemperatur in 50 ml *Blocking*-Lösung inkubiert. Anschließend wurde das Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat 1:20000 in 50 ml Malat-Puffer (DIG-Puffer 1) verdünnt.

Die spezifische Bindung des Konjugats an die gebundenen Sonden erfolgte für 30 Min. bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Nachfolgend wurde die Membran bei Raumtemperatur zweimal 15 Min. mit DIG-Puffer 2 gewaschen und 5 Min. mit DIG-Puffer 3 inkubiert, um einen für die Alkalische Phosphatase geeigneten pH-Wert von 9,5 einzustellen. Danach wurde die Membran 5 Min. in 25 ml des 1:500 verdünnten Substrats CSPD (TROPIX, PE Applied Biosystems, Langen; Verdünnung mit DIG-Puffer 3) eingelegt und anschließend in eine Folie eingeschweißt. Zur Steigerung der AP-Aktivität wurde die Membran 5 Min. bei 37 °C gelagert, dann wurde die Chemolumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilms (X-OMAT®, Kodak) für 5 Min. bis 45 Min. nachgewiesen. Der Film wurde in einem automatischen Filmentwickler (Kodak) entwickelt.

Hybridisierungslösung:

5 x SSC
0,1 % N-Lauroylsarkosin
0,02 % SDS
2 % Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)
50 % (v/v) Formamid

Blocking-Lösung: *1% Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) in DIG-Puffer 1*

DIG-Puffer 1 (Malat Puffer):

100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
mit fester NaOH auf pH 7,5

DIG-Puffer 2: *Dig-Puffer 1 mit 0,3 % Tween 20*

DIG-Puffer 3: *100 mM Tris-HCl pH 9,5*
100 mM NaCl

2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion

2.5.2.1 Amplifikation von definierten BPLF1-Genabschnitten

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäuren definierter Länge und definierter Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen dar. Man nutzt hierzu die Eigenschaften von DNA-Polymerasen aus, die einen Einzelstrang zum Doppelstrang aufpolymerisieren können, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Für die Amplifikation definierter BPLF1-Genbereiche wurden verschiedene DNA-Polymerasen (mit den entsprechenden Puffersystemen des Herstellers) eingesetzt. Als *Template* diente entweder das Cosmid cMB14 (siehe Kapitel 2.3) oder genomische DNA der Zelllinie B95-8 (siehe Kapitel 2.1.2).

Amplifikation des gesamten BPLF1-Leserahmens mit Hilfe der *Power Script-Polymerase*. Zur Klonierung des gesamten BPLF1-Leserahmens in den Vektor pCDNA3 (siehe Kapitel 2.3) wurde das BPLF1-Gen in zwei Schritten mit Hilfe der *Power Script-Polymerase* (PAN Biotech, Aidenbach) aus dem Cosmid cMB14 amplifziert. Das *Taq/Pwo*-Gemisch generiert ausreichend Fragmente mit überhängenden Adeninresten an den 3` Enden. Somit können diese PCR-Produkte schnell und effizient in TOPO TA-Vektoren kloniert werden (siehe Kapitel 2.5.1.3). Gleichzeitig besitzt diese Polymerase eine Korrekturleseeigenschaft (*proof reading*), die den Fehleinbau während der *Elongation* deutlich verringert. Für die Amplifikation des ersten Genabschnitts (BPLF1 long 5,9) wurden die Primer BPLF1 ClaI 5` und BPLF1 long2 3` eingesetzt (siehe Tabelle 2.2), für den zweiten Genabschnitt (BPLF1 long 3,8) die Primer BPLF1 long2 5` und ClaI 3`(siehe Tabelle 2.2) Der Standardansatz wurde in einem Volumen von 100 µl durchgeführt und enthielt folgende Komponenten:

10 µl	10 x PCR Puffer (PAN Biotech, Aidenbach)
10 µl	dNTPs (je 2 mM PE Applied Biosystems, Langen)
10 µl	DMSO (Endkonzentration 10 %)
20 µl	*Enhancer* (10 Min. bei 50 °C erhitzt; PAN Biotech, Aidenbach)
4 µl	$MgCl_2$ (25 mM)
1 µl	*Power-Script*-Polymerase (10 U/µl; PAN Biotech, Aidenbach)
100 pmol	5` Primer
100 pmol	3` Primer
2 µg	cMB14 -DNA
----	
ad 100 µl mit $H_2O_{bid.}$	

Die PCR-Reaktion wurde in einem *Thermocycler* 9600 (PE Applied Biosystems, Langen) durchgeführt. Das Standardprogramm lautete wie folgt:

2 Min. 94 °C	(Denaturierung des *Templates*)	
30 Sek. 95 °C	(Denaturierung des *Templates*)	35 Zyklen
1 Min. 55 °C	(*Primer Annealing*)	
4 Min. 68 °C	(*Elongation*)	
10 Min. 68 °C	(vollständige *Elongation*)	

Die gewonnenen PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, mit Hilfe des *QIAquick® Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt (siehe Kapitel 2.5.1.2) und in den TOPO TA-Vektor pCR®II-TOPO zwischenkloniert (siehe Kapitel 2.5.1.3). Die endgültige Klonierung in den Vektor pCDNA3 erfolgte wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben.

Amplifikation der BPLF1-Fragmente I bis V mit Hilfe der *Ampli Taq Gold™-Polymerase*. Die Einteilung des BPLF1-Gens in fünf überlappende Fragmente (I bis V) erlaubte die Amplifikation definierter Genbereiche zu verschiedensten Zwecken. So konnten die Fragmente I-V in die gewünschten bakteriellen Expressionsvektoren kloniert werden. Die Herstellung von RNA-Sonden für *Northern-Blot*-Analysen wurde durch die Klonierung der Fragmente I, II, 361[3] und IV in den Vektor pCR®II-TOPO ermöglicht. Als Ausgangs-DNA diente das Cosmid cMB14. Für die Amplifikation wurde die *Ampli Taq Gold™-Polymerase* (PE Applied Biosystems, Langen) verwendet. Mit dieser Polymerase konnten die besten Amplifzierungsergebnisse für das ausgesprochen GC-reiche BPLF1-Gen erzielt werden. Mögliche falsch eingebaute Nukleotide, die aufgrund des fehlenden *proof readings* der Polymerase auftraten, wurden durch Sequenzierung der amplifizierten Fragmente überprüft. Für alle BPLF1-Fragmente wurden die Reaktionen in einem Volumen von 100 µl durchgeführt und enthielten folgende Komponenten:

10 µl	PCR-Puffer II (PE Applied Biosystems, Langen)
10 µl	dNTPs (je 2 mM; PE Applied Biosystems, Langen)

[3] 361 entspricht dem amplifizierten RT-PCR-Fragment

10 µl	DMSO (Endkonzentration 10 %)
4 µl	$MgCl_2$
100 pmol	5` Primer
100 pmol	3` Primer
200 ng	cMB14 -DNA

1 µl *Ampli-Taq-Gold™*-Polymerase (5 U; PE Applied Biosystems, Langen)

---

ad 100 µl mit $H_2O_{bid.}$

Die PCR-Reaktionen wurden in einem *Thermocycler* 9600 (PE Applied Biosystems, Langen) durchgeführt. Das Standardprogramm lautete wie folgt:

2 Min. 95 °C	(Faltung der Polymerase, *Hot Start*)	
30 Sek. 95 °C	(Denaturierung des *Templates*)	10 Zyklen
1 Min. 55 °C	(*Primer Annealing*)	
2 Min. 72 °C	(*Elongation*)	
30 Sek. 95 °C	(Denaturierung des *Templates*)	25 Zyklen
1 Min. 65 °C	(*Primer Annealing*)	
2 Min. 72 °C	(*Elongation*)	
10 Min. 72 °C	(vollständige Elongation)	

Für die Amplifikation des BPLF1-Fragments I wurden die Primer bplf-I 5`/3` mit angehängter *BglII*-Schnittstelle, für die Fragmente II bis V die Primer bplf1-II 5`/3´ bis bplf1-V 5`/3` mit angehängter *BamHI*-Schnittsttelle verwendet (siehe Tabelle 2.2). Die Schnittstellen erlaubten eine direkte Klonierung der PCR-Produkte in die entsprechenden Expressionsplasmide. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, mit Hilfe des *QIAquick® Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt (siehe Kapitel 2.5.1.2), mit *BglII* bzw. *BamHI* verdaut, nochmals über ein Gel aufgereinigt und in die Klonierung eingesetzt. Das 361 bp Fragment wurde mit Hilfe der Primer 5`RT und 3`RT amplifziert und ebenso wie die BPLF1-Fragmente I, II und IV zur Herstellung von RNA-Sonden in den Vektor pCR®II-TOPO kloniert.

Amplifikation des BPLF1-cDNA-Fragments mit Hilfe der *Power Script-Polymerase*. Durch das *SMART™ PCR cDNA-Synthese System* (Clontech, Palo Alto Ca, USA) konnte ein ca. 1500 bp großes cDNA-Stück des BPLF1-Gens identifiziert und amplifziert werden

(siehe Kapitel 2.6.2). Dieses Genfragment sollte im bakteriellen Expressions-System als GST-Fusionsprotein exprimiert werden (siehe Kapitel 2.6.3.1). Die Klonierung in den Vektor pGEX2T erforderte die Amplifizierung des cDNA-Fragments aus dem Cosmid cMB14. Der Standardansatz wurde mit Hilfe der *Power Script-Polymerase* (PAN Biotech, Aidenbach) in einem Volumen von 100 µl durchgeführt und enthielt folgende Komponenten:

10 µl	10 x PCR Puffer (PAN Biotech, Aidenbach)
10 µl	dNTPs (je 2 mM, PE Applied Biosystems, Langen)
10 µl	DMSO (Endkonzentration 10 %)
20 µl	*Enhancer* (10 Min. bei 50 °C erhitzt) (PAN Biotech, Aidenbach)
4 µl	$MgCl_2$ (25 mM)
1 µl	*Power-Script*-Polymerase (10 U; PAN Biotech, Aidenbach)
100 pmol	5` Primer
100 pmol	3` Primer
3 µg	cMB14 -DNA
----	
ad 100 µl mit $H_2O_{bid.}$	

Die PCR-Reaktion wurde in einem *Thermocycler* 9600 (PE Applied Biosystems, Langen) durchgeführt. Das Standardprogramm lautete wie folgt:

2 Min. 95 °C	(Denaturierung des *Templates*)	
30 Sek. 95 °C	(Denaturierung des *Templates*)	10 Zyklen
1 Min. 55 °C	(*Primer Annealing*)	
2 Min. 68 °C	(*Elongation*)	
30 Sek. 95 °C	(Denaturierung des *Templates*)	25 Zyklen
1 Min. 65 °C	(*Primer Annealing*)	
2 Min. 68 °C	(*Elongation*)	
10 Min. 68 °C	(vollständige Elongation)	

Für die PCR wurden die Primer 5`rabbit und 3`rabbit eingesetzt, die an ihrem 5`-Ende mit einer *BamHI*-Schnittstelle versehen waren (siehe Tabelle 2.2). Diese erlaubte eine direkte Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pGEX2T. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden dazu auf einem Agarosegel aufgetrennt, mit Hilfe des *QIAquick® Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt (siehe Kapitel 2.5.1.2), mit *BamHI* verdaut, nochmals über ein Gel aufgereinigt und in die Klonierung eingesetzt.

Amplifikation der BPLF1-Fragmente rek1 bis rek4 mit Hilfe der *True-Script-Polymerase*. Bei den Fragmenten rek1 bis rek4 handelt es sich um ca. 1000 bp lange Bereiche des BPLF1-Gens, die zur Herstellung von Rekombinationsplasmiden für ein rekombinantes EBV hergestellt wurden. Für die Amplifikation dieser Genbereiche aus genomischer B95-8 DNA eignete sich besonders die *True-Script-Polymerase* der Firma PAN Biotech (Aidenbach). Als Primer wurden die in der Tabelle 2.2 beschriebenen Oligonukleotide rek1 5`/3` bis rek4 5`/3`verwendet. Die PCR-Bedingungen mussten für jedes Fragment optimiert werden und sind im folgenden genauer beschrieben:

Amplifikation von rek1, rek2 und rek3

6 µg	cMB14-DNA
10 µl	10 x PCR-Puffer (PAN Biotech, Aidenbach)
10 µl	dNTPs (je 2 mM; PE Applied Biosystems, Langen)
100 pmol	5` Primer
100 pmol	3` Primer
0,4 µl	*True-Script*-Polymerase (5 U/µl; PAN Biotech, Aidenbach)
10 µl	DMSO (Endkonzentration 10 %)
----	
ad 100 µl mit $H_2O_{bid.}$	

Reaktionsbedingungen:		Primer-Annealing-Temperaturen:		
		rek1	rek2	rek3
2 Min. 94 °C				
30 Sek. 95 °C 1 Min. x °C 1,5 Min. 72 °C	10 Zyklen	55 °C	50 °C	54 °C
30 Sek. 95 °C 1 Min. x °C 1,5 Min. 72 °C	25 Zyklen	65 °C	60 °C	64 °C
10 Min. 72 °C				

Amplifikation von rek4

6 µg cMB14-DNA

10 µl 10 x PCR-Puffer (PAN Biotech, Aidenbach)

10 µl dNTPs (je 2 mM; PE Applied Biosystems, Langen)

100 pmol 5` Primer

100 pmol 3` Primer

0,4 µl *True-Script*-Polymerase (5 U/µl; PAN Biotech Aidenbach)

10 µl DMSO (Endkonzentration (5 %)

---

ad 100 µl mit $H_2O_{bid.}$

Reaktionsbedingungen:

2 Min. 94 °C

30 Sek. 95 °C
1 Min. 52 °C
1,5 Min. 72 °C
} 10 Zyklen

30 Sek. 95 °C
1 Min. 62 °C
1,5 Min. 72 °C
} 25 Zyklen

10 Min. 72 °C

Die Amplifikation von rek 4 gelang nur bei relativ geringen *Annealing*-Temperaturen und unter Zugabe von 5 % DMSO. Dabei zeigten sich einige unspezifische Banden; eine gute Ausbeute des gesuchten PCR-Produkts konnte jedoch nur durch diese Bedingungen erreicht werden.

2.5.2.2 RT-PCR-Amplifikationen zur Überprüfung der BPLF1-RNA

Die Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) stellt eine besondere Form der Amplifizierung von Nukleinsäuren dar. Hierbei wird zunächst die RNA in DNA umgeschrieben und diese dann mittels PCR amplifziert. Die Amplifizierung der RNA lässt Aussagen über das Transkriptionsmuster der Zelle zum vorgegebenen Zeitpunkt zu.

Um Aussagen über die Aktivität des BPLF1-Gens im viralen Vermehrungszyklus treffen zu können, wurde sowohl Gesamt- als auch mRNA verschiedener induzierter und nicht induzierter EBV positiver bzw. EBV negativer Zelllinien in die RT-PCR eingesetzt. Dazu wurde die RNA wie unter 2.6.1 beschrieben präpariert und davon 5-10 µg Gesamt-RNA bzw. 0,5 –1 µg mRNA in die RT-PCR eingesetzt. Unter Zugabe des spezifischen

3`Oligonukleotids (BPLF1-3`RT, siehe Tabelle 2.3) wurde die RNA durch das Enzym *MMuLV* (Reverse Transkriptase; PE Applied Biosystems, Langen) in DNA umgeschrieben (Erststrangsynthese). Es schloß sich dann eine weitere, normale DNA-Amplifzierung unter Zugabe von *Taq*-Polymerase (PE Applied Biosystems, Langen) und spezifischem 5` Oligonukleotid (BPLF1-5`RT; siehe Tabelle 2.3) an. Zur Kontrolle, ob es sich bei der eingesetzten Matrize auch tatsächlich um RNA handelte, wurde jeder Ansatz parallel sowohl mit DNaseI als auch mit DNaseI/RNase T1 verdaut. Die Bedingungen für die RT-PCR wurden wie folgt gewählt:

Reverse Transkription (Erststrangsynthese)

2 µl	Puffer II (PE Applied Biosystems, Langen)
2 µl	dNTPs (je 2 mM; PE Applied Biosystems, Langen)
4 µl	$MgCl_2$ (25 mM)
30 pmol	3´ Oligonukleotid
x µg	Gesamt- bzw. mRNA
1 µl	DNase I (RNase frei, Ambion)
(1µl	RNase T1, 100000 U/ ml; Roche Diagnostics, Mannheim)
----	
ad 20 µl mit H_2O-DEPC	

15 Min. 37 °C (DNaseI-Verdau)

5 Min. 99 °C (Inaktivierung der DNaseI)

15 Min. 37 °C (*Primer-Annealing*)

Nach dem Verdau wurde 1 µl *MMuLV* (Reverse Transkriptase) zugegeben, 20 Min. bei 42 °C (Reverse Transkription) inkubiert und anschließend das Enzym für 5 Min. bei 99 °C inaktiviert.

PCR-Amplifizierung

Die aus RNA entstandene DNA wurde im nachfolgenden Schritt mit Hilfe der *Taq*-Polymerase amplifziert. Der Ansatz für die Amplifikation lautete:

20 µl	Erststrangsynthese
8 µl	Puffer II (PE Applied Biosystems, Langen)
4 µl	$MgCl_2$ (25 mM)
8 µl	dNTPs (je 2 mM; PE Applied Biosystems, Langen)
70 pmol	3` Oligonukleotid
100 pmol	5` Oligonukleotid
0,5 µl	*Taq*-Polymerase (2,5 U; PE Applied Biosystems, Langen)

---

ad 100 µl mit $H_2O_{bid.}$

Es folgte das PCR-Protokoll:

30 Sek. 95 °C (Denaturierung des *Templates*)

45 Sek. 55 °C (*Primer-Annealing*)

1 Min. 72 °C (*Elongation*)

10 Min. 72 °C (vollständige *Elongation*)

2.5.2.3 Sequenzspezifische DNA-Mutagenese

Zur zielgerichteten Mutation von DNA-Sequenzen wurde nach dem Protokoll des *QuikChange™-Mutagenese*-Kits von Stratagene™ (Heidelberg) verfahren. Die *QuikChange™-Mutagenese* beruht auf einer Polymerase-Kettenreaktion, die mit einem zirkulären DNA-*Template* (Plasmid) startet, das die ursprüngliche, zu mutierende Sequenz trägt. Die Mutation wird von zwei synthetischen, komplementären Primern kodiert, deren 5´- und 3´-Enden so gewählt sind, dass sie die gegenüberliegenden Stränge der DNA-Matrize im Bereich der Mutation binden können. Da die Primer gegenläufig komplementär sind, kann die DNA-Verlängerung nur an den parentalen Plasmidsträngen erfolgen, weshalb die Vermehrung nicht exponentiell, sondern nur linear verläuft. Im Verlauf der PCR werden somit zirkuläre Plasmide mit Primer-kodierten Mutationen und versetzten Einzelstrangbrüchen erzeugt. Da PCR-amplifizierte DNA im Gegensatz zu bakterieller DNA nicht methyliert wird, können durch anschließende Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* (die nur methylierte Zielsequenzen erkennt) selektiv alle methylierten und hemimethylierten Ausgangsplasmide verdaut werden. Damit werden alle Plasmide ausgeschlossen, bei denen nicht beide Stränge mutiert sind. Voraussetzung ist, dass das Ausgangsplasmid einem *dam*-Methylase positivem Bakterienstamm entstammt. Nach Transformation eines geeigneten, kompetenten Bakterienstammes (XL1 Blue; Kitbestandteil) mit dem neuen, mutierten Plasmid (nach Angaben des Herstellers), erfolgt

die Reparatur der Einzelstrangbrüche. Die Gestaltung der Primer-Sequenzen (siehe Tabelle 2.3) und Durchführung der Mutagenese erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.6 Spezielle Methoden

2.6.1 Northernblot Analysen

Die Northernblot-Technik erlaubt auf relativ einfache Weise eine qualitative und quantitative Bestimmung einzelner RNA-Moleküle in RNA-Gemischen, sowie deren genaue Identifikation. Bei diesem Verfahren wird die RNA nach elektrophoretischer Auftrennung aus der Gelmatrix auf eine Zellulose-Membran übertragen und dort immobilisiert. Das ursprünglich im Gel enthaltene Trennmuster der Moleküle bleibt nach der Übertragung erhalten, so dass man eine exakte Replik des ursprünglichen Gels erhält. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgt unter alkalischen Bedingungen, wobei es zu einer vollständigen Denaturierung und einer partiellen Hydrolyse der RNA kommt. So entstandene kleinere RNA-Fragmente können leichter auf die Träger-Membran übertragen werden. Der Nachweis spezifischer RNA-Moleküle erfolgt durch Hybridisierung der Membran mit einer geeigneten, markierten Gensonde. Im Falle von BPLF1 dienten dazu in *antisense*-orientierte, *in vitro* transkribierte und radioaktiv markierte RNA-Sonden. Enthält eine RNA-Population die gesuchte Sequenz, so wird diese nach Autoradiographie des hybridisierten Filters als Bande sichtbar. In den folgenden Abschnitten sind die einzelnen Arbeitsschritte zur Durchführung einer Northern-Blot-Analyse genauer beschrieben.

Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe des *TRI-REAGENT™*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für Northernblot-Analysen sowohl Gesamt-RNA als auch mRNA (s.u.) aus verschiedensten EBV-positiven und EBV-negativen Zelllinien verwendet. (siehe dazu Kapitel 2.1.2). Für die Präparation wurden jeweils ca. $2x10^7$ Zellen eingesetzt und daraus Gesamt-RNA mit Hilfe der TRI-REAGENT™-Lösung nach Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich Firmengruppe, Deisenhofen) isoliert. Das Reagent erlaubt die simultane Aufreinigung von RNA, DNA und Protein. Mit dieser Methode konnten erfolgreich Mengen zwischen 100 µg und 150 µg Gesamt-RNA erzielt werden. Die Nukleinsäuren konnten sofort sowohl in Northern-Blot-Analysen als auch in RT-PCR-Reaktionen eingesetzt werden. Die RNA wurde in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und konnte unter Zugabe des RNase-Inhibitors rRNAsin (40 U, Promega, Madison WI, USA) und DTT (300 mM) bei –80 °C für max. 6 Monate aufbewahrt werden.

Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC)-behandeltes Wasser:

DEPC (Sigma Aldrich Firmengruppe, Deisenhofen)

1:1000 in Wasser verdünnen
unter ständigem Rühren über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren
Autoklavieren zur vollständigen Zerstörung des DEPC

Isolierung von mRNA mittels *MACS-mRNA Isolation Kit*. Der *MACS-mRNA Isolation Kit* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) erlaubt die Aufreinigung poly-adenylierter mRNAs aus Zellen oder Geweben. Das Prinzip der Reinigung beruht auf einer spezifischen Bindung von magnetischen *MACS Oligo (dT) MicroBeads* an das poly A-Ende verschiedenster mRNAs. Die Aufreinigung selbst erfolgt in einem magnetischen Feld, wodurch die spezifisch markierten mRNAs zurückgehalten werden, während Gesamt-RNA und andere Zellbestandteile in mehreren Waschschritten entfernt werden. Letztendlich erfolgt die Elution der mRNA von den *MicroBeads*.

Für die Aufreinigung wurden ca. $1x10^7$ bis $5x10^7$ Zellen geerntet (siehe Kapitel 2.1.2) und mit Hilfe eines *Lysis/Binding* Puffers lysiert. Um die Viskosität des Zell-Lysates zu verringern wurde dieses zunächst 3-4 mal durch eine Spritze gedrückt und anschließend über eine sogenannte *Large Scale Lysate Clear Column* zentrifugiert. Das so erhaltene klare Lysat wurde mit den *MACS Oligo (dT) MicroBeads* versetzt und über eine spezielle Säule (MACS Column Type M) innerhalb eines magnetischen Feldes aufgereinigt. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution der mRNA von den *MicroBeads* im magnetischen Feld mit einem auf 65 °C erwärmten Elutionspuffer oder RNase-freiem, DEPC behandeltem Wasser.

Um die so erhaltene RNA weiter aufzukonzentrieren, wurde ein Fällungsschritt mit 0,1 Volumen 3 M Natrium-Acetat pH 5,2, drei Volumen $Ethanol_{absolut}$ und 20 µg Glycogen für 1 h bei –80 °C angeschlossen. Die so erhaltene mRNA konnte direkt in Northernblot-Analysen oder RT-PCR-Reaktionen eingesetzt werden. Aus $5x10^7$ Zellen wurden ca. 10 bis 20 µg mRNA isoliert.

Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese. Die Auftrennung von Gesamt- und mRNA erfolgte in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen nach einer Methode von Sambrook (Sambrook *et al*., 1989) Durch die alkalischen Bedingungen war eine vollständige Denaturierung und eine partielle Hydrolyse, vor allem sehr großer RNA-Moleküle, gewährleistet. Letztere erleichterte mitunter deren spätere Übertragung auf die Träger-Membran. Für das Gel (150 ml) wurden 1,6 g Agarose (*SeaKem® LE* Agarose; FMC BioProducts, Rockland, Maine USA) mit 99 ml H_2O-DEPC und 32 ml 5x MOPS-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung der Gel-Lösung auf ca. 55 °C wurden 28 ml einer 37 %igen Formaldehydlösung (Sigma-Aldrich Firmengruppe, Deisenhofen) zugegeben und das Gel zügig gegossen. Der Gellauf wurde in einer Horizontal-Gelelektrophorese-Apparatur (Hölzl, Dorfen) mit einer Laufstrecke von 16 cm in 1 x MOPS-Puffer für ca. 3 h bei 10 V/cm durchgeführt.

Da RNA-Moleküle die Eigenschaft besitzen, starke Sekundärstrukturen auszubilden, musste die RNA vor der Auftragung auf das Gel folgendermaßen behandelt werden: Ca. 5-20 µg Gesamt-RNA bzw. 1- 10 µg mRNA (max. 15 µl) wurden mit 2 Volumen (max. 30 µl) RNA-Probenpuffer versetzt und für 5 Min. auf 65 °C erhitzt. Nach einer kurzen Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurden 2 µl RNA-Auftragspuffer und 0,5 µl Ethidiumbromid zugegeben und diese auf das Gel aufgetragen. Um später Aussagen über die Größe der gesuchten RNA treffen zu können, wurde ein RNA-Standard mit auf das Gel aufgetragen. Der RNA-Standard (0,2- 10 kb; Sigma-Aldrich Firmengruppe, Deisenhofen) bestand aus einer Mixtur von 9 verschiedenen RNA-Standards mit einem Größenbereich von 200 bis 10000 Nukleotiden.

5x MOPS-Puffer: *40 mM Natriumacetat*
0,1 M MOPS pH 7,0
0,5 mM EDTA pH 8,0

RNA-Probenpuffer:

65 % Formamid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
25 % 37 %-Formaldehyd (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
1 x MOPS-Puffer
in 500µl Aliquots bei -20°C wegfrieren

RNA-Auftragspuffer:

50 % Glycerin
1 mM EDTA
0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol

Northernblot mittels Kapillar-Blot. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die RNA-Moleküle aus der Gelmatrix mittels Kapillar-Blot auf eine Nylon-Membran übertragen und dort immobilisiert. Das ursprünglich im Gel enthaltene Trennmuster bleibt nach der Übertragung erhalten, so dass man eine exakte Kopie des ursprünglichen Gels erhält.

Um die Effizienz der Übertragung vor allem großer RNA-Moleküle zu erhöhen, wurden die zu transferierenden Nukleinsäuren vor dem *Blotting* durch Säurebehandlung der Gelmatrix *in situ* fragmentiert. Dazu wurde das Gel zunächst für 1 h in DEPC behandeltem Wasser bei Raumtemperatur geschwenkt, um das Formaldehyd zu entfernen. Anschließend erfolgten zwei je 30 minütige Waschschritte bei Raumtemperatur mit Denaturierungs- und Neutralisierungslösung. Letztendlich wurde das Gel zur Vorbereitung auf das *Blottin*g für 45 Min. in 20 x SSC geschüttelt.

Beim Kapillar-Transfer liegt das Gel auf einem Saugpapier (Whatman®-Papier, Whatman International, Maidstone, England), das in die Transferlösung (20 x SSC) eintaucht. Über dem Gel liegen die Transfermembran (positiv geladene Nylon-Membran; BIODYNE® PLUS MEMBRANE; PALL Gelman Laboratory, Dreieich) und Schichten von trockenen Saugpapierlagen. Der ganze Aufbau wurde durch eine Glasplatte und ein Gewicht beschwert. Das in das Pufferreservoir eintauchende Saugpapier sorgte für einen ständigen Flüssigkeitsstrom, der durch die Saugpapierlagen aufrecht erhalten wurde. Durch den Flüssigkeitsstrom wurden über Nacht die Nukleinsäure-Moleküle aus dem Gel auf die Transfermembran übertragen. Zur Fixierung der RNA auf dem Filter wurde eine UV-Bestrahlung durchgeführt (*Auto Crosslink* im UV Stratalinker™ 2400; Stratagene™, Heidelberg). Die Nukleinsäuren wurden hierbei durch Reaktion zwischen den durch UV-Licht aktivierten Thymin- oder Uracil-Resten und den primären Amin-Gruppen der Nylon-Matrix kovalent an den Nylon-Filter gebunden. Eine anschließende Methylenblau-Färbung der Membran diente zur Überprüfung des Transfers. Dazu wurde der Filter zunächst für ca. 30 Sek. in der Methylenblau-Färbelösung bei Raumtemperatur geschwenkt und daraufhin für ca. 4 Min. in destilliertem Wasser wieder entfärbt. Neben den übertragenen RNAs

konnte somit auch der RNA-Standard sichtbar gemacht und für die Auswertung nach der Hybridisierung markiert werden.

Denaturierungslösung:

0,05 M NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung:

0,5 M Tris pH 7,4
1,5 M NaCl

20x SSC: *3 M Natriumchlorid*
0,3 M Natriumcitrat

Methylenblau-Färbelösung: *0,03% (w/v) in 0,3 M Natriumacetat pH 5,2*

In vitro-Transkription und radioaktive Markierung von RNA-Sonden. Die auf der Transfermembran befindlichen Nukleinsäuren wurden durch Nukleinsäure-Hybridisierung und anschließender Autoradiographie nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vitro*-transkribierte RNA-Sonden hergestellt, welche in *Antisense* zur eigentlichen mRNA des BPLF1-Gens orientiert waren. Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit dem *Riboprobe® in vitro Transcription System Sp6/T7* der Firma Promega (Madison WI, USA). Dieses System erlaubte die Herstellung hochspezifischer einzelsträngiger, radioaktiv markierter RNA-Sonden.

Ausgehend von einer Plasmid-DNA, die als Matrize diente, kam es durch die Sp6 bzw. T7-Polymerase zur Transkription einer weitgehend homogenen RNA-Population. Durch die Linearisierung des Plasmids entstanden sogenannte „*run-off*"-Transkripte, wodurch gewährleistet war, dass die transkribierten RNAs frei von jeglicher Vektor-Sequenz waren. Die Tabelle 2.5 zeigt neben den verwendeten Ausgangsplasmiden auch die Restriktionsenzyme, die zur Linearisierung verwendet wurden und die jeweilige für die *in vitro* Transkription verwendete Polymerase. Nach der Linearisierung wurde die Plasmid-DNA nochmals über ein Agarosegel mit Hilfe des *QIAquick®-Gel-Extraction-Kits* (Qiagen, Hilden; siehe Kapitel 2.5.1.2) aufgereinigt. Die Aufreinigung war notwendig, da eine unvollständige Linearisierung zur Folge gehabt hätte, dass sehr lange Transkripte entstehen, in die unspezifisch eine große Menge an radioaktiv markierten Nukleotiden eingebaut würden. Ca. 1 µg der so vorbereiteten Plasmide konnte in die *in vitro*-Transkription eingesetzt werden.

Tabelle 2.5 Übersicht über die in vitro *transkribierten RNA-Sonden zur Detektion der BPLF1-RNA*

Bezeichnung der Sonde	Ausgangs-Plasmid	Restriktionsenzym zur Linearisierung	Polymerase	Transkriptgröße
BPLF1-I	pCRII-TOPO-BPLF1-Frg.I	SpeI	T7	ca. 2057 bp
BPLF1-II	pCRII-TOPO-BPLF1-Frg.II	XbaI	Sp6	ca. 2034 bp
BPLF1-361	pCRII-TOPO-BPLF1-361 Frg.	XbaI	Sp6	ca. 361 bp
BPLF1-IV	PCRII-TOPO-BPLF1-Frg.IV	SpeI	T7	ca 1772 bp

Für einen Standard Transkriptions-Ansatz wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert:

Transcription Optimized 5x Buffer	4 µl
DTT (100 mM)	2 µl
rRNAsin® Ribonuklease-Inhibitor (20 U)	0,5 µl
rATP, rGTP und rUTP (je 2,5 mM)	x µl
100 µM rCTP	x µl
linearisierte Plasmid-DNA (1 µg)	x µl
[α-^{32}P] rCTP (50 µCi/µl)	5 µl
Sp6 bzw. T7-Polymerase (15-20 U)	1 µl

Endvolumen	20µl

Nach 1 h wurde zu dem Ansatz 1 µl RQ1 RNase-freie DNase (1 U/µl; Promega, Madison WI, USA) zugegeben und für 15 Min. bei 37 °C die *Template*-DNA verdaut. Bevor die *in vitro*-transkribierte RNA-Sonde nun als Hybridisierungssonde eingesetzt werden konnte, mußten nicht-inkorporierte Nukleotide entfernt werden. Dazu wurde die RNA-Sonde über ein Gelfiltrations-Säulchen (*CENTRI·SPIN™-20 Spin columns*; PRINCETON SEPARATIONS, Adelphia, USA) nach Angaben des Herstellers zentrifugiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden in der Matrix zurückgehalten, die aufgereinigte RNA-Sonde konnte direkt in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

Radioaktivität: *1 x 9,25 MBq 5`[α-^{32}P] rCTP*
(Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg)

Transcription Optimized 5x Buffer:

200 mM Tris-HCl pH 7,9
30 mM $MgCl_2$
10 mM Spermidin
50 mM NaCl

Hybridisierung und Entwicklung. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde der Blot für mindestens 4 h prähybridisiert. Dazu wurde die Northernblot-Membran in ein Glas-Hybridisierungsröhrchen eingeführt und mit ca. 5 ml SSPE-Hybridisierungspuffer benetzt. Die Prähybridisierung erfolgte bei 55 °C. Zu den 5 ml Prähybridisierungs-Lösung wurden 5-20 µl der radioaktiv markierten und denaturierten RNA-Sonde zugegeben (ca. $1x10^6$ cpm; 5 Min. 95 °C in 500 µl Hybridisierungslösung) und über Nacht bei 60 °C im Hybridisierungsofen hybridisiert. Am folgenden Tag wurde die hybridisierte Membran einmal für 5 Min. bei Raumtemperatur mit dem Puffer *WashI* und zweimal für weitere 15 Min. bei 65°C mit *WashII* gewaschen. Anschließend wurde die Membran in eine Folie eingeschweißt und für 12 bis 24 h mit einem X-OMAT® Röntgenfilm (Kodak,) bei –80 °C exponiert. Die Entwicklung erfolgte in einem automatischen Filmentwickler (Kodak).

20x SSPE-Puffer: *3,6 M Na Cl*
0,2 M Na2HPO$_4$ pH 7,7
2 mM EDTA

SSPE-Hybridisierungspuffer:

5 x 20x SSPE
50 % Formamid
5 x Denhardt-Reagenz
0,5 % SDS
20 mg tRNA (aus Bäckerhefe,Roche Diagnostics, Mannheim)
ad 50 ml mit H_2O-DEPC

100 x Denhardt-Reagenz : 2 % Ficoll
2% Polyvinylpyrolidon
2 % BSA
ad 100 ml mit DEPC-Wasser

WashI: *2x SSC*
0,1% SDS

WashII: *0,1x SSC*
0,1% SDS

2.6.2 Herstellung von cDNA mittels *SMART™PCR cDNA-Synthese Systems*

Basierend auf einer reversen Transkription und anschließender PCR-Amplifikation kann mit Hilfe des *SMART™PCR cDNA-Synthese Systems* der Firma Clontech (Palo Alto, CA, USA) aus geringsten Mengen Gesamt- oder PolyA$^+$-RNA hoch qualitative cDNA hergestellt werden. Die Besonderheit des Systems liegt darin, dass in erster Linie Vollänge-cDNAs angereichert werden. Abbildung 3.8 in Kapitel 3.1.3 zeigt schematisch das Prinzip des Systems.

Für die Herstellung der BPLF1-cDNA wurde das Protokoll des Herstellers in einigen Punkten variiert. Um eine Umschreibung und Amplifikation der ausgesprochen GC-reichen und langen BPLF1-RNA (9,4 kb) zu erzielen, wurde das Experiment auf folgende Art und Weise durchgeführt. Als Ausgansgmaterial für die Erststrang-Synthese wurde Gesamt- und mRNA aus induzierten P3HR1/16 –Zellen verwendet (siehe Kapitel 2.1.2 und 2.4.2). Die RNAs wurden dazu wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben aufgereinigt. Für die reverse Transkription wurden ca. 5 µg Gesamt-RNA und 0,5 µg mRNA eingesetzt. Anstelle des vom Hersteller angegeben CDS-Primers wurde ein genspezifscher Primer (3`RT; siehe Tabelle 2.3) verwendet. Als zweites Oligonukleotid für die reverse Transkription wurde der Primer SMART II (siehe Tabelle 2.3) verwendet. In einem sterilen 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge zugegeben, gemischt und kurz abzentrifugiert:

1-3 µl	RNA
1 µl	3`RT-Primer (10 µM)
1 µl	SMART II Oligonukleotid (10 µM)
x µl	DEPC-Wasser
----	
5 µl	Gesamtvolumen

Nach einer 2 minütigen Inkubation des Ansatzes bei 72 °C wurde das Reaktionsgefäß sofort für 2 Min. auf Eis abgekühlt und nochmals kurz abzentrifugiert. Anschliessend erfolgte die Zugabe von

2 µl	5 x *First-Strand* Puffer
1 µl	DTT (20 mM)
1 µl	50x dNTP (10 mM)
1 µl	*Superscript II* Reverse Transkriptase (200 U/µl; Gibco Life Technologies)

Die reverse Transkription erfolgte bei 50 °C für 1 h. Durch Überführung des Reaktionsgefäßes auf Eis, wurde die Reaktion abgestoppt. Die so erhaltene einzelsträngige cDNA konnte entweder sofort in die PCR-Amplifikation eingesetzt oder bei –20 °C für bis zu 3 Monaten aufbewahrt werden.

5x First-Strand Puffer:

250 mM Tris HCl pH 8,3
375 mM KCl
30 mM $MgCl_2$

Vorversuche hatten gezeigt, daß sich die BPLF1-RNA ausgesprochen schwer revers transkribieren und in einer PCR amplifzieren ließ. Deshalb wurde für die anschließende PCR-Amplifikation der cDNA nicht die im Kit mitgelieferte *Advantage-Polymerase* verwendet, sondern das *Expand-long PCR-System* der Firma Roche Diagnostics (Mannheim). Dafür wurden zunächst zwei getrennte Master-Mixe hergestellt:

Master Mix I		Master Mix II	
5 µl	Wasser	17,5 µl	Wasser
12 µl	dNTPs (je2 mM)	1 µl	DMSO
1 µl	3`RT-Primer (10 µM)	5 µl	Puffer 3
5 µl	cDNA	1,5 µl	$MgCl_2$ (25 mM)
		0,5 µl	*Expand long* Polymerase
----		-----	
25 µl	Gesamtvolumen	25 µl	Gesamtvolumen

Die beiden Master-Mixe wurden vereinigt und in eine PCR-Amplifikation unter folgenden Bedingungen eingesetzt:

2 Min. 94 °C
30 Sek. 95 °C
1 Min. 57 °C } 35 Zyklen
4 Min. 68 °C
10 Min. 68 °C

Die so erhaltene doppelsträngige (ds) cDNA sollte hinterher mittels *TA-Cloning* (siehe Kapitel 2.5.1.3) in den Vektor pCR®II-TOPO kloniert werden. Da jedoch das *Expand long-Polymerase*-Gemisch auch ein *proof-reading-Enz*ym enthielt, besaßen die amplifizierten DNA-Fragmente keinen Adenin-Rest an ihrem 3`-Ende. Deshalb wurde vor der Klonierung in den pCR®II-TOPO-Vektor eine *tailing*-Reaktion durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.1.3).

2.6.3 Expression und Analyse von Proteinen

Zum Nachweis und zur Herstellung von Antikörpern gegen das BPLF1-Protein wurden definierte Fragmente des Gens als GST-Fusionsproteine[4] in TOPP3-Bakterien exprimiert und mittels Affinitätschromatographie und *Prep Cell Page®* aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteinfragmente wurden sowohl in Westernblot-Analysen (siehe Kapitel 2.6.3.2) als auch zur Herstellung von BPLF1-spezifischen Antikörpern verwendet (siehe Kapitel 2.6.4).

2.6.3.1 Expression und Aufreinigung von BPLF1-GST-Fusionsproteinen

Expressionsvektor pGEX2T. Für die Expression der GST-Fusionsproteine wurde der Vektor pGEX2T verwendet. Die genauen Eigenschaften des Vektors sind in Kapitel 2.3 und im Anhang A.4 beschrieben. Das Expressionsplasmid wurde entweder ohne Fremdgen als Negativkontrolle bzw. zur Absättigung von Humanseren eingesetzt (siehe Kapitel 2.6.3.3) oder enthielt verschiedene Abschnitte des BPLF1-Gens, die über die multiple Klonierungsstelle eingesetzt worden waren (siehe Kapitel 3.2.2, 3.2.3 und Anhang A.6). Um später den GST-Anteil von dem exprimierten Protein entfernen zu können, wurde darauf geachtet, die Fremd-DNA im Leseraster mit der im Vektor vorhandenen Thrombin-Spaltstelle zu klonieren .

Induktion der Protein-Synthese durch IPTG. Eine Übernachtkultur (100 ml) des Expressionsvektors pGEX2T in TOPP3 Bakterien (siehe Kapitel 2.1.1) bzw. des rekombinanten pGEX2T-Vektors mit BPLF1 spezifischen Fragmenten in TOPP3 Bakterien wurde 1:10 mit vorgewärmtem LB_{amp}-Medium (LB_0-Medium mit Ampicillin, Endkonzentration 50 µg/ml) verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 in einem Bakterienschüttler bei 220 Upm geschüttelt. Die Fremdproteinsynthese wurde durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG, peQLab Biotechnologie, Erlangen) induziert, welches den *lac*-Repressor inaktiviert. Nach einer vierstündigen Induktion bei 25°C (um die Aktivität von Proteasen herabzusetzen), wurden die Bakterien geerntet und fortan auf Eis bzw. 4°C mit den entsprechenden, gekühlten Reagenzien weiterbehandelt.

LB_0-Medium: *5 g Bacto-Trypton (Difco, Detroit, USA)*
5 g Bacto-Yeast Extract (Difco, Detroit, USA)
5 g NaCL (Roche Diagnostics, Mannheim)
ad 1l in H_2O_{bid}, pH 7,3

Ampicillin: *100 mg/ml in 70% ETOH (1:1000 in LB)*

[4] GST: Glutathion S-Transferase

Ernte und Lyse der induzierten TOPP3-Bakterien. Durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 5000 Upm und 4 °C in einer Centricon T-124-Zentrifuge (Kontron Instruments) wurden die induzierten Bakterien geerntet. Es folgte ein Waschschritt mit ca. 200 ml eiskaltem STE-Puffer und einer zweiten 10 minütigen Zentrifugation. Der so erhaltene Niederschlag wurde in 75 ml STE-Puffer mit 1 ml Lysozym (10 mg/ml) resuspendiert und 15 Min. auf Eis inkubiert. (An dieser Stelle konnte der resuspendierte Niederschlag auch in flüssigem Stickstoff schockgefroren, für einige Wochen bei –80 °C gelagert und anschließend nach Protokoll weiterverarbeitet werden. Die Experimente zeigten jedoch, dass dies nur in Ausnahmefällen geschehen sollte). Nach der Lysozym-Behandlung wurde die Bakteriensuspension sonifiziert, um eine vollständige Lyse zu gewährleisten. Dazu wurden zunächst 0,5 ml einer 1 M DTT-Lösung (Endkonzentration 5 mM) zugegeben. Die Zugabe des DTTs sollte unmittelbar nach der Lysozym-Behandlung erfolgen. Somit konnte die spätere Bindung des exprimierten Fusionsproteins an die Gelmatrix, die zur Aufreinigung verwendet wurde, erhöht werden. Vor der Sonifizierung wurden dann noch 10 ml einer 10 %igen Sarkosyl-Lösung zugegeben und die Suspension für 10 Sek. gevortext. Nach der Zugabe der DTT- und der Sarkosyl-Lösung wurde die Ultraschall-Behandlung in einem Becherresonanz-Bad (Labsonic® U-Gerät, Braun, Melsungen; 1 Min., 50 %, power level 8) durchgeführt. Dabei wurde explizit auf eine Beschallung mit der Nadelsonde verzichtet, um eine Denaturierung des Proteins zu vermeiden. Das so erhaltene Gesamt-Lysat (*total lysat*) wurde daraufhin für 15 Min. bei 17000 Upm und 4 °C in der Centricon T-124-Zentrifuge (Kontron Instruments) abzentrifugiert. Der so gewonnene Überstand enthielt das exprimierte Fusionsprotein in löslicher Form und konnte in die Aufreinigung eingesetzt werden.

1 M DTT: *3,09 g DTT in 20 ml 0,01 M NaAc pH 5,5*
Aufbewahrung in 1 ml Aliquots bei -20°C (steril filtriert)

STE-Puffer: *10 mM Tris pH 8,0*
150 mM NaCl
1 mM EDTA

Lysozym: *10 mg/ml in Tris pH 8,0*
Aufbewahrung bei –20°C (steril filtriert)

10% Sarkosyl: *5 g Sarkosyl in 50 ml STE-Puffer*
Aufbewahrung bei Raumtemperatur (steril filtriert)

Affinitätsreinigung der exprimierten Fusionsproteine mit Hilfe der Glutathione Sepharose®4B. Die Aufreinigung der exprimierten Fusionsproteine aus dem Bakterienlysat erfolgte über eine Affinitätschromatographie mit Hilfe der *Glutathion Sepharose 4B®* (Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg). Vom Hersteller wurde die Gelmatrix in Form einer 75 %igen Matrix-Ethanol Mischung (75 % *slurry*) geliefert. Für die Aufreinigung musste zunächst eine 50 %ige Mischung hergestellt werden. Dazu wurden 1,33 ml der Original-Suspension für 5 Min. bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Matrix mit 10 ml eiskaltem PBS_{ohne} gewaschen.

Nach einer zweiten Zentrifugation wurde die so erhaltene Gelmatrix (= 1 ml *bed volume*) in 1 ml PBS_{ohne} aufgenommen (50 % *slurry*). 1 ml Gelmatrix bindet ca. 5 mg GST-Fusionsprotein.

Das vorbereitete Matrix-PBS-Gemisch (50 % *slurry*) wurde nun mit den Überständen, die das lösliche Protein enthielten (siehe oben), vereinigt und für 45 Min. bei 4°C auf dem Überkopfschüttler gemischt. Nach dieser Inkubation wurde die Gelmatrix 10 Min. bei 4 °C und 500 x g abzentrifugiert. Der Überstand, der nichtgebundene Proteine enthielt, wurde verworfen und die Matrix dreimal mit eiskaltem PBS_{ohne} gewaschen (5 Min. Überkopfschüttler bei 4 °C und 5 Min. Zentrifugation bei 4 °C und 500 x g). Die so erhaltene Matrix konnte dann auf unterschiedlichste Art und Weise weiterverarbeitet werden. Die vom Hersteller empfohlene Elution des Proteins von der Matrix mit Hilfe eines Glutathion-haltigen Puffers wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Für eine weitere Aufreinigung des Proteins in einer *Prep-Cell Page®* wurde die Gelmatrix mit 1 ml 2 x SDS-Auftragspuffer vermischt, für 5 Min. bei 95 °C aufgekocht und kurz abzentrifugiert. Der so erhaltene Überstand enthielt das von der Matrix eluierte Protein und konnte in die *Prep-Cell*-Aufreinigung eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit war die Abspaltung des Proteins von der Matrix durch eine Thrombin Protease (siehe unten).

PBS $_{ohne}$: *140 mM NaCl*
2,7 mM KCl
10 mM Na_2HPO_4
1,8 mM KH_2PO_4 pH 7,4

Aufreinigung der vorgereinigten Fusionsproteine über *Prep-Cell Page®*. Für die Reinigung der Proteine über SDS-Polyacrylamidgele wurde das *Prep-Cell-Page®*-System der Firma Bio-Rad Laboratories (Richmond, USA) verwendet. Der Aufbau der Apparatur erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde in eine Säule (Durchmesser 28 mm) ein 6,5 cm langes Trenngel (siehe Tabelle 2.6) gegossen und über Nacht auspolymerisiert. Die optimale Gelkonzentration wurde in Vorversuchen in Minigelapparaturen (Biometra, Göttingen) abgeschätzt. Für die Reinigung der BPLF1-Protein-Fragmente wurde ein 10 %iges Gel angefertigt. Am folgenden Tag wurde ein 1,5 cm langes Sammelgel (siehe Tabelle 2.6) gegossen und nach dem Auspolymerisieren die vorgereinigten Proteinfraktionen aus der Affinitäts-Reinigung in maximal 2 ml SDS-Auftragspuffer aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter ständigem Kühlen bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA und variabler Spannung in SDS-Laufpuffer. Nach dem Durchlauf des im Auftragspuffer enthaltenen Bromphenolblaus, wurden 2 ml Fraktionen gesammelt (Flußrate: 2 ml/10 Min.). Der gesamte *Prep-Cell®*-Lauf wurde über Nacht durchgeführt. Das gewonnene Protein ließ sich durch Auftrag auf ein SDS-Gel und Silberfärbung überprüfen (siehe Kapitel 2.6.3.2).

Tabelle 2.6 Zusammensetzung der Trenngellösung und Sammelgellösung für Prep-Cell-Page®

	Trenngellösung (10%)	Sammelgellösung
Protogel™, reinst (30% (w/v) Acrylamid, 0,8%(w/v) Bisacrylamid-Lösung (37,5:1); ULTRA PURE Proto-Gel; National Diagnostics, Biozym, Oldendorf)	6,7 ml	0,7 ml
Trenngelpuffer 4x (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	5,0 ml	
Sammelgelpuffer 4x(0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)		1,25 ml
Wasser	8,3 ml	3,0 ml
TEMED (N,N,N`,N`-Tetramethyl-Ethylendiamin, Sigma Aldrich Firmengruppe)	8 µl	10 µl
10% Ammoniumperoxodisulfat	100 µl	50 µl

2x SDS Auftragspuffer:

125 mM Tris
2 % SDS
10 % ß-Mercaptoethanol
10 % Glycerin
1 mM EDTA
0,005 % Bromphenolblau
ad 100 ml, pH 6,8

SDS-Laufpuffer: *25 mM Tris-HCl pH 8,5*
0,192 M Glycin
0,1 % SDS

Abspaltung des GST-Anteils von den Fusionsproteinen mit Hilfe einer Thrombin Protease. Die Verwendung des Expressionsvektors pGEX2T ermöglichte die Abspaltung des GST-Anteils von dem exprimierten Protein unmittelbar an der Gelmatrix. Dazu wurde die Gelmatrix nach dem letzten Waschschritt der Aufreinigung (siehe oben) in gleichem Volumen PBS_{ohne} resuspendiert (50 % *slurry*). 80 µl der Thrombin Protease-Lösung wurden mit 920 µl PBS_{ohne} vermischt und zu der Gelmatrix pipettiert. Die Abspaltung erfolgte bei Raumtemperatur für 10, 30, 60 und 120 Min. unter ständigem Schütteln, so dass sich die Matrix nicht absetzen konnte. Nach den angegebenen Zeiten wurden jeweils 200 µl von dem Ansatz entnommen und kurz bei 500 x g für 5 Min. abzentrifugiert. Der Überstand enthielt das abgespaltene Protein. Der Erfolg der Abspaltung wurde auf einem Silbergel überprüft (siehe Kapitel 2.6.3.2). Dazu wurden je 20 µl Überstand und je 20 µl Gelmatrix mit gleichem Volumen 2 x SDS-Auftragspuffer versetzt und auf ein 10 % Gel aufgetragen.

Thrombin Protease: 1 Unit / µl in PBS_{ohne} (Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg,)
Aufbewahrung bei –80°C

2.6.3.2 Proteinnachweis

Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE. Bei der *Sodium-Dodecylsulfat*-Polyacrylamidgelelektrophorese (*SDS-Page*) werden Proteine 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 positive Ladungen in einer Weise, dass alle Proteine ihrer Größe entsprechend zur Anode wandern. Nach einer Methode von Laemmli (1970) werden die Probenproteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das eigentliche, höherprozentige Trenngel ein.

Für die *SDS-PAGE* wurden die Midigelapparaturen der Firma Biometra (Göttingen) verwendet. Die Gellösungen wurden wie in Tabelle 2.7 beschrieben angefertigt. Dabei erfolgte die Auftrennung der BPLF1-Proteinfragmente und der Proteine der eukaryotischen Zellen (zur Detektion von EBNA2 und Zta) in einem 10 %igen Gel. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem gleichen Volumen des 2x SDS-Auftragspuffer versetzt und 5 Min. im Heizblock bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte im SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA und variabler Spannung. Das Ende der Elektrophorese wurde durch das Auslaufen der Bromphenolblau-Bande angezeigt. Zur Abschätzung der Größen wurde der Standard *Benchmark* (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) verwendet.

2x SDS Auftragspuffer:

125 mM Tris
2 % SDS
10 % ß-Mercaptoethanol
10 % Glycerin
1 mM EDTA
0,005 % Bromphenolblau
ad 100 ml, pH 6,8

SDS-Laufpuffer: *25 mM Tris-HCl pH 8,5*
0,192 M Glycin
0,1 % SDS

Tabelle 2.7 Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen für SDS-Page

	Trenngellösung 10%	Trenngellösung 12,5%	Sammelgellösung
Protogel™, reinst (30% (w/v) Acrylamid, 0,8%(w/v) Bisacrylamid-Lösung (37,5:1); ULTRA PURE Proto-Gel; National Diagnostics, Biozym, Oldendorf	6 ml	7,5 ml	0,99 ml
1,88 M Tris-HCl pH 8,8	3,6 ml	3,6 ml	
0,625 M Tris-HCl pH 6,8			1,2 ml
0,5 % SDS	3,6 ml	3,6 ml	1,2 ml
Wasser	4,8 ml	3,3 ml	2,61 ml
TEMED (N,N,N`,N`-Tetramethyl-Ethylendiamin, Sigma Aldrich Firmengruppe)	15 µl	15 µl	6 µl
10 % Ammoniumperoxodisulfat	90 µl	90 µl	30 µl

Färbung der Proteinbanden mit *Coomassie Brilliant Blue*. Mit dem Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* können Proteinmengen von mehr als 1 µg gut reproduzierbar angefärbt werden. Allerdings hängt die Menge an gebundenem Farbstoff vor allem von dem Gehalt an basischen Aminosäuren ab. Für die Anfärbung der aufgetrennten Proteine mit *Coomassie Brilliant Blue* wurden die Proteingele nach der *SDS-PAGE* mindestens 30 Min. bei Raumtemperatur in der *Coomassie*-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Gele über Nacht in der Entfärbelösung solange leicht geschüttelt, bis der Hintergrund klar und nur noch die Proteinbanden blau waren. Zur Konservierung wurden die Gele in einer Geltrocknungs-Apparatur (Invitrogen, Groningen, Niederlande) zwischen zwei durchsichtigen Plastikfolien (*Dry Ease™ Mini Cellophane*) bei Raumtemperatur getrocknet.

Coomassie-Färbelösung:

45 %Methanol
10 % Essigsäure
0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250

Entfärbelösung: *45 % Methanol*
10 % Essigsäure

Gel-Trockenlösung:1x Gel-Dry™Drying Solution (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Färbung der Proteinbanden mit Silbersalzen. Während bei der oben beschriebenen Färbung mit *Coomassie Brilliant Blue* die unterste Nachweisgrenze bei ca. 0,1 bis 1 µg liegt, können mit dieser 10 bis 100 fach sensitiveren Färbetechnik selbst noch 10 ng Protein pro Bande detektiert werden.

Dazu wurden die Polyacrylamid-Gele für ca. 2 h in 50 % Methanol und 5 % Eisessig bei Raumtemperatur fixiert und anschließend für 10 Min. in 50 % Methanol geschwenkt.

Danach wurden sie einmal 10 Min. mit $H_2O_{bid.}$ gewaschen. Anschließend wurden die Gele 1 Min. in 0,02 % Natriumthiosulfat inkubiert. Nach zwei Waschschritten von 1 Min. mit $H_2O_{bid.}$ erfolgte die Färbung in 0,1 % Silbernitrat für 20 Min. bei 4 °C. Einem kurzen Spülen mit $H_2O_{bid.}$ folgte die Entwicklung bis zur gewünschten Intensität. Um die Reaktion vollständig abzustoppen und ein Nachdunkeln der Gele zu vermeiden,, wurden sie kurz in 5 %iger Essigsäure inkubiert. Danach wurden die Gele entweder in 1 % Essigsäure aufbewahrt oder, wie oben beschrieben, getrocknet.

Entwicklerlösung: *2 % Natriumcarbonat*
0,04 % Formaldehyd

Identifizierung von Proteinen durch Westernblot-Analysen (*Immuno-Blotting*). Die über ein Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden zunächst auf eine Nitrozellulosemembran (BioTrace™ NT, Pall, Gelman Laboratory, Dreieich) übertragen und dort immobilisiert. Für den Nachweis der EBV-spezifischen Proteine EBNA-2 und Zta erfolgte die Übertragung mit Hilfe einer *Semi-Dry-Fast-Blot*-Apparatur (Biometra®, Götingen) nach Angaben des Herstellers. Für den Transfer der denaturierten, negativ geladenen Proteine vom Gel in Richtung Anode auf die Nitrocellulose wurde für 20 Min. eine Stromstärke von 5 mA/cm^2 Membran angelegt. Dabei stellte sich heraus, dass Proteine größer als 100 kDa auf diese Art und Weise nur sehr schlecht übertragen wurden. Deshalb wurde für den Transfer der BPLF1-spezifischen Proteinfragmente ein anderes Verfahren angewandt. Dazu wurde folgender Aufbau zwischen zwei Graphitplatten gewählt: Anodenplatte, Schwamm, 2 Lagen Whatman-Papier (Whatman International, Maidstone, England), SDS-Gel, Nitrozellulose, 2 Lagen Whatman-Papier, Schwamm, Kathodenplatte. Die Proteine wanderten dabei in einem leitfähigen *Blotting*-Puffer bei einer Stromstärke von 1,5 A aus dem Gel auf die Membran. Der Transfer wurde für ca. 3-4 h durchgeführt. Zur Überprüfung des Transfers konnten die auf der Membran immobilisierten Proteinbanden durch reversible Färbung mit *Ponceau S* sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die Membran für ca. 2 Min. mit der Färbelösung inkubiert und anschließend wieder mit TTBS bis zur Farblosigkeit entfärbt.

Vor der Bindung des primären Antikörpers mussten die freien Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer 5 %igen Magermilchpulverlösung in TBS leicht geschüttelt. Danach wurde die Membran einmal für 10 Min. in TTBS und zweimal für 10 Min. in einem möglichst großen Volumen TBS gewaschen, bevor sie mit einer geeigneten Verdünnung des spezifischen Antikörpers in TBS inkubiert wurde. Für eine Membran von ca. 10 x 5 cm waren 20 ml einer 1:1000 Verdünnung für EBNA2, Zta und GST und einer 1:50 bis 1:20 Verdünnung für Humanseren ausreichend (Verdünnungen in TBS; Antikörper siehe Tabelle 2.1). Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für die monoklonalen Antikörper gegen EBNA2 , Zta und GST für 2 h bei 37 °C (Membran in Folie eingeschweißt) und für die Humanseren über Nacht bei Raumtemperatur. Nach der Bindung des primären Antikörpers wurde nochmals wie oben beschrieben gewaschen, bevor die mindestens zweistündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur erfolgte. Als sekundäre Antikörper wurden Kaninchen-anti-Maus Immunglobuline, AP konjugiert, und Kaninchen-anti-Mensch Immunglobuline, AP bzw. HRP konjugiert (siehe Tabelle 2.1) in Verdünnungen 1: 1000 in TBS, sowie Esel-anti-Kaninchen Immunglobuline, HRP konjugiert in einer Verdünnung

von 1:2000 in TBS verwendet. Nach dem Waschen mit TTBS für 10 Min. erfolgten zwei Waschschritte mit TBS (je 10 Min.) und ein Waschschritt mit DIG-Puffer $3^{+MgCl}{}_2$ zur Einstellung des alkalischen pH-Wertes von 9,5. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte über eine Enzym-Substrat vermittelte Farbreaktion. Für die durch das Enzym Alkalische Phosphatase katalysierte Farbreaktion wurden je 70 µl 4-Nitro-blue-tetrazolium-chlorid (NBT, Roche Diagnostics, Mannheim) und 70 µl 5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP, Roche Diagnostics, Mannheim) zu 20 ml DIG-Puffer $3^{+MgCl}{}_2$ hinzugefügt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Nach einigen Minuten bewegungsloser Inkubation im Dunkeln zeigten sich auf der Membran bläuliche Banden. Die Farbreaktion wurde bei ausreichender Intensität der Banden durch Zugabe von Wasser gestoppt.

Blotting-Puffer: *0,2 M Glycin*
25 mM Tris-HClpH7,5
20 % Methanol

Ponceau S-Färbelösung : 0,1 % Ponceau in 5 %iger Essigsäure gelöst

TTBS: *0,15 M NaCl*
0,01 % Tween20
10 mM Tris-HCl pH 7,5

TBS : *0,15 M NaCl*
10 mM Tris-HCl pH 7,5

DIG-Puffer$3^{+MgCl}{}_2$:100 mM Tris-HCl pH 9,5
100 mM NaCl
50 mM $MgCl_2$

2.6.3.3 Absättigung von Humanseren mit GST-haltigem TOPP3-Bakterienlysat

Das in Bakterien exprimierte BPLF1-GST-Fusionsprotein wurde in Westernblot-Analysen mit verschiedenen Humanseren zur Detektion von BPLF1-spezifischen Antikörpern eingesetzt. Um sicherzustellen, dass die in den Seren enthaltenen Antikörper gegen das BPLF1-Proteinfragment und nicht gegen den GST-Fusionsanteil gerichtet waren, wurden sie mit GST-haltigem TOPP3-Bakterienlysat abgesättigt. Die Herstellung des Bakterienlysats erfolgte wie in Kapitel 2.6.3.1 beschrieben. Als Expressionsvektor wurde dabei das pGEX2T-Ausgangsplasmid ohne Fremd-DNA eingesetzt, von dem in großen Mengen das GST-Protein exprimiert wurde. Der aus der Zentrifugation gewonnene Überstand enthielt das lösliche GST-Protein und konnte für die Absättigung eingesetzt werden. Dazu wurde das Lysat mit dem entsprechenden Humanserum in einem Verhältnis von 20:1 versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Diese Suspension konnte anschließend direkt in die Westernblotanalyse eingesetzt werden.

2.6.4 Herstellung BPLF1-spezifischer Antikörper

Da für den Nachweis des BPLF1-Proteins keine kommerziellen Antikörper zur Verfügung standen, sollte durch die Immunisierung eines Chinchilla-Kanninchens (2,5 kg) ein polyklonales Serum mit BPLF1-spezifischen Antikörpern hergestellt werden. Ca. 60 µg aufgereinigtes BPLF1-Fusionsprotein wurden für die erste Injektion verwendet. Dazu wurde die entsprechende lyophilisierte Proteinmenge in 500 µl PBS aufgenommen und mit gleichem Volumen Adjuvants (TITER MAX Classic Adjuvant, Sigma) versetzt. Nach dem Mischen der beiden Flüssigkeiten wurde die „Öl-in-Wasser"- Emulsion mit dem enthalten Protein dem Kaninchen injiziert. Dabei erfolgte sowohl eine intramuskuläre als auch eine subkutane Injektion zur Ausbildung von mehreren Herden. Nach 4 Wochen wurde eine zweite Injektion mit der gleichen Proteinmenge durchgeführt. Nach einem Zeitraum von weiteren 4 Wochen wurde dem Kaninchen aus der Ohrvene ca. 20 ml Blut entnommen. Durch eine Zentrifugation (1500 x g) wurden die zelllulären Bestandteile des Blutes von dem Serum abgetrennt. Zur Aufbewahrung wurde das Serum in Aliquots von ca. 500 µl bei –20 °C eingefroren. In Westernblot-Analysen wurde das Serum in einem Verhältnis 1:20 bis 1:50 eingesetzt.

3 ERGEBNISSE

Als ein typischer Vertreter der Herpesviren besitzt das Epstein-Barr-Virus die Fähigkeit, sich im Organismus sowohl latent als auch lytisch zu vermehren. Der Wechsel von der Viruslatenz in die lytische Replikation geht einher mit einem Wechsel im viralen Genexpressionsmuster. Im Vergleich zur Latenz, während der bis zu 13 virale Gene transkribiert werden, sind in der lytischen Phase etwa 100 virale Gene exprimiert. Diese Aussage stützt sich jedoch lediglich auf bisher identifizierte und charakterisierte Leserahmen. Eine Vielzahl der von EBV codierten Gene und die Funktion der daraus resultierenden Genprodukte wurde bislang nicht beschrieben. Auch der Leserahmen des BPLF1-Gens gehörte zu diesen unbekannten Bereichen des Epstein-Barr-Virus und sollte im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden. Ausgehend von einer ersten Analyse des Gens, die aufdeckte, um welch komplexes und außergewöhnliches Gen es sich bei BPLF1 handelte, wurde der Leserahmen in mehreren Schritten genauer charakterisiert. Die im folgenden dargelegten Ergebnisse beziehen sich im Wesentlichen auf das BPLF1-Gen (siehe Kapitel 3.1) und das BPLF1-Protein (siehe Kapitel 3.2).

3.1 Das BPLF1-Gen

Im folgenden wurde zunächst das BPLF1-Gen selbst eingehend untersucht. Computeranalysen und Sequenzvergleiche lieferten erste Hinweise auf die Eigenschaften des Gens. Bei den anschließenden Experimenten standen vor allem die transkriptionelle Aktivität des Gens und die Besonderheiten der daraus resultierenden RNA im Vordergrund.

3.1.1 Das BPLF1-Gen – eine Datenbank-Analyse

Der genaue Genomaufbau des Epstein-Barr-Virus wurde bereits in Kapitel 1.2.2 eingehend beschrieben. Abbildung 3.1 zeigt nochmals einen schematischen Überblick über die Anordnung der viralen Gene, wobei der Leserahmen für das BPLF1-Gen durch ein rot markiertes P gekennzeichnet ist. Bei BPLF1 handelt es sich um ein sogenanntes *left frame* Gen. Entsprechend der Nomenklatur wie sie in Kapitel 1.2.2 beschrieben wurde bedeutet BPLF1: *BamHI* Fragment P, erster Leserahmen in linker Orientierung. Innerhalb des Gesamt-Genoms von EBV (B95-8-Stamm; Arrand *et al*., 1981) befindet sich das BPLF1-Gen zwischen den *BamHI* Fragmenten U und O und reicht von Position 62078 bis 71527.

Mit Hilfe des Computerprogramms *ORF-Finder* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda MD 20894; http://www.ncbi.nlm.nig.gov) konnte der Leserahmen des BPLF1-Gens genauer charakterisiert werden. Die Überprüfung der Nukleinsäuresequenz zeigte, dass es sich bei BPLF1 mit 9450 bp um ein außerordentlich großes Gen handelt. Eine Besonderheit des offenen Leserahmens (ORF) bestand zudem darin, dass innerhalb dieses Gens weder ein internes *Stop codon*, noch bekannte *consensus splice sites* (GT-AG-Regel) identifiziert werden konnten.

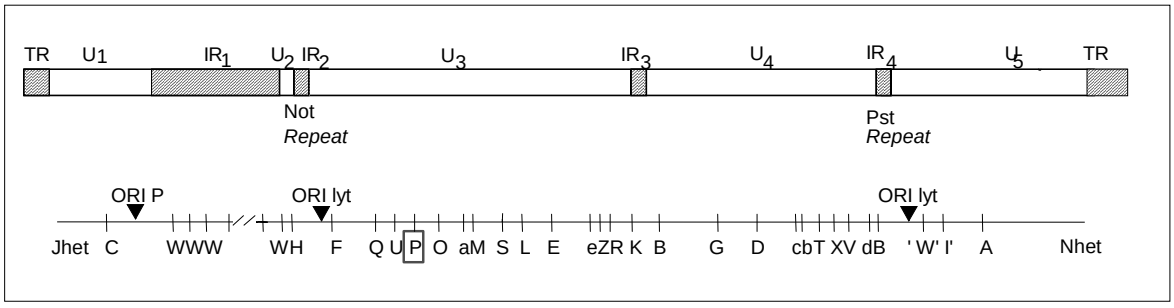


Abbildung 3.1 EBV-Genomstruktur. Das Genom des Epstein-Barr-Virus wird durch vier interne Wiederholungssequenzen (*Internal repeats*, IR) in fünf nichtrepetitive Bereiche (*Unique* U1-U5) unterteilt. An den beiden Enden des Genoms befinden sich ca. 0,5 kbp lange Wiederholungssequenzen (*Terminal Repeats*, TR), die für die Zirkularisierung des EBV-Genoms nach der Infektion der Wirtszelle benötigt werden. Für die Replikation des Virus stehen die beiden Startpunkte *oriP* und ori lyt zur Verfügung. Die Lage des BPLF1-Leserahmens ist durch ein rotes P markiert.

Für die Initiation der Transkription ist dem Gen ein Promotor vorgeschaltet. Dabei konnte durch die Computeranalyse ein *Core*-Promotor detektiert werden, der ausschliesslich über eine TATA-Box die Transkription des Gens einleitet. Cis-wirksame *upstream* oder *downstream* Elemente wie z.B. ein *Inr*-Element (Pyrimidin-reiche Region um das Startnukleotid) oder eine *DAS*-Sequenz (wie z.B. bei späten Promotoren des HSV-1) konnten nicht identifiziert werden. Die TATA-Box des BPLF1-Gens ist an Position 72912 des EBV-Genoms lokalisiert. Eine genaue Überprüfung zeigte, dass diese TATA-Box an Position 4 ein Thymidin anstelle eines Adenins trägt (TATTAAA). Im Vergleich mit anderen EBV-Promotoren war dies ein erster Hinweis auf die Regulation des Gens als ein *true late* Gen (Serio *et al*. 1998). Im Zusammenhang mit der Charakterisierung des Leserahmens stellte sich natürlich auch die Frage, ob BPLF1 überhaupt transkriptionell aktiv ist und ob eine möglicherweise entstehende RNA polyadenyliert und anschließend translatiert wird. Die Identifikation eines Polyadenylierungs-Signals lieferte dafür einen ersten Hinweis. An Position 62068 innerhalb des EBV-Gesamtgenoms, unmittelbar am 3`-Ende des BPLF1-Leserahmens, konnte die enstprechende Sequenz detektiert werden. Weitere Sequenzanalysen auf DNA-Ebene wie z.B. Homologievergleiche mit anderen herpesviralen Genen oder Bindung von Transkriptionsfaktoren führten zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Diese Analysen wurden vorwiegend auf Proteinebene vertieft (siehe Kapitel 3.2.1).

Somit konnte nach den theoretischen Überprüfungen davon ausgegangen werden, dass es sich bei der BPLF1-spezifischen RNA um eine ungespleisste, polyadenylierte RNA von ca. 9500 bp handelt, die im Kontext des EBV-Gesamtgenoms als ein *left frame*–Gen exprimiert wird.

3.1.2 Nachweis der transkriptionellen Aktivität des BPLF1-Gens

Durch die Computeranalysen wurden einige Besonderheiten des BPLF1-Leserahmens deutlich. Am auffälligsten erschien die enorme Größe des Gens, ohne bekannte interne Spleißstellen. Um Aussagen über die transkriptionelle Aktivität des BPLF1-Gens treffen zu können, sollten zunächst RT-PCR- und Northernblot-Analysen durchgeführt werden.

In Vorversuchen wurde eine RT-PCR mit anschließender Southernblot-Hybridisierung und DIG-Detektion etabliert, in der gezeigt werden konnte, dass das BPLF1-Gen während der späten lytischen Phase aktiv ist (siehe Kapitel 2.5.1.5, 2.5.2.2, und Abbildung 3.2). Um diese Aussage über den Zeitpunkt der Genaktivität während der viralen Replikation treffen zu können, wurde RNA sowohl induzierter (siehe Kapitel 2.4.2), als auch nicht induzierter EBV-positiver und EBV-negativer Zellen in die RT-PCR eingesetzt. Bei dieser RT-PCR, die mit Hilfe der Primer 5`RT und 3`RT (siehe Tabelle Tabelle 2.3) und der MMuLV-reversen Transkriptase durchgeführt wurde, konnte spezifisch ein 361 bp großes Fragment der BPLF1-RNA amplifziert und detektiert werden (siehe Abbildung 3.2). Eine parallele Behandlung jedes Ansatzes mit DNaseI (Abbildung 3.2 Spuren 1, 3, 5, 7, 9 und 11) bzw. DNAseI/RNase T1 (Abbildung 3.2 Spuren 2, 4, 6, 8 und 10) stellte sicher, dass die erhaltenen Signale nur von RNA stammen konnten. Die Induktion der verschiedenen Zelllinien wurde mittels Westernblot-Analysen gegen das frühe lytische Protein Zta und gegen das latente Protein EBNA2 von EBV mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern durchgeführt (siehe Kapitel 2.6.3.2, Daten nicht gezeigt).

Abbildung 3.2 zeigt das Ergebnis der DIG-Southernblot-Hybridisierung der RT-PCR-Amplifizierung. Der Blot weist ein eindeutiges Signal bei den induzierten EBV-positiven P3HR1/16 Zellen auf (Spur 9). Ein schwaches Signal wurde auch bei den nicht induzierten Proben dieser Zelllinie detektiert (Spur 7), was auf eine spontane lytische Vermehrung des Virus in diesen Zellen zurückgeführt werden kann. Keine BPLF1-spezifische Bande wurde in EBV-negativen DG75-Zellen (Daten nicht gezeigt), in der EBV-positiven, strikt latenten Zelllinie EM (Spur 1) und in nicht induzierten/induzierten Raji-Zellen (Spuren 3 und 5) detektiert. Die Zelllinie Raji ist nicht in der Lage, infektiöse Viruspartikel zu produzieren. Das bedeutet, dass nach Induktion des lytischen Zyklus nicht die gesamte Genkaskade durchlaufen wird, sondern nur *immediate-early* und *early* Gene des Virus abgelesen und exprimiert werden können. Ein positives Signal in dieser Zelllinie würde auf ein frühes Gen hinweisen. Ein fehlendes Signal in den Zelllinien EM und Raji, sowie ein deutliches Signal in den induzierten P3HR1/16-Zellen, definierte das BPLF1-Gen als ein sehr spätes Gen des Epstein-Barr-Virus.

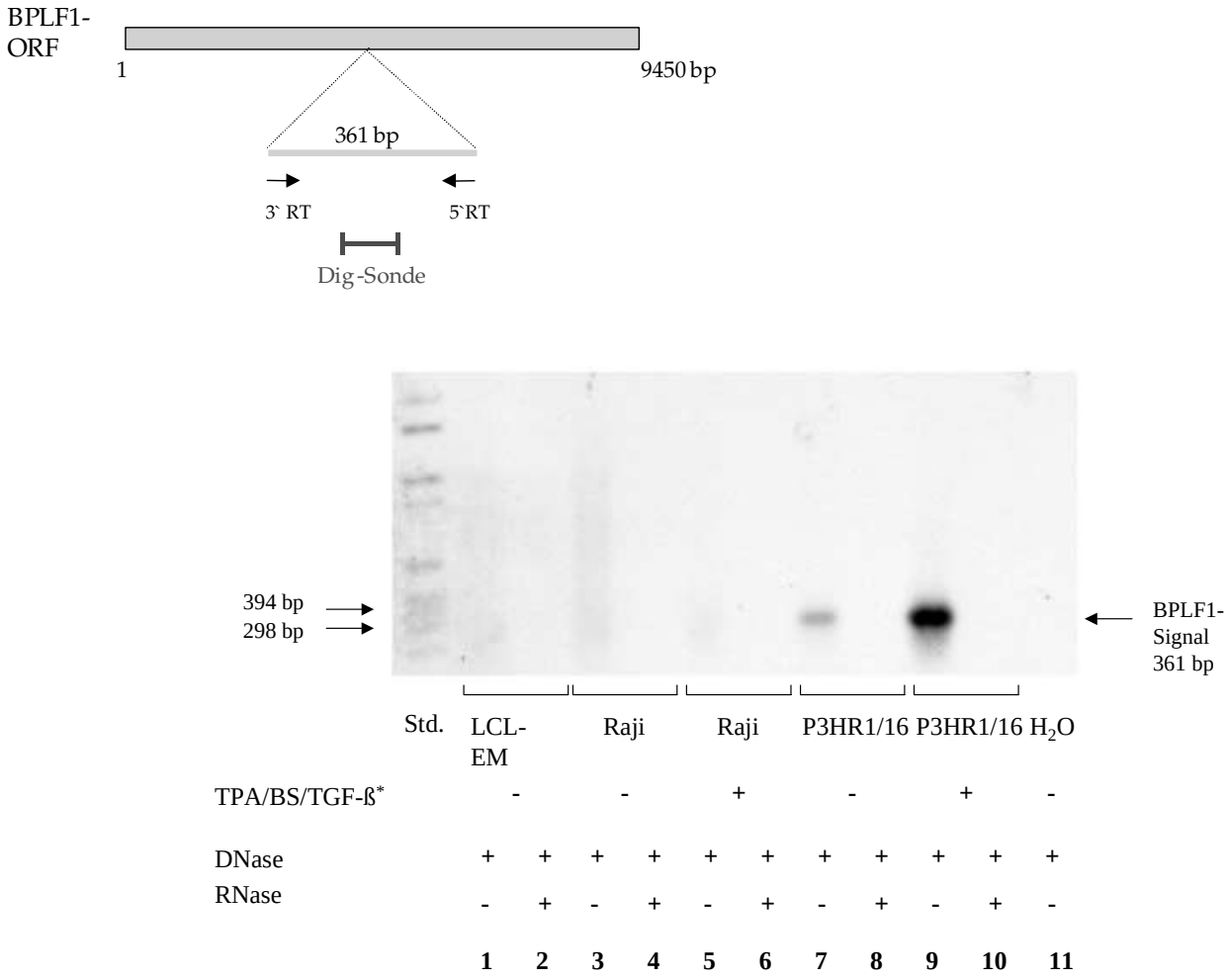


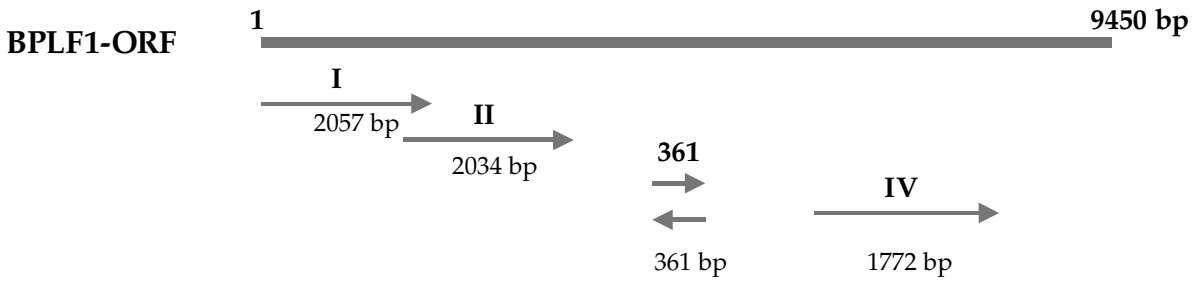
Abbildung 3.2 Southernblot-Hybridisierung der RT-PCR Amplifizierung mit DIG-markierter BPLF1-Sonde. Die Abbildung links oben zeigt schematisch einen Überblick über die Lage der RT-Primer und der verwendeten Dig-Sonde innerhalb des BPLF1-Gens. Die rechte untere Abbildung zeigt die Southernblot-Hybridisierung. Je 10 µl jedes RT-PCR-Ansatzes wurden dazu auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen, geblottet und mit einer DIG-markierten Sonde detektiert (siehe Kapitel **2.5.1.5**). Die Spuren 1, 3, 5, 7, 9 und 11 repräsentieren die Ansätze mit DNaseI-Verdau und damit einem RNA-spezifischen Signal. In den Spuren 2, 4, 6, 8 und 10 wurde zusätzlich ein RNaseT1-Verdau durchgeführt. Die Zelllinien Raji (Spuren 5 und 6) und P3HR1/16 (Spuren 9 und 10) wurden zudem mit TPA/BS/TGF-ß* induziert. Ein starkes BPLF1-spezifisches RNA-Signal konnte bei den induzierten P3HR1/16-Zellen detektiert werden (Spur 9). Nicht induzierte P3HR1/16-Zellen zeigten ein schwaches Signal, was möglicherweise auf eine spontane lytische Vermehrung zurückgeführt werden kann (Spur 7). In den restlichen Zelllinien wurde kein BPLF1-spezifisches Signal detektiert.

Mit Hilfe der RT-PCR konnten Angaben bezüglich des Zeitpunktes der Transkription gemacht werden, jedoch über die Größe der RNA konnten keine Aussagen getroffen werden. Deshalb sollten in Northernblot-Analysen die Daten aus der PCR überprüft und zugleich die Größe des Transkripts der BPLF1-RNA bestimmt werden. Die Northernblot-Analysen wurden wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben etabliert und durchgeführt. Für den

Nachweis der BPLF1-spezifischen RNA wurde sowohl Gesamt-RNA als auch aufgereinigte mRNA verschiedenster Zelllinien in die Hybridisierung mit BPLF1-spezifischen Sonden eingesetzt. Im folgenden sind die Ergebnisse der Northernblot-Analysen detailliert dargestellt.

Für die Northernblot-Analysen wurden RNAs speziell ausgesuchter Zelllinien eingesetzt. Als Negativkontrolle diente neben der EBV-negativen Zelllinie DG75, die bereits in der RT-PCR Verwendung fand, auch die Zelllinie BL41. Diese beiden Zelllinien gewährleisteten nicht nur, dass es sich bei positiven Signalen um EBV-spezifische Signale handelte, sondern konnten auch mögliche Kreuzhybridisierungen der verwendeten Sonden aufdecken. Auf die strikt latent infizierte lymphoblastoide Zelllinie EM wurde in den Northernblot-Analysen verzichtet, da die Vorversuche der RT-PCR den Hinweis lieferten, dass BPLF1 nicht während der Latenz transkribiert wird. Eine genauere Einstufung des Gens während der lytischen Vermehrung erlaubte die Verwendung der Zelllinie Raji (diese Zelllinie exprimiert nach Induktion des lytischen Zyklus lediglich *immediate-early* und *early* Proteine des Virus, siehe oben). Als letzte Zelllinie wurde P3HR1/16 verwendet, die bereits in der RT-PCR ein positives Signal zeigte. Ebenso wie alle anderen Zelllinien wurden diese Zellen für 72 h mit TPA/BS/TGFß* induziert, um zu gewährleisten, dass die komplette lytische Gen-Kaskade durchlaufen und auch sehr späte Gene transkribiert wurden (siehe Kapitel 2.4.2). Aus den induzierten und nicht induzierten Zellen wurde dann wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, sowohl Gesamt-RNA (DG75 und P3HR1/16) als auch polyadenylierte mRNA (BL41, DG75, Raji und P3HR1/16) aufgereinigt und in die Northernblot-Analysen eingesetzt.

Für die Detektion der BPLF1-spezifischen RNA wurden 4 teilweise überlappende Sonden eingesetzt, die das BPLF1-Gen in weiten Bereichen überspannten. Abbildung 3.3 gibt schematisch einen Überblick über die Lage und Größe der verwendeten Sonden. *In vitro*-transkribierte, radioaktiv markierte RNA-Sonden wurden gegenüber herkömmlichen DNA-Sonden bevorzugt, da damit stringentere Bedingungen für den Northernblot angelegt werden konnten. Der Nachteil dieser Methode bestand darin, dass der Blot aufgrund der starken RNA-RNA-Bindungen nicht für weitere Hybridisierungen zur Verfügung stand. Die Synthese der *in vitro*-transkribierten, radioaktiv markierten RNA-Sonden erfolgte mit Hilfe des *Riboprobe® in vitro Transcription System SP6/T7* der Firma Promega (Madison, USA) und ist in Kapitel 2.6.1 genau beschrieben. Ausgehend von einer Plasmid-DNA mit der entsprechenden Gensequenz, die als Matrize diente, kam es dabei durch die Sp6 bzw. T7-Polymerase zur Transkription einer weitgehend homogenen RNA-Population. Durch die Linearisierung des Plasmids entstanden sogenannte „*run-off*"-Transkripte, wodurch gewährleistet war, dass die transkribierten RNAs frei von jeglicher Vektor-Sequenz waren. Abbildung 3.3 zeigt neben der schematischen Darstellung der Sonden auch die verwendeten Ausgangsplasmide (siehe auch Anhang A.5), die Restriktionsenzyme, die zur Linearisierung verwendet wurden, und die jeweilige für die *in vitro* Transkription verwendete Polymerase. Durch diese Methode konnten Sonden unterschiedlicher Länge und Orientierung („*antisense*" und „*sense*") gestaltet werden. Dabei stellte sich heraus, dass die Länge der Sonden einen entscheidenden Einfluss auf die Spezifität hatte (siehe unten). Optimale Hybridisierungsbedingungen, die Kreuzhybridisierungen mit der 28S rRNA (ca. 5000 bp) und 18S rRNA (ca. 2000 bp) verhindern sollten, wurden zunächst mit der ß-Aktin–Sonde ausgetestet. Diese Sonde bestand aus einem ca. 1200 bp langem Transkript. Sie detektierte die 1800 bp lange mRNA des ß-Aktin-Gens und lag genau im Bereich der 18S rRNA. Mit ihr konnte neben den Hybridisierungsbedingungen auch die Qualität der RNA überprüft werden (Daten nicht gezeigt).



Bezeichnung der Sonde	Ausgangs-Plasmid	Restriktionsenzym zur Linearisierung	Polymerase	Transkriptgröße
BPLF1-I	pCRII-TOPO-BPLF1-Frg.I	SpeI	T7	ca. 2057 bp
BPLF1-II	pCRII-TOPO-BPLF1-Frg.II	XbaI	Sp6	ca. 2034 bp
BPLF1-361 *antisense*	pCRII-TOPO-BPLF1-361 Frg.	XbaI	Sp6	ca. 361 bp
BPLF1-361 *sense*	PCRII-TOPO-BPLF1-361 Frg.	SpeI	T7	ca. 361 bp
BPLF1-IV	PCRII-TOPO-BPLF1-Frg.IV	SpeI	T7	ca 1772 bp

Abbildung 3.3 Schematische Übersicht über die verwendeten Northernblot-Sonden und die in der *in vitro*-Transkription verwendeten Ausgangsplasmide und Enzyme. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Lage und Größe der BPLF1-spezifischen Sonden innerhalb des gesamten BPLF1-Gens. Die Sonden BPLF1-I, II, 361 und IV sind in *antisense*-Orientierung zur BPLF1-RNA angeordnet. Die Sonde BPLF1-361-*sense* besitzt die gleiche Sequenz wie die BPLF1-RNA. Die Tabelle führt neben den Ausgangsplasmiden auch die zur Linearisierung verwendeten Restriktionsenzyme und die für die Transkription notwendigen Polymerasen auf.

In verschiedenen Northernblot-Analysen wurden nun die diversen RNAs und Sonden ausgetestet. Abbildung 3.4 zeigt eine Northernblot-Analyse mit Gesamt-RNA der Zelllinien DG75 und P3HR1/16 nicht induziert und induziert (72 h mit TPA/BS/TGFß*). Für die Detektion des BPLF1-spezifischen Signals wurde ein Gemisch aus den *in vitro* transkribierten RNA-Sonden BPLF1-I, BPLF1-II, BPLF1-361-*antisense* und BPLF1-IV eingesetzt. Ein deutliches BPLF1-spezifisches Signal konnte in der induzierten Zelllinie P3HR1/16 bei ca. 3000 bp detektiert werden, was ein Hinweis auf eine gespleißte RNA war. Ein weiteres, weitaus schwächeres Signal erschien ebenfalls in dieser Zelllinie bei ca. 9500 bp, eventuell das ungespleißte Gesamt-Transkript. Die EBV-negative DG75-Zelllinie zeigte wie erwartet kein BPLF1-spezifisches Signal, ebenfalls kein Signal wurde detektiert in den nicht induzierten P3HR1/-Zellen.

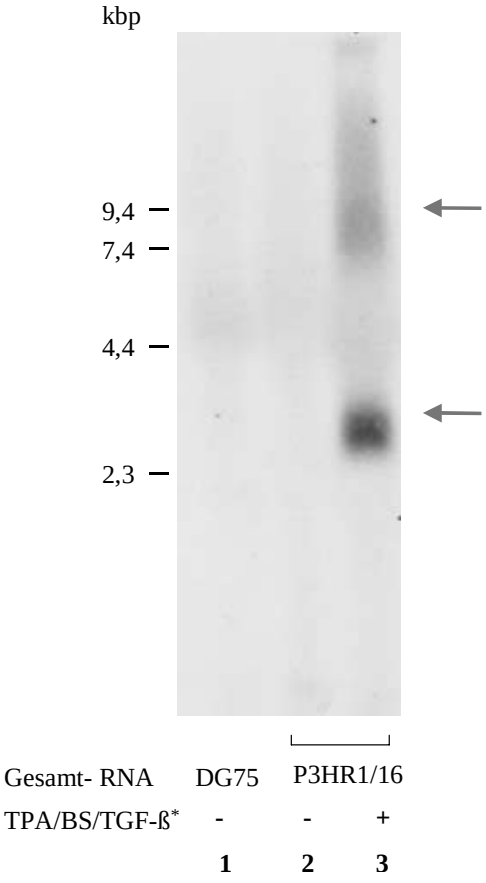


Abbildung 3.4 Northernblot-Analyse zur Detektion des BPLF1-Transkripts in Gesamt-RNA EBV-positiver Zellen mit Hilfe eines BPLF1-spezifischen RNA-Sondengemisches. Ca. 20 µg Gesamt-RNA der EBV-negativen Zelllinie DG75 (Negativkontrolle) sowie der nicht induzierten und induzierten EBV-positiven Zelllinie P3HR1/16 wurden in die Northernblot-Analyse eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit den BPLF1-spezifischen *in vitro*-transkribierten RNA-Sonden BPLF1-I, -II, -361-*antisense* und -IV als Sondengemisch. Zwei BPLF1-spezifische Signale konnten in den induzierten P3HR1/16-Zellen nachgewiesen werden (Spur 3). Eine ungespleißte RNA von ca. 9,5 kbp und ein vermutlich gespleißtes Transkript von ca. 3 kbp (durch blaue Pfeile gekennzeichnet). Kein BPLF1-spezifisches Signal wurde in der EBV-negativen Zelllinie DG75 (Spur 1) und den nicht induzierten P3HR1/16-Zellen (Spur 2) detektiert.

Durch diese Northernblot-Analyse konnten die Ergebnisse aus der RT-PCR bestätigt werden. Ebenso wie in den Vorversuchen konnte eine BPLF1-spezifische RNA in induzierten P3HR1/16-Zellen nachgewiesen werden. Die Northernblot-Hybridisierungen lieferten zudem einen Hinweis auf die Größe des BPLF1-Transkripts, das offensichtlich sowohl als Vollänge-Transkript mit einer Größe von ca. 9500 bp vorliegt, als auch in Form eines gespleißten ca. 3000 bp großen Transkripts, bei dem es sich eventuell um die mRNA des Gens handelt. Um diese Aussage bestätigen zu können, wurden Northernblot-Analysen mit aufgereinigter mRNA durchgeführt. Das Prinzip dieser Aufreinigung bestand darin, mRNA über den Poly-A-Rest aufzureinigen (siehe Kapitel 2.6.1). Somit enthielt die aufgereinigte RNA-Population lediglich polyadenylierte mRNAs. Da auch am Ende des BPLF1-Gens ein Poly-A-Signal lokalisiert ist, sollte diese RNA ebenfalls in diesem Pool detektiert werden können. Abbildung 3.5 zeigt das Ergebnis der Northernblot-Analyse mit unterschiedlichen Zelllinien. Wie erwartet konnte in den EBV-negativen Zelllinien BL41 und DG75 kein BPLF1-spezifisches Signal detektiert werden (Spuren 1-3). Um zusätzlich auszuschließen, dass eine positive Bande von der Induktion der Zelllinie herrührte, wurden die DG75 Zellen in diesem Versuch ebenfalls mit TPA-/BS/TGFß* induziert, was jedoch zu keinem positiven Signal führte (Spur 3). Die Zelllinie Raji, die als weitere Kontrolle mitgeführt wurde, bestätigte das Ergebnis aus der RT-PCR, in der kein BPLF1-spezifisches Transkript während der frühen lytischen Phase detektiert wurde (Spuren 4 und 5). Auch nicht-induzierte P3HR1/16-Zellen wiesen kein Transkript der gewünschten Länge auf (Spur 6). Lediglich in den induzierten P3HR1/16-Zellen konnte die ca. 3000 bp große BPLF1-RNA nachgewiesen werden (Spur 7). Wie erwartet fehlte das Signal im Bereich von 9500 bp. Da es sich bei diesem großen Transkript wohl um die ungespleißte RNA des

Gens handelt, konnte diese in aufgereinigter mRNA nicht nachgewiesen werden. Diese Northernblot-Analysen lieferten somit einen zusätzlichen Hinweis, dass die BPLF1-RNA polyadenyliert ist. Somit bestätigten sich die Aussagen aus der RT-PCR, dass es sich bei BPLF1 um ein sehr spätes Gen der viralen Replikationskaskade handelt. Die RNA liegt in zwei Formen vor, einem ungespleißten Transkript von ca. 9500 bp, das der gesamten Gensequenz entspricht, und einer gespleißten ca. 3000 bp polyadenylierten mRNA.

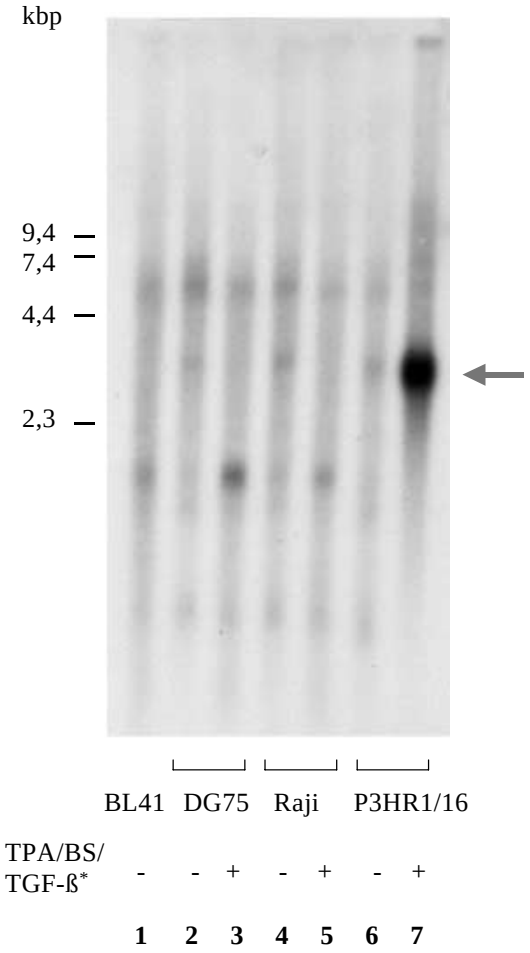


Abbildung 3.5 Northernblot-Analyse zur Detektion des BPLF1-Transkripts in mRNA EBV-positiver Zellen mit Hilfe eines BPLF1-spezifischen RNA-Sondengemisches. Ca. 10 µg poly-A aufgereinigte mRNA der EBV-negativen Zelllinien BL41 und DG75 (Negativkontrollen) sowie der nicht induzierten und induzierten EBV-positiven Zelllinien Raji und P3HR1/16 wurden in die Northernblot-Analyse eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit den BPLF1-spezifischen *in vitro*-transkribierten RNA-Sonden BPLF1-I, -II, -361-*antisense* und -IV als Sondengemisch. In den induzierten P3HR1/16-Zellen konnte ein gespleißtes ca. 3 kbp großes BPLF1-Transkript nachgewiesen werden (Spur 7, durch einen blaue Pfeil gekennzeichnet). Die ungespleißte RNA von ca. 9,5 kbp wurde nicht detektiert. Kein BPLF1-spezifisches Signal wurde in den EBV-negativen Zelllinien BL41 und DG75 (Spuren 1-3), den nicht induzierten/induzierten Raji-Zellen (Spuren 4 und 5) und den nicht induzierten P3HR1/16-Zellen (Spur 6) detektiert.

Da offensichtlich in dem 3000 bp Transkript nicht der gesamte BPLF1-*open reading frame* enthalten sein konnte, sollte nun geklärt werden, welche Genbereiche einen Anteil an der mRNA hatten. Dazu wurden wieder Northernblot-Analysen durchgeführt, wobei die vorhandenen RNA-Sonden nicht als Gemisch eingesetzt wurden, sondern unabhängig voneinander in verschiedenen Hybridisierungen getestet wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.6 zu sehen. Lediglich die Sonde BPLF1-361-*antisense* zeigte die beiden BPLF1-spezifischen Signale (Spur 3). Die anderen Sonden, BPLF1-I, BPLF1-II und BPLF1-IV verursachten ausschließlich Kreuzhybridisierungen mit der 28S rRNA. Diese Kreuzhybridisierungen konnten entweder darauf zurückgeführt werden, dass diese BPLF1-Bereiche nicht in der mRNA enthalten waren, oder dass die Sonden für die Hybridisierung ungeeignet waren. Wie bereits erwähnt, spielt die Länge der RNA Sonde eine entscheidende Rolle. Die sehr spezifische Sonde BPLF1-361-*antisense* (Länge 361 bp) war

im Vergleich zu den übrigen Sonden (mit ca. 1700 bp im Durchschnitt) wesentlich kleiner. Dies könnte mitunter ein Grund für die unspezifischen Bindungen sein. Im Falle von BPLF1, führte jedoch auch eine Verkürzung z.B. der Sonde BPLF1-IV zu keinem positiven Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Durch diesen Versuch konnten zwar keine weiteren Bereiche in der mRNA identifiziert werden, die Daten bestätigten jedoch die RT-PCR-Ergebnissen, in denen ebenfalls der Bereich des 361 bp Fragments innerhalb der BPLF1-RNA amplifiziert wurde.

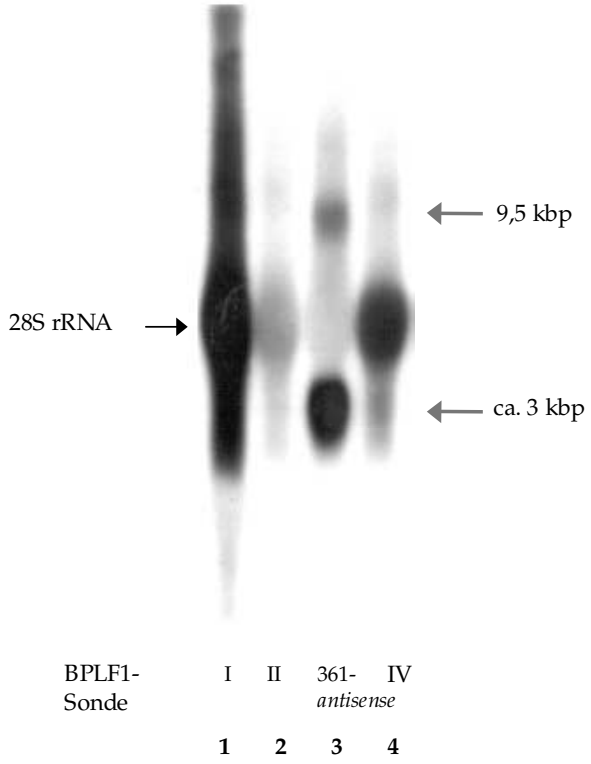


Abbildung 3.6 Northernblot-Analyse zur Identifikation der in der mRNA enthaltenen BPLF1-Genbereiche. Ca. 20 µg Gesamt-RNA der EBV-positiven Zelllinie P3HR1/16 induziert wurden in die Northernblot-Analyse eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit den BPLF1-spezifischen *in vitro*-transkribierten RNA-Sonden BPLF1-I, -II, -361-*antisense* und -IV in einzelnen Hybridisierungsansätzen. Die Sonden BPLF1-I, II und IV zeigten lediglich unspezifische Kreuzhybridisierungen mit der 28S rRNA (Spuren 1, 2 und 4). Die Sonde BPLF1-361-*antisense* detektierte die beiden BPLF1-spezifischen Transkripte von ca. 9,5 kbp und 3 kbp (Spur 3, durch blaue Pfeile gekennzeichnet).

Als Kontrolle für die Spezifität des BPLF1-Signals wurde eine Northernblot-Analyse mit einer „*Sense*"-Sonde durchgeführt. Diese enthielt die gleiche Sequenz wie die BPLF1-mRNA und konnte somit nicht an diese binden. Für die Herstellung dieser Sonde wurde das Plasmid pCRII-TOPO-BPLF1/361 mit dem Restriktionsenzym *SpeI* geschnitten und *in vitro* transkribiert (siehe Abbildung 3.3). Das Ergebnis der Hybridisierung zeigt Abbildung 3.7. In beiden Zelllinien (DG75 und P3HR1/16, nicht induziert und induziert) zeigten sich lediglich unspezifische Kreuzhybridisierungen mit der 28S rRNA und der 18S rRNA (Spuren 4-6). Im Vergleich dazu lieferte die „*Antisense*"-Sonde BPLF1-361 die beiden spezifischen Signale (Spur 3).

Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei den Northernblot-Signalen, die mit der Sonde BPLF1-361-*antisense* detektiert wurden, um BPLF1-spezifische Transkripte handelte.

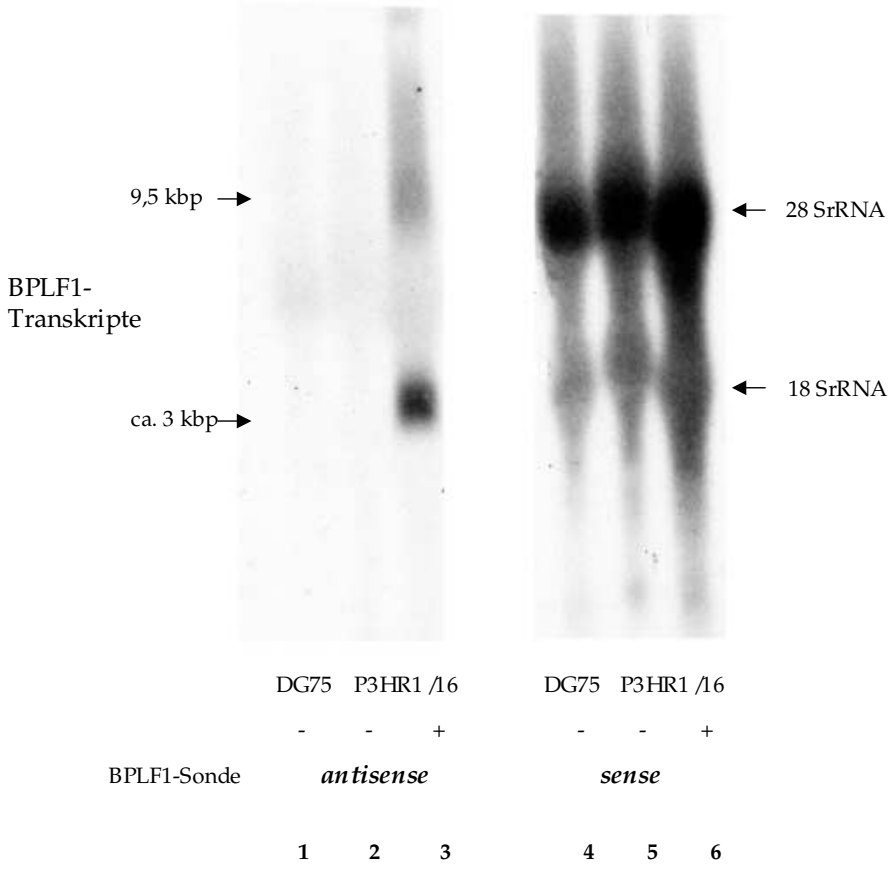


Abbildung 3.7 Northernblot-Analyse mit BPLF1-361-„*Sense*“-Sonde zur Bestätigung des BPLF1-Transkripts. Ca. 20 µg Gesamt-RNA der EBV-negativen Zelllinie DG75 (Negativkontrolle) sowie der nicht induzierten und induzierten EBV-positiven Zelllinie P3HR1/16 wurden in die Northernblot-Analyse eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte sowohl mit der *in vitro*-transkribierten RNA-Sonde BPLF1-361-*antisense* (Spuren 1-3) als auch mit der Sonde BPLF1-361-„*sense*“ (Spuren 4-6). Die Hybridisierung mit der „*antisense*“-Sonde zeigte die erwarteten Signale: kein BPLF1-spezifisches Signal in den Zellen DG75 und P3HR1/16 nicht induziert (Spuren 1 und 2), zwei BPLF1-spezifische Transkripte in den induzierten P3HR1/16 Zellen (Spur 3). Mit der BPLF1-361-„*Sense*“-Sonde wurden in allen Zellen lediglich unspezifische Kreuzhybridisierungen mit der 28S rRNA und der 18S rRNA detektiert (Spuren 4-6).

3.1.3 Synthese der BPLF1-cDNA

Die Detektion des prominenten 3000 bp-Transkripts von BPLF1 in den Northernblot-Analysen gab Grund zu der Annahme, dass trotz fehlender *Consensus*-Spleißstellen innerhalb der Gensequenz ein Spleißen stattfindet. Zur Aufklärung möglicher Exon-Intron-Strukturen sollte aus infizierten Zellen eine cDNA von BPLF1 synthetisiert und durch Sequenzierung analysiert werden. Für die Herstellung der cDNA wurden verschiedene handelsübliche Systeme getestet. Das Prinzip dieser Systeme beruht jeweils auf einer Umschreibung der RNA bzw. mRNA in die entsprechende cDNA-Sequenz mittels einer RT-PCR-Reaktion. Diese Umschreibung wird durch mehrere Faktoren limitiert und beeinträchtigt. Ein äußerst wichtiger Punkt ist die Ausbildung von starken

Sekundärstrukturen innerhalb der RNA aufgrund eines hohen GC-Gehaltes der Gensequenz. Dadurch ist es der Polymerase nicht möglich, über diese Strukturen hinweg zu transkribieren und eine vollständige cDNA herzustellen. Ein weiterer Aspekt ist die Wahl und das Design der eingesetzten Primer. Genspezifische Primer sollten wenn möglich sogenannten oligo dT-Primern bevorzugt werden. Letztere bestehen meist aus einer kurzen Sequenz, die oft Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme tragen, und einem Ende von ca. 30 Thymidin Nukleotiden. Diese Konstellation führt oftmals dazu, dass es zu unspezifischen Bindungen kommen kann, bzw. dass eine reverse Transkription nur bei relativ niedrigen Temperaturen stattfinden kann. Auch bei der Aufklärung des BPLF1-Gens bzw. bei der Synthese der cDNA, mussten diese Punkte berücksichtigt werden. Ein GC-Gehalt von fast 60 % führte bei BPLF1 dazu, dass es zur Ausbildung starker Sekundärstrukturen innerhalb der RNA kam. Die Umschreibung von RNA in DNA war deshalb der limitierende Schritt bei der Synthese der BPLF1-cDNA bzw. einer cDNA-Genbank. Für die RT-PCR wurden äußerst strenge Bedingungen angelegt. So wurden neben verschiedensten Primer-Konstellationen auch die Transkriptionstemperaturen variiert und die Verwendung von DMSO, um die Sekundärstrukturen der RNA etwas zu glätten, ausgetestet. Jedoch selbst eine reverse Transkription bei 50 °C bzw. der Einsatz von 10 % DMSO oder die Verwendung genspezifischer Primer führte mit den meisten handelsüblichen Systemen zu keinem Erfolg. Lediglich durch die Modifikation eines Systems, dem *SMART™ PCR cDNA Synthese Systems* der Firma Clontech (Palo Alto, CA, USA), konnte ein Teilerfolg erzielt werden und die Synthese eines 1500 bp großen Anteils der BPLF1-cDNA erfolgreich durchgeführt werden.

Basierend auf einer reversen Transkription und anschließenden PCR-Amplifikation kann mit Hilfe des *SMART™ PCR cDNA-Synthese Systems* hochqualitative cDNA hergestellt werden. Die Besonderheit des Systems liegt darin, dass in erster Linie Vollänge-cDNAs angereichert werden. Das Prinzip des Systems ist schematisch in Abbildung 3.8 beschrieben. Ausgehend von Gesamt- oder polyA$^+$-RNA wird mit Hilfe eines modifizierten oligo (dT)-Primers (CDS-Primer; siehe Tabelle 2.3) die Erststrangsynthese durchgeführt. Für die reverse Transkription (RT) wird eine spezielle reverse Transkriptase eingesetzt, die *Superscript II* (Gibco Life Technologies, Karlsruhe). Dabei handelt es sich um eine in der RNAse H-Aktivität punktmutierte reverse Transkriptase mit einer terminalen Transferase Aktivität. Erreicht diese Polymerase das 5` -Ende der RNA so hängt sie an das 3`-Ende der neusynthetisierten cDNA einige Nukleotide an, bevorzugt Desoxy-Cytidin (*dC-tailing*). Das zweite Oligonukleotid (SMART II Oligonukleotid, siehe Tabelle 2.3), das ebenfalls in der RT-Reaktion vorhanden ist, bindet an diese Desoxy-Cytidin –Reste und kreiert somit ein neues *Template* für die reverse Transkriptase. Das Enzym führt nun einen *template switch* durch und verlängert die cDNA entsprechend der Sequenz des SMART II Oligonukleotids. Als Ergebnis erhält man eine einzelsträngige (ss) cDNA, die sowohl das gesamte 5`- Ende der RNA als auch 5`und 3`spezifische Sequenzen enthält, die von den Oligonukleotiden stammen. Diese Oligo-spezifischen Sequenzen dienen in einer anschließenden PCR-Amplifikation als Primer-Bindestellen. Beendet die reverse Transkriptase ihre Aktivität bevor sie das Ende der RNA erreicht hat, so kommt es zu keiner bzw. nur einer schwachen Markierung des 5`-Endes mit den Cytidin-Desoxy-Nukleotiden und somit zu keiner Bindung des zweiten Oligonukleotids bzw. keiner PCR-Amplifikation.

Zunächst wurden die Versuche nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Ausgangsgmaterial für die Erststrang-Synthese wurde Gesamt- und mRNA aus induzierten P3HR1/16 –Zellen verwendet. Die RNAs wurden dazu wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben

aufgereinigt. Für die reverse Transkription wurden ca. 5 µg Gesamt-RNA bzw. 0,5 µg mRNA eingesetzt. Die Experimente zeigten jedoch, dass die Herstellung des Vollänge-BPLF1-Transkripts auf diese Art und Weise nicht möglich war. Bei einer Überprüfung der neu synthetisierten cDNA (z.B. auf das BPLF1-spezifische 361 bp Fragment mit Hilfe der genspezifischen Primer 3`RT und 5`RT in einer PCR-Reaktion) konnte kein BPLF1-spezifisches Transkript in der neu synthetisierten cDNA-Population nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Damit zeichnete sich ab, dass bereits der RT-Schritt, also die Umschreibung von RNA in cDNA, die limitierende Reaktion war. Diese Beobachtung stimmte mit früheren Versuchen überein, wo aus RNA, in der sehr viel BPLF1-spezifische RNA enthalten sein musste, in der RT-PCR nur ein schwaches bzw. erst über eine Dig-Detektion ein Signal nachgewiesen werden konnte.

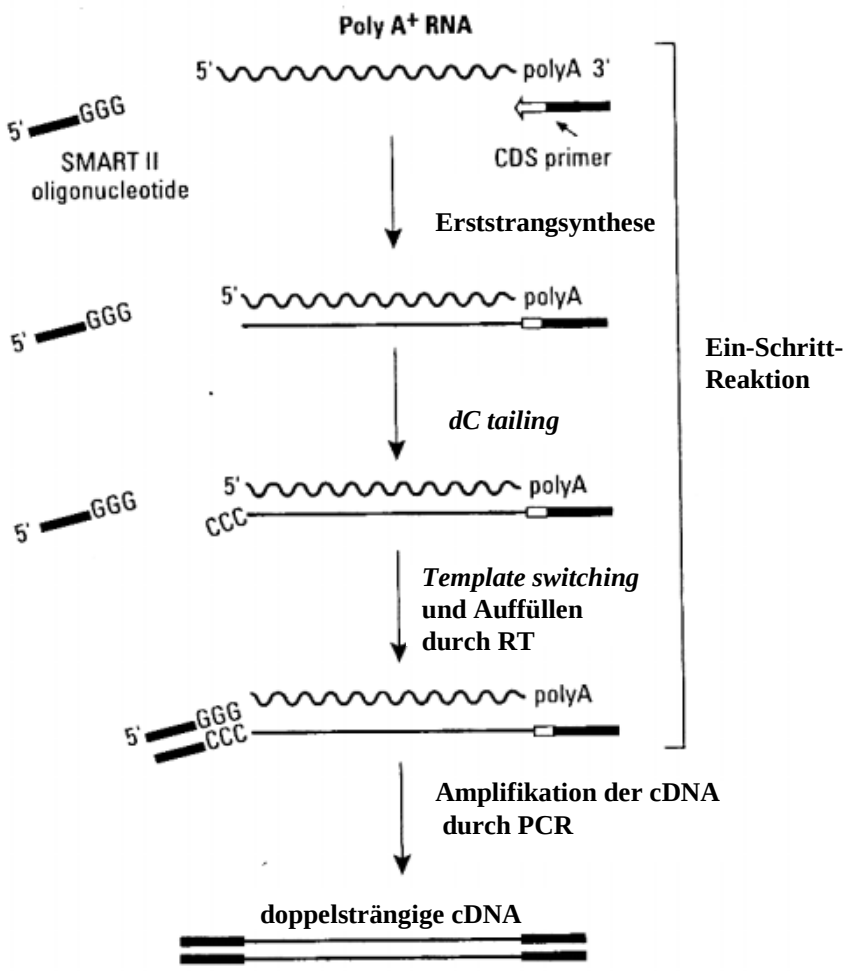


Abbildung 3.8 Prinzip des *SMART™PCR-cDNA-Synthese Systems.* Ausgehend von Gesamt- bzw. mRNA erfolgt die Erststrangsynthese der cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase *Superscript II*. Sobald das Enzym das 5`-Ende des RNA-*templates* erreicht hat, hängt es einige Desoxy-Cytidin-Nukleotide an die neusynthetisierte cDNA an. Nach der Bindung des *SMART-II*-Oligonukleotids an diesen oligo-dC-Rest erfolgt ein *template switch* der Reversen Transkriptase und ein Auffüllen der cDNA bis zum Ende des SMART-II-Oligos. In einer PCR-Reaktion erfolgt anschließend die Amplifikation der doppelsträngigen cDNA mit Primern, die spezifisch gegen die 5`-Sequenz der Oligonukleotide CDS und SMART-II gerichtet sind.

In einem nächsten Schritt wurde nun BPLF1-angereicherte RNA eingesetzt. Das Prinzip dieser Aufreinigung beruhte darauf, dass aus induzierten P3HR1/16-Zellen mit einer BPLF1-Sonde die gewünschte RNA spezifisch gefischt werden sollte. Dafür wurde ein biotinyliertes BPLF1-Oligonukleotid (siehe Tabelle 2.3, DIG-BIO-Sonde) mit den lysierten Zellen vermischt, die Bindung zwischen dem Oligonukleotid und der BPLF1-RNA durchgeführt und anschließend das so erhaltene Oligo-RNA-Hybrid mit Hilfe von Streptavidin-Microbeads im Magnetfeld aufgereinigt (genaue Beschreibung der Methode siehe Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach). Doch auch diese spezifisch angereicherte RNA lieferte kein Signal, wobei nicht überprüft werden konnte, welcher Güte die RNA war. Für die Herstellung der BPLF1-cDNA wurde das Protokoll des Herstellers daraufhin in einigen Punkten variiert. Um eine Umschreibung und Amplifikation der ausgesprochen GC-reichen und langen BPLF1-RNA zu erzielen, wurde das Experiment auf folgende Art und Weise durchgeführt: 0,5 µg mRNA von induzierten P3HR1/16-Zellen wurden in die Reaktion eingesetzt. Anstelle des oligo-dT-Primers des Herstellers wurde nun ein genspezifischer Primer verwendet. Der Primer 3`RT hatte sich bereits in den RT-PCR-Amplifikationen als besonders geeignet erwiesen. Im Vergleich zu dem ursprünglichen oligo-dT-Primer konnte mit diesem Oligonukleotid der RT-Schritt bei einer höheren Temperatur (50 °C) und trotzdem genspezifisch durchgeführt werden. Durch den Einsatz der Primer-Kombination 3`RT und SMART-II-Oligonukleotid, konnte mit Hilfe des *SMART™PCR cDNA Synthese Systems* ein ca. 1500 bp langes BPLF1-spezifisches cDNA-Fragment amplifiziert werden. Die Amplifikation begann an Position 64547 im EBV-Genom (Startpunkt des 3`RT-Primers, 3`Bereich des Gens) und endete in Richtung 5`-Ende des Gens an Position 66097. Somit entstand ein 1550 bp langes Transkript, das *in frame* mit dem BPLF1-Leserahmen abgeschlossen wurde. Ausgehend von diesem Bereich wurde mit Primern, die weiter im 5`-Bereich des Gens lagen RT-PCRs durchgeführt. Diese Primer waren jedoch weder PCR erprobt noch war bekannt, ob sie im Bereich der BPLF1-RNA lagen. Mit keinem der weiter 5`-gelegenen Primer konnte eine Amplifikation durchgeführt und weitere Bereiche der BPLF1-cDNA, einschließlich des wahren 5`-Endes, identifiziert werden.

Das durch das *SMART*-System amplifzierte cDNA-Stück des BPLF1-Gens enthielt neben dem bereits aus der RT-PCR bekannten Anteil von 361 bp weitere 1200 bp, die sich in Richtung 5`-Ende des Gens befanden. Die genaue Sequenz des neu identifizierten BPLF1-Genabschnitts aus dem Virus-Stamm P3HR-1 ist sowohl im Anhang A.2 beschrieben, als auch in der *PubMed GenBank* unter der *Accession number* AF448803 veröffentlicht.

3.1.4 Überprüfung des Spleißens durch transiente Transfektion

Da durch RT-PCR keine entsprechende Vollänge-cDNA des BPLF1-Gens amplifziert werden konnte, sollte nun die Expression des Gens in eukaryotischen Zellen verfolgt werden. Somit konnte nicht nur die Transkription des Gens, sondern auch evtl. Spleißvorgänge getestet und Aussagen über das Protein getroffen werden. Für die transiente Transfektion wurde der gesamte Leserahmen des BPLF1-Gens (+1 bis Stopp ohne nicht translatierten Bereich) in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert (siehe Kapitel 2.3 und Anhang A.6). Unter der Kontrolle eines CMV-Promotors erlaubt dieser Vektor eine Expression des eingefügten Fremdgens in den transfizierten Zellen in großen Mengen über kurze Zeit. Bereits 24 h nach der Transfektion kann normalerweise ein biologisch aktives und teilweise posttranslationell modifiziertes Protein

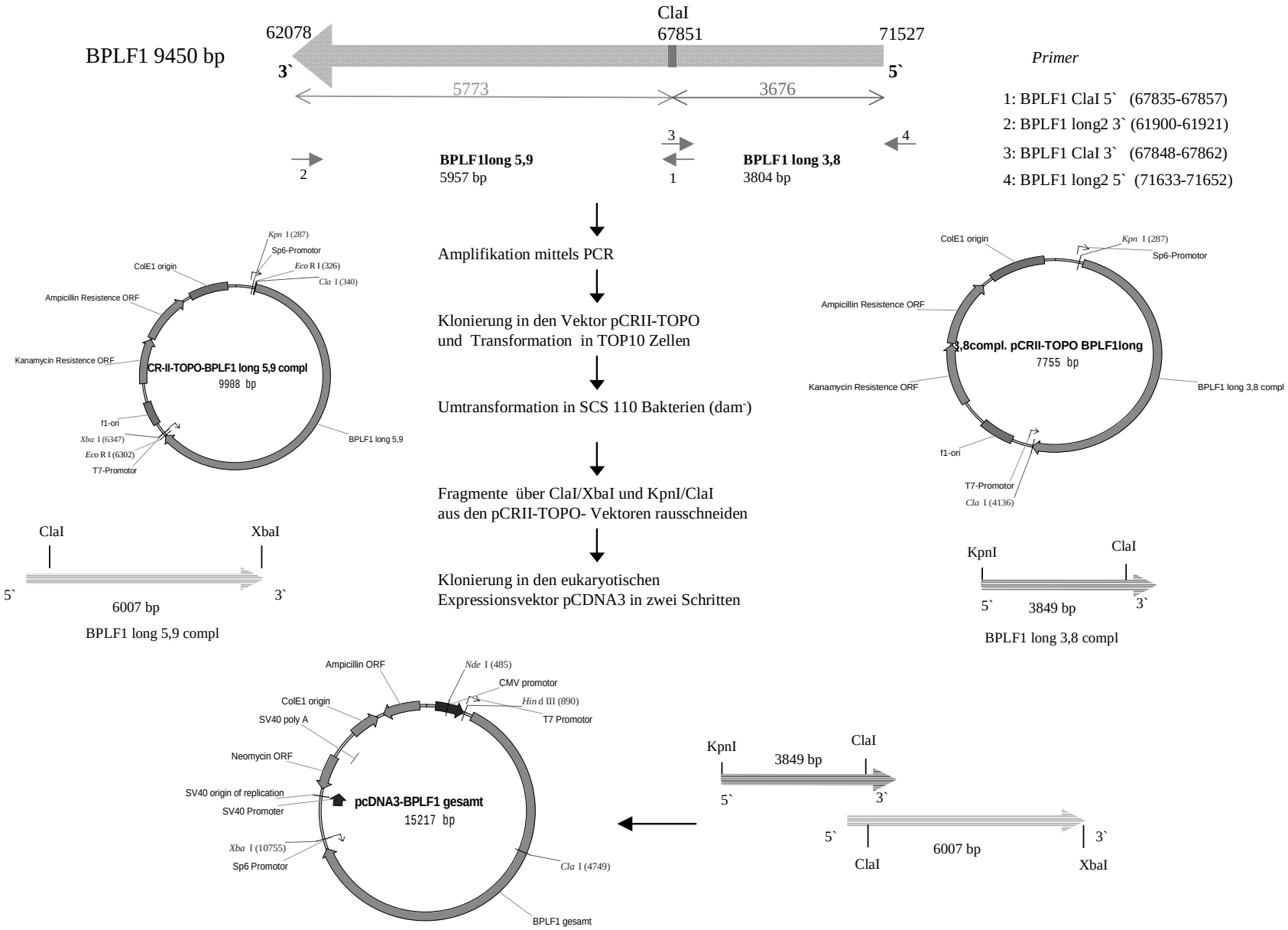
nachgewiesen werden. Neben dem CMV-Promotor besitzt dieser Vektor einen SV40 Replikationspunkt, einen SV40-Promotor und ein SV40-Polyadenylierungs-Signal. Bei den verwendeten Cos7-Zellen (siehe Kapitel 2.1.2) handelt es sich um eine Affen-Nieren-Zelllinie, die mit einem *origin*-defektem SV40-Virus transformiert wurde, welches in die chromosomale DNA der Cos7–Zellen integrierte. Deshalb produzieren Cos7-Zellen das große SV40 T-Antigen, aber keine viralen Partikel. Transfektionsplasmide, die einen SV40-*origin* tragen, replizieren hingegen in diesen Zellen in hoher Kopienzahl. Somit kann eine sehr gute Expression des eingeführten Fremdgens erreicht werden.

Aufgrund der enormen Größe des BPLF1 Gens war eine zunächst angestrebte Ein-Schritt-Klonierung des gesamten Gens mit Hilfe einer sogenannten *large*-PCR nicht erfolgreich. Trotz verschiedener Primer-Konstellationen, dem Einsatz von DMSO sowie der Optimierung von vielen Reaktionsbedingungen konnte kein positives Signal erreicht werden. Auch die Verwendung unterschiedlicher Polymerasen erlaubte keine Amplifikation des gesamten Gens. Ähnlich wie in vorangegangenen Versuchen limitierte der hohe GC-Gehalt des Gens die Synthese der knapp 10 kbp. Deshalb sollte die Klonierung des gesamten BPLF1-Gens in mehreren Schritten und mit entsprechenden Zwischenklonierungen erfolgen. Dazu wurde das gesamte Gen in zwei Abschnitte unterteilt, diese unabhängig voneinander amplifziert und nach einer Zwischenklonierung im Vektor pCR®II-TOPO über eine *ClaI*-Restriktions-Schnittstelle hintereinander in den Vektor pcDNA3 kloniert. Die Einteilung des BPLF1-Gens erfolgte in die beiden Abschnitte BPLF1 long 5,9 und BPLF1 long 3,8 (siehe Abbildung 3.9). Dabei wurde eine *ClaI*-Schnittstelle, die sich ungefähr in der Mitte des Gens (Position 67851 im EBV-Genom) befindet als möglicher Überschneidungspunkt für die Klonierung gewählt. Die Amplifikation des BPLF1 long 5,9-Abschnittes wurde mit Hilfe der *Power Script-Polymerase* (PAN Biotech, Aidenbach) und den Primern ClaI 5` und BPLF1 long2 3` (siehe Tabelle 2.2) aus dem Cosmid cMB14 wie in Kapitel 2.5.2.1 beschrieben durchgeführt. Das so erhaltene PCR-Fragment von 5957 bp wurde mittels *QIAquick®-Gel Extraction Kit* aus einem Agarosegel aufgereinigt und mittels *TOPO-TA-Cloning* in den Vektor pCR®II-TOPO kloniert. Die Transformation des resultierenden Vektors pCRII-TOPO BPLF1 long 5,9 compl.[5] erfolgte in die im Kit enthaltenen TOP10-Bakterien. Eine Umklonierung des Genbereichs in den Vektor pCDNA3 sollte mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *ClaI* erfolgen. Dieses Enzym besitzt jedoch die Eigenschaft, lediglich nicht methylierte DNA zu schneiden. Demzufolge musste das Plasmid pCRII-TOPO BPLF1 long 5,9 compl. zunächst in einen *dam*-negativen (*dam*$^-$) Bakterienstamm umtransformiert werden. Für diese Umtransformation wurde der Stamm SCS110 verwendet (siehe Kapitel 2.1.1). Plasmid-DNA aus diesen Bakterien wurde mit den Primern Sp6 und T7 sequenziert. Somit konnte neben der Orientierung des Inserts im Vektor auch die Sequenz und eventuelle Unterschiede zum Stamm B95-8, dessen Sequenz in allen Datenbanken gespeichert ist, identifiziert werden. Nach der Überprüfung des Vektors pCRII-TOPO BPLF1 long 5,9 compl. konnte der Anteil des BPLF1-Gens mit Hilfe der Restriktionsenzyme *XbaI* und *KpnI* herausgeschnitten werden und über diese beiden Schnittstellen gerichtet in den Vektor pcDNA3 eingesetzt werden. Das Fragment BPLF1 long 5,9 entspricht dem 3`-Bereich des Gens und wurde als erstes in den späteren Expressionsvektor kloniert. Die Amplifikation des BPLF1 long 3,8-Abschnittes wurde ebenfalls mit Hilfe der *Power Script-Polymerase* (PAN Biotech, Aidenbach) aus dem Cosmid cMB14 wie in Kapitel 2.5.2.1 beschrieben, durchgeführt. Als Primer dienten hier

[5] compl.: bezieht sich auf die Orientierung im pCRII-TOPO-Vektor

die Oligonukleotide BPLF1 long2 5` und Cla 3` (siehe Tabelle 2.2). Das 3804 bp große PCR-Fragment wurde nach der Aufreinigung aus einem Agarosegel in den Vektor pCR®II-TOPO mittels *TOPO-TA-Cloning* kloniert und in den Bakterienstamm TOP10 transformiert. Der resultierende Vektor 3,8 compl. PCRII-TOPO-BPLF1-long, der das Insert in der richtigen Orientierung enthielt wurde in den *dam*-negativen Bakterienstamm SCS110 umtransformiert und anschließend sequenziert. Für die Sequenzierung wurden die Primer T7 und M13 reverse eingesetzt (siehe Tabelle 2.4). Für die Klonierung in den pcDNA3 Vektor, der bereits den BPLF1-Genabschnitt 5,9 enthielt (pcDNA3-BPLF1 long 5,9) wurde das Fragment mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *ClaI* aus dem pCR®II-TOPO-Vektor herausgeschnitten. Aufgrund ähnlicher Größenverhältnisse zwischen Vektor (3950 bp) und dem Insert (3804 bp) wurde der Vektor anschliessend mit *DraI* verdaut. Dies führte dazu, dass die Vektorsequenz kleingeschnitten wurde, während die BPLF1-Sequenz, die keine *DraI*-Schnittstelle enthielt, intakt blieb. Somit konnte das Genfragment nach der Aufreinigung über ein Agarosegel in den Vektor pcDNA3-BPLF1 long 5,9 kloniert werden, der ebenfalls mit den Enzymen *KpnI und ClaI* geschnitten worden war. Das resultierende Plasmid (pcDNA3-BPLF1 gesamt, 15217 bp) wurde in den Bakterienstamm DH5α transformiert und dort sowohl über Restriktionsverdau charakterisiert, als auch sequenziert. Für die Sequenzierung wurden die Primer Seq1 bis Seq12 (siehe Tabelle 2.4) eingesetzt. Aufgrund des hohen GC-Gehaltes des Gens mussten auch für die Sequenzierungen die Bedingungen optimiert werden. Mit Hilfe des Computerprogramms *SEQMAN II* (*DNASTAR`s SEQuence project MANager*) konnten anschließend die einzelnen überlappenden Sequenzierungen aneinandergereiht werden und als eine resultierende Sequenz mit der Datenbank-Sequenz des B95-8-Stammes verglichen werden. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte einige Unterschiede, zwischen dem aus dem Cosmid cMB14 amplifizierten BPLF1-Gen (Virus-Stamm M-ABA) und der Sequenz des B95-8-Stammes. Sequenzunterschiede zwischen diesen beiden Stämmen waren bereits bekannt und bestätigten sich auch bei dieser Klonierung. So stellte sich heraus, dass in der Sequenz des cMB14-Cosmids neben verschiedenen Punktmutationen auch ein Einschub von 90 Basen im Prolin-Bereich des BPLF1-Gens vorhanden ist. Innerhalb der BPLF1-Gensequenz des B95-8-Stammes befinden sich im Genombereich 70521 bis 70402 *Repeat*-Sequenzen folgender Art: CCTC(C/T)GCGGC(C/T)CCGG. Diese Sequenzwiederholungen sind in der B95-8-Sequenz insgesamt 8 mal vertreten, wohingegen sie in der cMB14-Sequenz 14 mal gefunden werden konnte. Über die Funktion dieser Prolin-reichen Region ist bislang nichts bekannt. Ein Vergleich der beiden BPLF1-Gensequenzen ist im Anhang A.1 dargestellt. Die BPLF1-Gensequenz des Virus-Stammes M-ABA wurde in der *PubMed GenBank* unter der *Accession number* AF448220 veröffentlicht.

Abbildung 3.9 Klonierung des gesamten BPLF1-Gens in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 Das Schema zeigt die schrittweise Klonierung des gesamten BPLF1-Gens mit den beiden Zwischenprodukten pCRII-TOPO BPLF1 long 5,9 compl und 3,8 compl. PCRII-TOPO-BPLF1-long. Das resultierende Plasmid pcDNA3-BPLF1 gesamt enthält die vollständige BPLF1-Gensequenz unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und konnte somit für transiente Transfektionen in Cos7-Zellen eingesetzt werden.


BPLF1 9450 bp
62078
ClaI
67851
71527
3`
5`
5773
3676
Primer
1: BPLF1 ClaI 5` (67835-67857)
2: BPLF1 long2 3` (61900-61921)
3: BPLF1 ClaI 3` (67848-67862)
4: BPLF1 long2 5` (71633-71652)
2
BPLF1long 5,9
5957 bp
3
1
4
BPLF1 long 3,8
3804 bp
Amplifikation mittels PCR
Klonierung in den Vektor pCRII-TOPO
und Transformation in TOP10 Zellen
Umtransformation in SCS 110 Bakterien (dam-)
Fragmente über ClaI/XbaI und KpnI/ClaI
aus den pCRII-TOPO- Vektoren rausschneiden
Klonierung in den eukaryotischen
Expressionsvektor pCDNA3 in zwei Schritten
Kpn I (287)
Sp6-Promotor
Eco R I (326)
Cla I (340)
ColE1 origin
Ampicillin Resistence ORF
Kanamycin Resistence ORF
CR-II-TOPO-BPLF1 long 5,9 compl
9908 bp
f1-ori
Xba I (6347)
Eco R I (6302)
T7-Promotor
BPLF1 long 5,9
ClaI
XbaI
5`
3`
6007 bp
BPLF1 long 5,9 compl
ColE1 origin
Kpn I (287)
Sp6-Promotor
Ampicillin Resistence ORF
3,8compl. pCRII-TOPO BPLF1long
7755 bp
Kanamycin Resistence ORF
BPLF1 long 3,8 compl
f1-ori
T7-Promotor
Cla I (4136)
KpnI
ClaI
5`
3849 bp
3`
BPLF1 long 3,8 compl
Ampicillin ORF
Nde I (485)
CMV promotor
ColE1 origin
Hin d III (890)
T7 Promotor
SV40 poly A
Neomycin ORF
SV40 origin of replication
pcDNA3-BPLF1 gesamt
15217 bp
SV40 Promoter
Xba I (10755)
Sp6 Promotor
Cla I (4749)
BPLF1 gesamt
KpnI
ClaI
3849 bp
5`
3`
5`
3`
6007 bp
ClaI
XbaI

Das so erzeugte Plasmid, welches das gesamte BPLF1-Gen enthielt, konnte nun für transiente Transfektionsexperimente eingesetzt werden. Dabei wurde die Transfektion in Cos7-Zellen mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitation wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben durchgeführt. Bei dieser Technik wird die DNA in Form von feinkörnigen Calciumphosphat-Präzipitaten auf die Zellen aufgebracht und von diesen durch Endocytose aufgenommen. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 72 h weiterkultiviert. In parallelen Ansätzen wurden die Zellen zusätzlich 72 h nach der Transfektion für weitere 24 h mit je 1/1000 Volumen TPA und BS und 1/20 Volumen TGFß* induziert (siehe Kapitel 2.4.2), um die Aktivität des CMV-Promotors nochmals zu erhöhen. Nach 3 bzw. 5 Tagen (mit Induktion) konnten die transient transfizierten Zellen sowohl zur Analyse der RNA, als auch zur Identifikation des BPLF1-Proteins eingesetzt werden. Mit Hilfe von Northernblot-Analysen sollte zunächst eine Aussage darüber getroffen werden, wie groß die transkribierte RNA ist und ob sie tatsächlich, wie in vorangegangenen Northernblot-Analysen gezeigt, gespleißt wird. Dazu wurde sowohl Gesamt-RNA als auch mRNA der transfizierten und nicht transfizierten (Negativkontrolle), bzw. induzierten und nicht induzierten Zellen präpariert (siehe Kapitel 2.6.1). Als zusätzliche Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit Puffer transfiziert worden waren. Für die Detektion eines BPLF1-spezifischen Signals wurde die *in vitro* transkribierte radioaktiv markierte RNA-Sonde BPLF1-361-*antisense* verwendet (siehe Kapitel 3.1.2). Abbildung 3.10 zeigt die Ergebnisse der Northernblot-Hybridisierung.

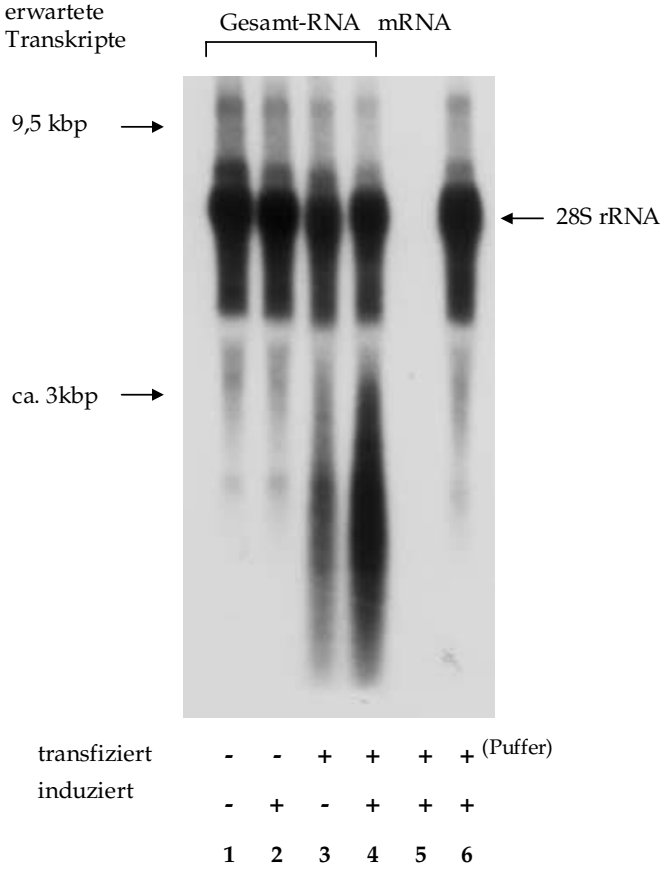


Abbildung 3.10 Northernblot-Analyse der transfizierten Cos7-Zellen. Cos7–Zellen wurden mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3-BPLF1-gesamt, der das komplette BPLF1-Gen enthielt, transfiziert und teilweise mit TPA/BS/TGFß* induziert. Je 20 µg Gesamt-RNA bzw. 10 µg mRNA der transfizierten/nicht transfizierten und induzierten/nicht induzierten Cos 7-Zellen wurden in die Northernblot-Analyse eingesetzt. Zur Detektion des BPLF1-Transkripts wurde die *in vitro* transkribierte, radioaktiv markierte RNA-Sonde BPLF1-361-*antisense* eingesetzt. Die Spuren 3 und 4 zeigen einen BPLF1-spezifischen „Schmier“, dessen Menge durch Induktion der Zellen mit TPA/BS/TGFß* gesteigert wird (Spur 4). Die Negativkontrollen (Spur 1, 2 und 6) weisen diesen „Schmier“ nicht auf. In der aufgereinigten mRNA (Spur 5) wurde kein Signal detektiert, was auf eine fehlende Polyadenylierung der transkribierten RNA hindeutet.

Das Experiment zeigt, dass in den Cos7-Zellen kein BPLF1-Transkript synthetisiert wurde, das in einer definierten Bande resultierte. Neben der Kreuzhybridisierung mit der 28S rRNA, die in allen Ansätzen auftrat, konnte in den transfizierten/nicht-induzierten (Spur 3) bzw. transfizierten/induzierten Cos7-Zellen (Spur 4) ein BPLF1-spezifischer "Schmier" nachgewiesen werden. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass nach erfolgreicher Transfektion von dem eingeführten Plasmid zwar RNAs initiiert wurden, diese aber nicht einheitlich lang waren und vermutlich auf einem frühzeitigen Abbruch der Transkription beruhten. Die Menge des BPLF1-RNA-Gemisches und damit eine Steigerung der Transkription des transfizierten Plasmids konnte durch die Induktion der Zellen mit TPA/BS und TGFß* erhöht werden (Vergleich Spur 3 und 4). In den Kontrollen, d.h. in den nicht transfizierten (Spuren 1 und 2) bzw. lediglich mit Puffer transfizierten Zellen (Spur 6) wurde kein BPLF1-spezifisches Signal detektiert. Um sicherzustellen, dass der in den transfizierten Zellen detektierte "Schmier" nicht von der Induktion herrührte, wurde auch eine Negativkontrolle mit TPA/BS/TGFß* induziert (Spur 2) und zeigte kein Signal. Spur 5, welche die mRNA aus den Zellen repräsentierte, zeigte ebenso kein Signal. Ursache hierfür konnte ebenfalls eine frühe Termination der Transkription sein.

Neben der RNA sollte auch das Molekulargewicht des BPLF1-Proteins bestimmt werden. Aufgrund der unvollständigen RNA-Transkription war jedoch kein Translationsprodukt entsprechender Größe zu erwarten. Proteinextrakte transfizierter Zellen wurden auf ein niederprozentiges SDS-Gel (max. 8 %) aufgetragen und mit Hilfe der *Coomassie*-Färbung angefärbt. Da von einem ca. 300 kDa großen Protein ausgegangen wurde, wurde neben der niedrigen SDS-Konzentration auch eine spezielle Apparatur mit einer sehr langen Laufstrecke gewählt. Durch diese Bedingungen sollte gewährleistet werden, dass das Protein in das Gel einlaufen konnte und nicht in den Taschen zurückgehalten wird bzw. dass eine Auftrennung der Proteine in diesem hohen Größenbereich überhaupt erfolgte. Wie erwartet konnte jedoch in den *Coomassie*-Gelen keine prominente Proteinbande detektiert werden, die eine Bestimmung des Molekulargewichts zuließ (Daten nicht gezeigt).

3.2 Das BPLF1-Protein

3.2.1 Das BPLF1-Protein - eine Datenbank-Analyse

Die Funktion des BPLF1-Gens ist bislang ungeklärt. Nachdem durch RT-PCR und Northernblot-Analysen nachgewiesen werden konnte, dass das BPLF1-Gen während der späten Phase der viralen Replikation transkribiert wird, stellte sich nun die Frage, ob von dieser RNA auch ein Protein translatiert wird. Um erste Aussagen über das Protein treffen zu können, wurden zunächst verschiedene Datenbank-Analysen durchgeführt. Der *ExPASy Molecular Biology Server* (*Expert Protein Analysis System*, http://www.expasy.ch) des *Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)* stellte dazu neben einigen Protein-Datenbanken (z.B. SWISS-PROT und TrEMBL) auch verschiedene Werkzeuge zur Identifikation und Aufklärung der Proteinstruktur zur Verfügung.

Erste Aussagen bezüglich der Primärstruktur des Proteins lieferte das Program *ProtParam*. Die Ergebnisse der Computeranalyse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Mit einer Länge von 3149 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca 337 kDa handelt es sich bei BPLF1 um ein sehr großes Protein. Die Halbwertszeit des Proteins wurde nach der Methode von Bachmair (Bachmair *et al*. 1986) berechnet. Diese Methode macht die Stabilität eines Proteins von der N-terminalen Aminosäure-Zusammensetzung und der damit verbundenen Degradierung über den Ubiquitin-vermittelten Weg abhängig (*N-end rule*). Der Instabilitäts-Index (Methode nach Guruprasad; Guruprasad *et al*., 1990) definierte das BPLF1-Protein als instabil.

Tabelle 3.1 Analyse der Primärstruktur des BPLF1-Proteins. In der Tabelle sind die Eigenschaften des BPLF1-Proteins aufgelistet, die mit Hilfe des Programs ProtParam *erstellt wurden*

Parameter	
BPLF1-Protein	Large Tegument Protein von EBV
SWISS-PROT-Datenbank-Kennung	TEGU_EBV (P03186)
Anzahl der Aminosäuren	3149
Molekulargewicht	337959,4 Da
Theoretischer pI	5,63
N-Terminus	Methionin
Halbwertszeit (Bachmair *et al*., 1986)	30 Stunden (Säugetier-Retikulocyten, *in vitro*)
	>20 Stunden (Hefe, *in vivo*)
	>10 Stunden (E.coli, *in vivo*)
Instabilitätsindex (II) (Guruprasad *et al*., 1990)	instabil

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Sekundärstruktur und möglichen posttranslationellen Modifikationen des BPLF1-Proteins. Dazu wurden mit dem Program *PSORT* zunächst offensichtliche Signal-Sequenzen und Lokalisierungsstellen identifiziert. Abbildung 3.11 gibt schematisch einen Überblick über die wichtigsten Modifikationen. Aufgrund dieser Analysen wurde eine Lokalisation des BPLF1-Proteins im Kern angenommen. Verschiedene Kernlokalisationssignale konnten identifiziert werden (siehe Abbildung 3.11). Besonders auffällig erschien eine Prolin-reiche Sequenz im Bereich der

Aminosäuren 452 bis 606. Außer einem *ER Membran Retentions-Signal* (KFLY) im C-Terminus des Proteins konnten keine weiteren Erkennungs-Sequenzen gefunden werden[6], die einen Hinweis auf die Bestimmung des Proteins lieferten. Des weiteren wurden weder DNA- noch RNA-Bindemotive identifiziert. Neben den drei N-Glykosylierungsstellen, die auch in Abbildung 3.11 dargestellt sind, konnten mit Hilfe des Computerprogramms *ProfileScan* weitere zahlreiche Signalsequenzen gefunden werden: 8 Phosphorylierungsstellen für eine cAMP- bzw cGMP–abhängige Protein-Kinase, 36 Sequenzabschnitte für die Protein-Kinase C, 58 Casein-Kinase II-Phosphorylierungsstellen und eine Tyrosin-Kinase-Phosphorylierungs-Sequenz. In Abbildung A.3 des Anhangs sind weitere Analysen zusammengefasst, die einen Überblick liefern über z.B. sehr hydrophile bzw. hydrophobe Bereiche (Analyse nach *Kyte-Doolittle*), über Transmembranregionen bzw. Oberflächenwahrscheinlichkeit und über besonders antigene Bereiche des Proteins (*Antigenic Index* nach Jameson and Wolf)

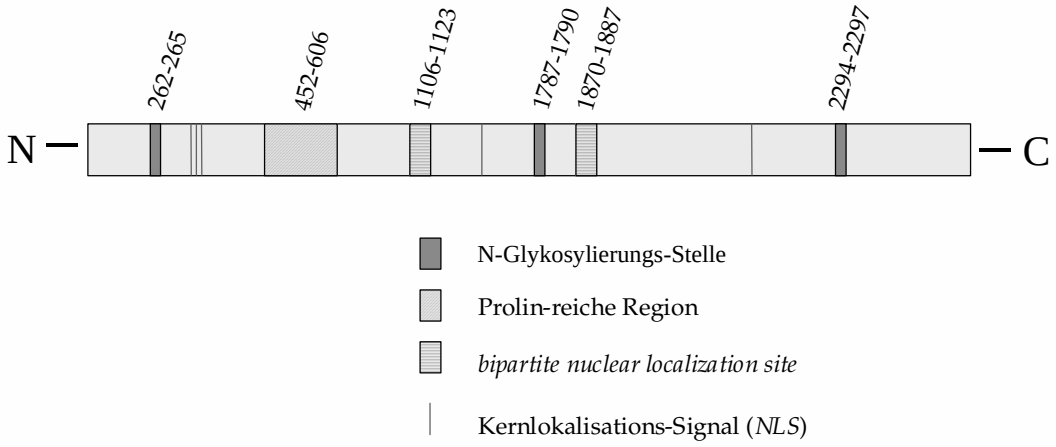


Abbildung 3.11 Schematische Übersicht über mögliche posttranslationelle Modifikationen des BPLF1-Proteins. Neben den drei N-Glykosylierungsstellen und der Prolin-reichen Region im Aminoterminus des Proteins, konnten zahlreiche Kernlokalisations-Signale detektiert werden. Jeweils zwei *bipartite nuclear localization signals* an Aminosäure-Position 1106 (KKQKELETTRENEKRLR) und 1870 (KRVAGGKETVADWKRRL) sowie folgende Kernlokalisations-Signale an Position 412 (PKRK und PKRKKGL), 413 (KRKK), 2085 (RRRR), 409 (PQTPKRK), und 1340 (PGKLKKR).

Um Angaben über die mögliche Funktion des BPLF1-Proteins machen zu können, wurden Homologien zu anderen herpesviralen Proteinen untersucht, deren Funktion bereits bekannt war. In der SWISS-PROT-Datenbank wurde BPLF1 in eine Reihe anderer herpesviraler Proteine wie z.B. HSV1 UL 36 (VP1/2), EHV1 ORF24, HVS1 ORF64, VZV ORF22 und HCMV UL48, eingereiht. Literatur-Recherchen lieferten den Hinweis, dass eine 30 %ige Homologie zwischen BPLF1 und dem VP16-Protein von Herpes Simplex Virus 1 existiert (Roizman und Sears, 1996). Eigene Datenbank-Analysen dieser beiden Proteine konnten die Aussage bedingt bestätigen. Es wurde deutlich, dass ein

[6] weitere mögliche Signalsequenzen: ER-Retentions-Motiv, Peroxisomen-Zielsignal, ein Motiv für den Transport von der Zelloberfläche zum Golgi-Apparat

Homologievergleich der beiden Proteine über die gesamte Aminosäure-Sequenz nur wenig aussagekräftig ist, da VP16 und BPLF1 starke Größenunterschiede aufweisen (siehe Abbildung 3.12.)

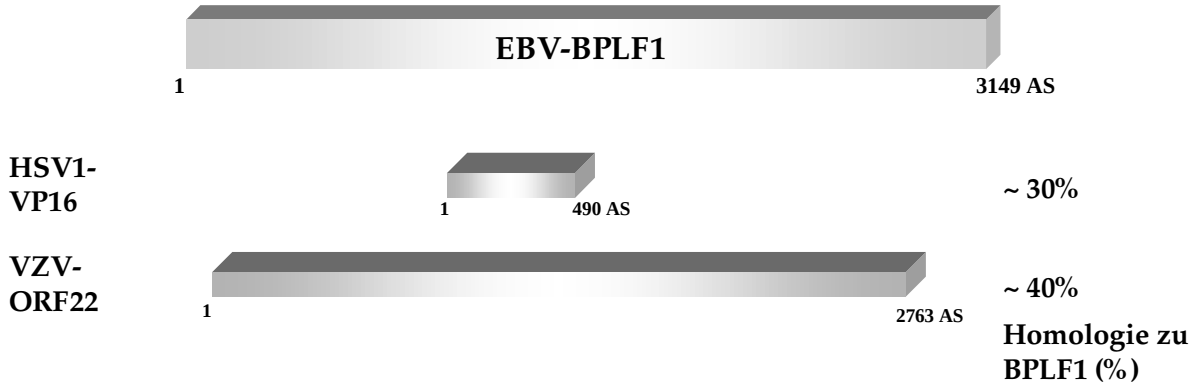


Abbildung 3.12 Homologie-Vergleich von BPLF1 mit anderen herpesviralen Proteinen. Die herpesviralen Proteine VP16 von HSV1 und ORF22 von VZV zeigten Homologien zu BPLF1 von 30 % bzw. 40 %.

Ein Homologie-Vergleich mit einem weiteren herpesviralen Protein, dem VZV-ORF22-Protein von Varizella Zoster, offenbarte eine 40 %ige Homologie zu BPLF1. Ähnliche Größenverhältnisse der beiden Proteine erlaubten einen Vergleich über die gesamte Aminosäuresequenz. Leider konnten aus diesen Vergleichen jedoch keine Erkenntnisse bezüglich der Funktion von BPLF1 gewonnen werden. Denn auch über das VZV-Protein und seine Funktion wurde bislang nichts in der Literatur beschrieben. Einen möglichen Hinweis auf die Funktion des BPLF1- und VZV-ORF22-Proteins lieferte die SWISS-PROT-Datenbank, die den beiden Proteinen, zusammen mit dem Leserahmen UL48 von HCMV und UL36 von HSV1, eine Funktion als Tegumentprotein zuordnete. Ergebnisse aus der RT-PCR und den Northernblot-Analysen zeigten, dass BPLF1, ähnlich wie VP16, sehr spät während der viralen Replikation transkribiert wird. Dies deutete darauf hin, dass auch das BPLF1-Genprodukt erst spät während des viralen Vermehrungszyklus in das Tegument des reifen Viruspartikels verpackt werden könnte.

Im Gegensatz zu BPLF1 wurden die Funktionen und die dafür notwendigen Protein-Domänen des VP16-Proteins bereits ausführlich untersucht und sind in der Literatur genau beschrieben. Deshalb wurden detailliertere Datenbank-Analysen mit den beiden Proteinen durchgeführt, die funktionell wichtige Abschnitte des VP16-Proteins genauer untersuchten. Innerhalb des VP16-Proteins lassen sich zwei funktionelle Bereiche unterteilen: die carboxyterminale Aktivierungsdomäne und die *VIC*-Domäne (*VIC: VP16 induced complex*), die zur Ausbildung des Multiproteinkomplexes mit den beiden zellulären Faktoren Oct-1 und HCF benötigt wird. Innerhalb dieser *VIC*-Domäne sind zwei weitere Aminosäure-Bereiche bekannt, die maßgeblich an der Ausbildung des Multiproteinkomplexes beteiligt sind. Diese beiden Bereiche, sowie die Aktivierungsdomäne des VP16-Proteins wurden mit dem BPLF1-Protein in einem Computer-Vergleich untersucht. Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse des Homologie-Vergleichs und macht deutlich, dass über kurze Aminosäure-Abfolgen starke Homologien zwischen den beiden Protein nachweisbar sind. Die Anordnung der einzelnen Domänen ist

jedoch bei BPLF1 genau entgegengesetzt zu der bei VP16 und geht nur über außerordentlich kurze Aminosäure-Folgen. Eine Aussage bezüglich funktionell wichtiger Abschnitte des BPLF1-Gens ist somit kaum möglich und muss auf jeden Fall experimentell überprüft werden, auch wenn diese Datenbank-Analysen Hinweise darauf geben, dass Ähnlichkeiten zwischen BPLF1 und VP16 vorhanden sind. Eine funktionelle Ähnlichkeit zu dem bislang nicht charakterisieren Leserahmen VZV-ORF22 scheint jedoch aufgrund der besseren Homologie relevanter.

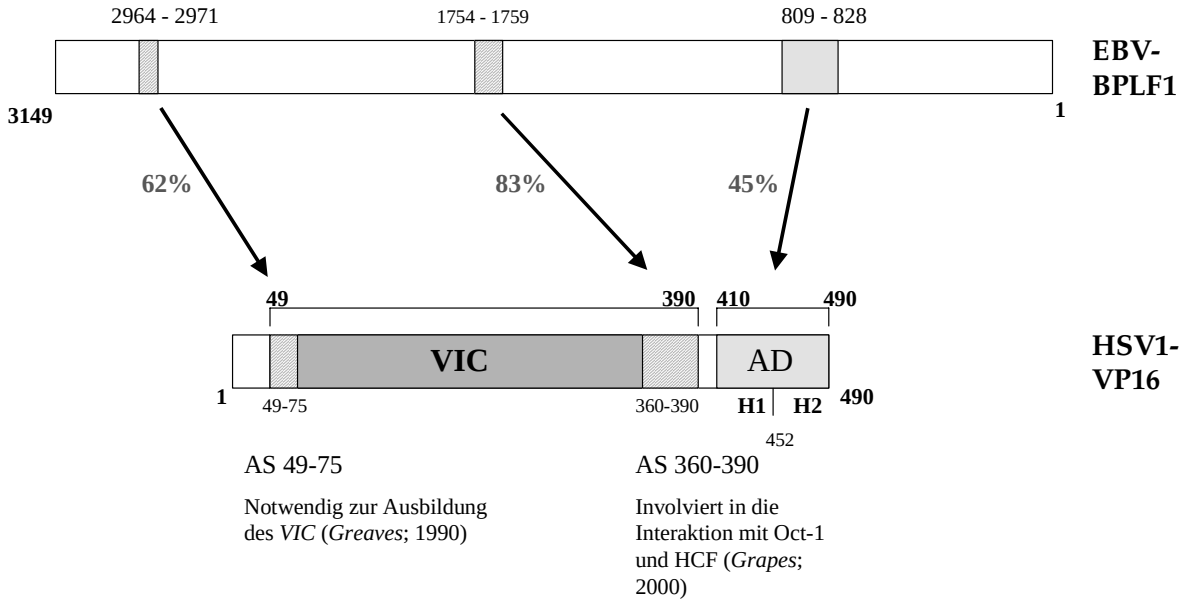


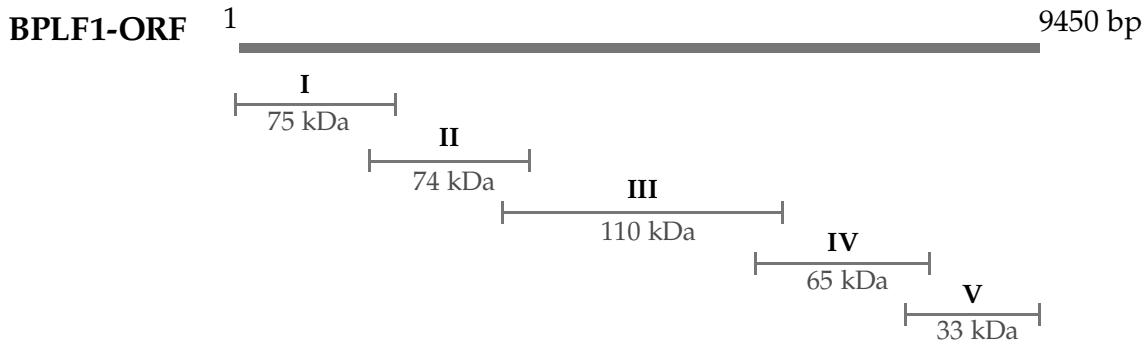
Abbildung 3.13 Homologie-Vergleich wichtiger funktioneller Domänen des VP16-Proteins mit dem gesamten BPLF1-Protein. Das VP16-Protein kann in zwei funktionell wichtige Bereiche gegliedert werden: die carboxyterminale Aktivierungsdomäne AD (AS 410-490) und die aminoterminale *VIC*[7]-Domäne (AS 49-390), die zur Ausbildung eines Multiproteinkomplexes mit den beiden zellulären Faktoren Oct-1 und HCF benötigt wird. Ein Sequenz-Vergleich dieser wichtigen Domänen mit dem gesamten BPLF1-Protein zeigte starke Homologien zwischen den beiden Proteinen über kurze Bereiche (Homologie-Angaben in %).

[7] VIC: *VP16 induced complex*

3.2.2 Der indirekte Nachweis des BPLF1-Proteins durch Westernblot-Analysen mit verschiedenen humanen Patientenseren

Nachdem die Computeranalysen erste Hinweise auf die Eigenschaften des Proteins lieferten, sollte das Makromolekül nun auch experimentell charakterisiert werden. Die Vorversuche hatten gezeigt, dass eine ca. 3 kbp große polyadenylierte BPLF1-RNA existiert, von der mit hoher Wahrscheinlichkeit auch ein Protein translatiert wird. Der Nachweis dieses Proteins stand deshalb im Mittelpunkt der experimentellen Charakterisierung. Die übliche Vorgehensweise zum direkten Nachweis des Proteins mit Hilfe von Westernblot-Analysen konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da für BPLF1 keine spezifischen Antikörper zur Verfügung standen. Um trotzdem einen Eindruck davon zu erhalten, ob das BPLF1-Protein *in vivo* synthetisiert wird, wurde zunächst ein indirekter Nachweis angestrebt. Bakteriell exprimiertes BPLF1 sollte als Antigen in Westernblot-Analysen eingesetzt und mit humanen Patientenseren als Primärantikörper überprüft werden. Die Detektion eines positiven Signals gab einen Hinweis darauf, dass Antikörper gegen das Protein in verschiedenen Patienten vorhanden waren und dass BPLF1 *in vivo* exprimiert wird. Vor diesen Westernblot-Analysen musste jedoch zunächst das als Antigen verwendete BPLF1-Protein synthetisiert und aufgereinigt werden. Die einzelnen Schritte der Synthese sind im folgenden detailliert beschrieben.

Aufgrund seiner Größe konnte das BPLF1-Protein nicht in seiner Gesamtheit in Bakterien exprimiert und daraus aufgereinigt werden. Daher wurde das gesamte Gen in 5 überlappende Abschnitte unterteilt (siehe Abbildung 3.14). Die Aufteilung des Proteins erfolgte mit Hilfe von Computeranalysen nach dem *Antigenic*-Index von Jameson und Wolf (siehe Anhang A.3). Demnach wurden besonders antigene Bereiche auf einem Fragment zusammengefasst und für die Expression in einen geeigneten bakteriellen Expressionsvektor kloniert. In Vorexperimenten wurde versucht, alle 5 Fragmente des BPLF1-Proteins als *His-tag*-Fusionsproteine in Bakterien zu exprimieren. Es stellte sich jedoch heraus, dass dieses System für die Expression von BPLF1 nicht geeignet war. Lediglich die Produktion und Aufreinigung des BPLF1-Fragments II, das Homologie zur carboxyterminalen Aktivierungsdomäne von VP16 aufweist (siehe Abbildung 3.13 As 809-828), war in geringen Mengen möglich und konnte für erste Vorversuche eingesetzt werden. In Westernblot-Analysen mit Serum von Patienten, die an EBV-assoziiertem NPC erkrankt waren, lieferte dieses Fragment positive Signale und damit einen ersten Hinweis auf die Existenz des BPLF1-Proteins *in vivo* (Daten nicht gezeigt).



Fragment	Größe in Basenpaaren	Größe in Aminosäuren	Größe in Kilodalton	Position in Nukleinsäuresequenz	Position im Genom
I	2057	686	75	1-2057	71527 – 69470
II	2024	675	74	1995-4019	69532 – 67508
III	3000	1000	110	3963-6963	67564 – 64564
IV	1772	590	65	6861-8635	64658 – 62885
V	899	300	33	8541-9450	62977 – 62079

Abbildung 3.14 Aufteilung des gesamten BPLF1-Proteins in 5 überlappende Fragmente. Im oberen Teil der Abbildung ist schematisch die Aufteilung des BPLF1-Leserahmens in die 5 überlappenden Fragmente I bis V dargestellt. Die Einteilung erfolgte nach dem *Antigenic-Index* von Jameson und Wolf (siehe Anhang A.3). In rot ist jeweils die Größe der einzelnen Fragmente in kDa angegeben. Der untere Teil der Abbildung zeigt eine Tabelle mit den wichtigsten Eigenschaften der einzelnen Fragmente.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen und weitere Humanseren auf das Vorhandensein von BPLF1-spezifischen Antikörpern testen zu können, sollte das BPLF1-Fragment II nun in einem anderen Expressionssystem produziert werden. Als erfolgreich erwies sich die Produktion von BPLF1 in Form eines Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteins[8]. Diese Methode erlaubte nicht nur eine schnelle und produktive Expression des Proteins in Bakterien, sondern ermöglichte auch eine effektive und spezifische Aufreinigung des Proteins über den GST-Fusionsanteil. Bei GST handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Protein von ca. 26 kDa, das sich in Bakterien mit seiner vollen enzymatischen Aktivität exprimieren lässt. Ebenso wie der *His-tag* kann das GST-Protein in allen Expression-Systemen verwendet werden und stabilisiert dabei die Faltung des rekombinanten Proteins. Mit GST als Partner bilden die entstehenden Fusionsproteine meist Dimere aus. Die Detektion des GST-Proteins kann mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers in Enzym- oder Immuno-Assays durchgeführt werden. Zu dem Glutathion-S-Transferase-System gehören eine Reihe von pGEX-Vektoren. Für die Expression des

[8] GST: Glutathion-S-Transferase von *Schistosoma japonicum* (Smith und Johnson, 1988)

BPLF1-Fragments II wurde der Vektor pGEX2T ausgewählt (siehe Anhang A.4). Dieser Vektor eignete sich besonders für die Expression des BPLF1-Proteins, da er aufgrund seines *tac*-Promotors gezielt durch das Lactose Analogon IPTG (Isopropyl-ß-D-Thiogalactosid) induziert werden konnte. Die Klonierung des BPLF1-Inserts erfolgte über die *BamHI*-Schnittstelle der *multiple cloning site* des Vektors. Somit war gewährleistet, dass das Insert *in frame* mit einer Erkennungssequenz für die Thrombin-Protease kloniert wurde. Diese Erkennungssequenz, die sich zwischen dem GST-Anteil und dem Fremdgen befindet, erlaubte später die Abspaltung des Fusionsanteils von dem gesuchten Protein. Die Klonierung des BPLF1-Fragment II erfolgte auf folgende Art und Weise: Mit Hilfe der Polymerase *Ampli Taq Gold*™ wurde das BPLF1-Insert zunächst aus dem Cosmid cMB14 amplifiziert (siehe Kapitel 2.5.2.1). Als Primer für die PCR-Amplifikation dienten die Oligonukleotide BPLF1-II 5` und BPLF1-II 3` (siehe Tabelle 2.2). Beide Oligonukleotide trugen an ihren 5`-Enden je eine *BglII*-Schnittstelle, die eine direkte Klonierung in den Vektor pGEX2T erlaubten. Nach der Aufreinigung des PCR-Produktes über ein Agarosegel mit Hilfe des *QIAquick®-Gel-Extraction-Kits*, wurde das BPLF1-Fragment mit der Restriktionsendonuklease *BglII* nachgeschnitten, um entsprechende überhängende Enden zu generieren. Der Zielvektor pGEX2T wurde mit *BamHI* geschnitten und mit dem Insert ligiert. Da es sich bei den beiden Restriktionsenzymen um sogenannte Isoschizomere handelt, erlaubte diese Vorgehensweise die Klonierung des BPLF1-Fragment II über die *BamHI*-Schnittstelle des Vektors. Die beiden Schnittstellen *BglII* und *BamHI* wurden durch diese Klonierung zerstört. Der resultierende Vektor pGEX2T-BPLF1/II (siehe Anhang A.6) konnte schließlich nach Transformation in einen geeigneten Bakterienstamm zur Synthese des BPLF1-Proteinfragments II eingesetzt werden.

Die Proteinexpression erfolgte in dem Bakterienstamm TOPP3. Dieser Stamm leitet sich nicht von dem Sicherheitsstamm *E.coli* K12 ab und eignet sich besonders für die Produktion schwer exprimierbarer Proteine. Nach einigen Vorversuchen, in denen zunächst optimale Bedingungen für die Proteinexpression ausgetestet worden waren (z.B. die richtige Induktionsdichte, IPTG-Konzentration, Induktionsdauer oder Induktionstemperatur), erfolgte die Expression wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben. Abbildung 3.15 zeigt das Ergebnis der Expression. Durch Induktion der Bakterien mit dem Laktose-Analogon IPTG konnte die Expression des ca. 100 kDa großen BPLF1-Proteinfragments sehr gut induziert werden (Vergleich Spur 2 nicht induziert und Spur 4 induziert).

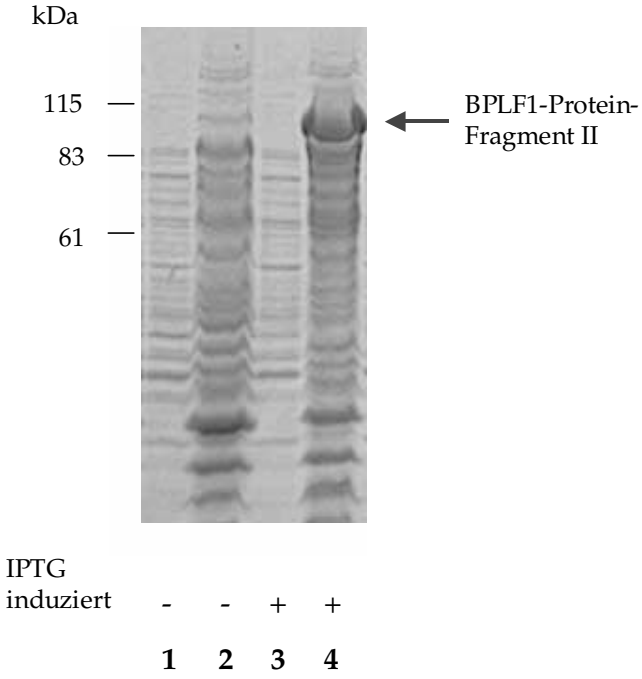


Abbildung 3.15 *Coomassie*-Gel zur Überprüfung der Expression des BPLF1-Fragment II in TOPP3-Bakterien. Nach der Expression wurden die Bakterien geerntet, mittels Lysozym- und Ultraschall-Behandlung lysiert und durch Zentrifugation bakterielle Zellbestandteile von löslichen Proteinen im Überstand getrennt. Niederschlag und Überstand wurden jeweils 1:1 mit 2x SDS-Auftragspuffer versetzt, auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und mittels *Coomassie*-Färbung überprüft. Die Spuren 1 und 3 zeigen jeweils die Überstände mit den löslichen Proteinen, die Spuren 2 und 4 zeigen die unlöslichen Bestandteile. Durch die Induktion mit IPTG konnte eine sehr gute Expression des ca. 100 kDa Proteinfragments BPLF1-II erreicht werden (Vergleich Spur 2 nicht induziert und Spur 4 induziert; durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet)

Nachdem eine gute Expression des BPLF1-Proteinfragments in den TOPP3 Bakterien erreicht werden konnte (siehe Abbildung 3.15, Spur 4 und Westernblot-Analysen mit einem GST-spezifischen Antikörper, Daten nicht gezeigt), erfolgte die Aufreinigung des Proteins in zwei Schritten. Dabei wurde das Protein in einem ersten Schritt einer Affinitätsreinigung unterzogen. Mit Hilfe der *Glutathion-Sepharose™ 4B* konnte das Protein spezifisch über den GST-Fusionsanteil aufgereinigt werden. Im zweiten Reinigungsschritt wurden mit Hilfe der *Prep-Cell-Page®* weitere Verunreinigungen bzw. kleinere Abbauprodukte entfernt. Durch diese beiden Reinigungen konnte letztendlich ein spezifisches GST-BPLF1-Proteinfragment definierter Größe erhalten werden, das sich für den Einsatz in Westernblot-Analysen hervorragend eignete. Vor dem ersten Reinigungsschritt mussten die Bakterienzellen mit dem exprimierten Fusionsprotein geerntet und aufgeschlossen werden. Dabei stellte sich heraus, dass dieser Schritt mit äußerster Sorgfalt durchgeführt werden musste. Denn es war besonders wichtig, das Protein in einer löslichen Form zu erhalten, so dass in der weiteren Aufreinigung eine Bindung zwischen dem Protein und der *Glutathion-Sepharose™4B* erfolgen konnte. In den Original-Beschreibungen des pGEX-Systems wurde dargelegt, dass die mit diesem System exprimierten Proteine meist löslich sind. Andere Literaturhinweise (Frangioni und Neel, 1993) und eigene Vorversuche (siehe Abbildung 3.15, Vergleich Spur 3 und 4) zeigten jedoch, dass selbst sehr kleine Proteine von nur 40 – 50 kDa nicht in löslicher Form erhalten werden konnten. Darum wurde diesem Schritt besonderes Augenmerk zuteil und er ist im folgenden detailliert beschrieben.

Die Ernte und die darauf folgende Lyse der Bakterien mittels Lysozym-Behandlung erfolgte wie in Kapitel 2.6.3.1 beschrieben. Dabei stellte sich heraus, dass die Lysozym-behandelte Bakteriensuspension sofort weiterverarbeitet werden mußte. Eine Lagerung der

Suspension bei z.B. –80 °C erwies sich als nicht sinnvoll, da dabei die Bakterien vollständig lysierten. Dem Lysozym-Verdau folgte eine Ultraschall-Behandlung im Becherresonanz-Bad. Auf eine Beschallung mit der Nadelsonde wurde bewußt verzichtet, da eine zu lange bzw. zu heftige Beschallung zur Denaturierung und Aggregation des Proteins und damit zur Ausbildung von unlöslichen *inclusion bodies*, führen konnte. Zusätzlich mussten folgende Punkte berücksichtigt werden: Vor der Ultraschall-Behandlung musste der Lysozym-behandelten Bakteriensuspension zunächst DTT zugegeben werden (Endkonzentration 5 mM). Dadurch konnte die spätere Bindung des exprimierten Fusionsproteins an die Sepharose-Gelmatrix erhöht werden. Des weiteren erfolgte die Zugabe von Sarkosyl zur Bakteriensuspension in einer Endkonzentration von 1 %. Bei Sarkosyl handelt es sich um ein anionisches Detergens, das die Koaggregation des exprimierten Proteins mit bakteriellen Membran-Bestandteilen während der Ultraschall-Behandlung verhindert. Somit bleibt das produzierte Fremdprotein in löslicher Form erhalten und wird nicht in sogenannte *inclusion bodies* eingeschlossen. Ein weiterer Vorteil des Sarkosyls besteht darin, dass es verschiedene bakterielle Proteasen hemmt und zusammen mit EDTA (im Lysis-Puffer enthalten und absolut essentiell für die Löslichkeit von Sarkosyl) einen optimalen Schutz gegen proteolytischen Abbau darstellt. Ohne die Sarkosyl-Behandlung konnte das BPLF1-Proteinfragment nicht in löslicher Form erhalten werden. Es kam zur Ausbildung von unlöslichen Aggregaten bzw. *inclusion bodies* und das Protein war nach der Lyse und Zentrifugation lediglich im Niederschlag (Pellet, P) detektierbar (Abbildung 3.15, Vergleich Spur 3 und 4). Die Konzentration des Sarkosyls muss zunächst für jedes Protein experimentell ermittelt werden. Auch für BPLF1 wurde die Sarkosyl-Konzentration in einem Bereich von 0,25 % bis 4 % getestet (Daten nicht gezeigt). Eine Konzentration von 1 % erwies sich für BPLF1 als besonders geeignet. Wie Abbildung 3.16 zeigt, konnte dadurch der überwiegende Anteil des exprimierten Proteins in löslicher Form erhalten und im Überstand (Ü) detektiert werden (Spur 9). Zur Auflösung der *inclusion bodies* wurden neben Sarkosyl weitere Agenzien herangezogen. Der Einsatz von Harnstoff wurde vermieden, da dadurch die Bindung des Fusionsproteins an die Sepharose-Matrix stark herabgesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung des nichtionischen Detergens Triton X-100 führte ebenso nicht zu dem gewünschten Erfolg. Wie bei der Lyse mit PBS konnte auch mit Triton X100 das exprimierte Protein nur in den Bakterien aber nicht im Überstand nachgewiesen werden (Abbildung 3.16, Spuren 2 und 5).

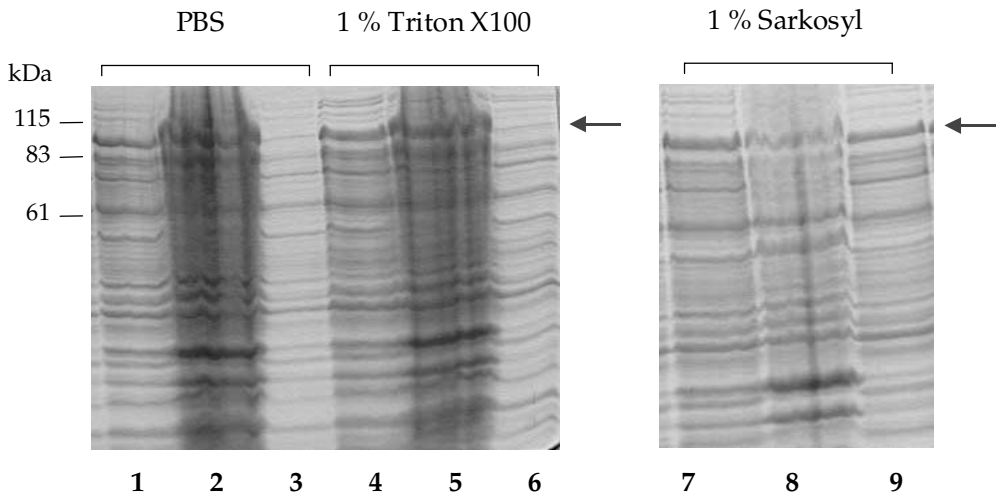


Abbildung 3.16 *Coomassie*-Gel zur Überprüfung der Löslichkeit des exprimierten GST-BPLF1-Proteinfragments. Induzierte TOPP3-Bakterien, die das BPLF1-Proteinfragment II als GST-Fusionsprotein exprimierten, wurden geerntet und auf unterschiedliche Art und Weise lysiert. Gesamt-Lysat (Spuren 1, 4 und 7) sowie der nach anschließend erfolgter Zentrifugation erhaltene Niederschlag (Spuren 2, 5 und 8) und Überstand (Spuren 3, 6 und 9) wurden 1:1 mit 2x SDS-Auftragspuffer versetzt, auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und mittels *Comassie*-Färbung überprüft. Die Spuren 1-3 zeigen das Ergebnis der Lyse mit PBS, Spuren 4-9 die Ergebnisse aus der Lyse mit STE-Lysis-Puffer, der jeweils mit einem Detergens versetzt wurde (Spuren 4-6 mit 1 % Triton X100, Spuren 7-9 mit 1 % Sarkosyl). Durch die Lyse mit 1 % Sarkosyl konnte der überwiegende Anteil des exprimierten Proteins in löslicher Form erhalten und im Überstand detektiert werden (Spur 9, blauer Pfeil). Bei der Verwendung von PBS bzw. Lysis-Puffer mit 1 % Triton X100 konnte das Proteinfragment lediglich im Gesamt-Lysat und Pellet detektiert werden (Spuren 1 und 2 bzw. 4 und 5).

Das mit Sarkosyl erhaltene lösliche Protein konnte nun in die Affinitätsreinigung mit der Glutathion-Sepharose™4B eingesetzt werden. Durch eine Epoxy-Aktivierung wurde an diese Sepharose ein Glutathion gekoppelt, das in seiner Struktur komplementär zur Bindestelle der Glutathion-S-Transferase ist, und somit eine Bindung des exprimierten GST-Proteins an die Matrix erlaubt. Die Aufreinigung erfolgte wie in Kapitel 2.6.3.1 beschrieben. Dabei stellte sich heraus, dass ein Großteil des exprimierten Proteins nicht an die Gelmatrix gebunden hatte. Diese Tatsache beruhte in erster Linie auf der Größe des Proteins. Denn in der Literatur (Frangioni und Neel, 1993) gab es Hinweise, dass die Bindung eines Proteins an die Sepharose stark von seiner Größe abhängt. So wurde beschrieben, dass ca. 6 - 8 µg eines 26 kDa–GST-Fusionsproteins an 10 µl Glutathion-Sepharose-Suspension (50 %(v/v)) binden konnten. Bereits bei einem 42 kDa-Protein sank diese Menge auf 2 - 3 µg / 10µl Suspension. Und ein 83 kDa Protein erreichte lediglich Werte um 0,5 – 1 µg. Mit einer Größe von ca. 100 kDa stellte BPLF1 deshalb ein sehr großes Protein dar und die Ausbeute an gebundenem Protein war dementsprechend gering. Außerdem musste berücksichtigt werden, dass kleinere Abbruchfragmente leichter an die Sepharose binden konnten und die Ausbeute an dem Vollänge-Protein somit verringerten. Um die Bindung des BPLF1-GST-Fusionproteins zu verbessern, wurde die Zugabe von Triton X-100 getestet. Dazu wurden Bakterien mit dem exprimierten Protein wie oben beschrieben geerntet und lysiert. Die Zugabe des nichtionischen Detergens Triton X-100 zu dem Sarkosyl-gelösten Lysat sollte die Bindung des Proteins an die Sepharose erhöhen.

Dabei war es wichtig, dass das Triton X-100 vor der Sepharose zugegeben wurde, um mögliche sterische Hinderungen mit der GST-Bindung zu vermeiden. Nach der Bindung des Proteins an die Matrix wurden die Sepharose-Partikel (Sepharose-*Beads*) durch eine kurze Zentrifugation von dem nicht gebundenen Protein abgetrennt. Die Fraktionen mit dem nicht gebundenen Protein wurden auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und mittels Comassie-Färbung überprüft. Abbildung 3.17 zeigt, dass durch die Zugabe von Triton X-100 in Konzentrationen von 0,5 – 4 % kein entscheidender Unterschied in der Bindung erreicht werden konnte. Da Triton X-100 nicht den gewünschten Erfolg erzielte, wurde in weiteren Versuchen auf die Zugabe dieses Detergens verzichtet.

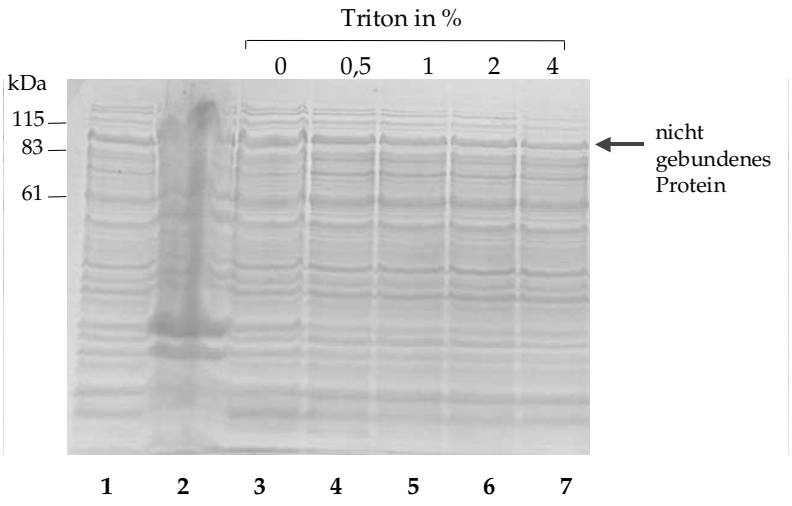


Abbildung 3.17 Einfluß unterschiedlicher Triton X-100-Konzentrationen auf die Bindung des GST-BPLF1-Fusionsproteins an die Glutathion-Sepharose. Induzierte TOPP3-Bakterien, die das BPLF1-Proteinfragment II als GST-Fusionsprotein exprimierten wurden geerntet und lysiert. Gesamt-Lysat (Spur 1) sowie der nach anschließend erfolgter Zentrifugation erhaltene Niederschlag (Spur 2) und Überstand mit löslichem GST-Protein (Spur 3) wurden 1:1 mit 2x SDS-Auftragspuffer versetzt, auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und mittels *Comassie*-Färbung überprüft. Die Bindung des Fusionsproteins an die Sepharose-Matrix sollte durch unterschiedliche Triton- X-100-Konzentrationen verbessert werden. Die Spuren 4 bis 7 zeigen den Anteil des nicht gebundenen GST-Proteins bei Triton X-100-Konzentrationen von 0,5 bis 4 % (durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet). Durch das Detergens konnte die Bindung des Proteins an die Matrix nicht entscheidend verbessert werden.

Dem Verlust des exprimierten Proteins aufgrund der schlechten Bindung an die Sepharose wurde dadurch begegnet, dass ein größerer Maßstab für die Aufreinigung angelegt wurde. Abbildung 3.18A zeigt die verschiedenen Schritte der Affinitätsreinigung. Mit Hilfe dieser Methode konnte ein relativ sauberes BPLF1-Fusionsprotein erhalten werden. Dabei stellte sich heraus, dass neben der gesuchten Proteinbande bei ca. 100 kDa (Spur 3, blauer Pfeil) zusätzlich kleinere Banden auftraten, wobei es sich vermutlich um Abbruchfragmente des exprimierten Proteins handelte. Um diese kleineren Abbruchfragmente zu entfernen, wurde der zweite Reinigungsschritt über die *Prep-Cell-Page®* angeschlossen. Für diese Aufreinigung war es nicht notwendig, das Protein mittels eines speziellen Elutionspuffers von der vorangegangenen Sepharose-Matrix abzutrennen. Die nach den letzten Waschschritten erhaltenen *Beads* wurden mit SDS-Auftragspuffer versetzt und für 5 Min

bei 95 °C aufgekocht. Dies führte zu einer Elution des Proteins von der Matrix unter denaturierenden Bedingungen. Nach einer kurzen Zentrifugation konnte der Überstand der Sepharose-Partikel, der nun das eluierte Protein enthielt, direkt auf das SDS-Gel der *Prep-Cell-Page®* aufgetragen werden (siehe Abbildung 3.18A, Spur 3). Das Prinzip dieses Reinigungsverfahrens besteht darin, dass Proteine über ein zylinderförmiges SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt und am Ende des Gels in einzelnen Fraktionen gesammelt werden. Aliquots dieser Fraktionen können anschließend über ein herkömmliches *Laemmli*-SDS-Gel überprüft und charakterisiert werden. Die Methode bot sich besonders bei dem BPLF1-Fragment als weitere Reinigungsstufe an, da die kleineren Abbauprodukte des BPLF1-Proteins das SDS-Gel wesentlich schneller passieren sollten, als das große BPLF1-Proteinfragment und somit von diesem abgetrennt werden konnten. In Abbildung 3.18B, Spuren 4 und 5, ist der Erfolg der *Prep-Cell*-Aufreinigung ersichtlich. Das so erhaltene Protein war nun in 1x SDS-Laufpuffer gelöst. Da es lediglich für Westernblot-Analysen eingesetzt werden sollte, war eine Dialyse gegen Harnstoff, um das SDS zu entfernen, nicht nötig. Eine Aufkonzentrierung der einzelnen Fraktionen durch Filter-Konzentratoren erwies sich als nicht geeignet, da dadurch das Protein zu stark degradiert wurde. Für eine längere Aufbewahrung und auch zur Aufkonzentrierung wurde das Protein lyophilisiert und bei –80 °C gelagert.

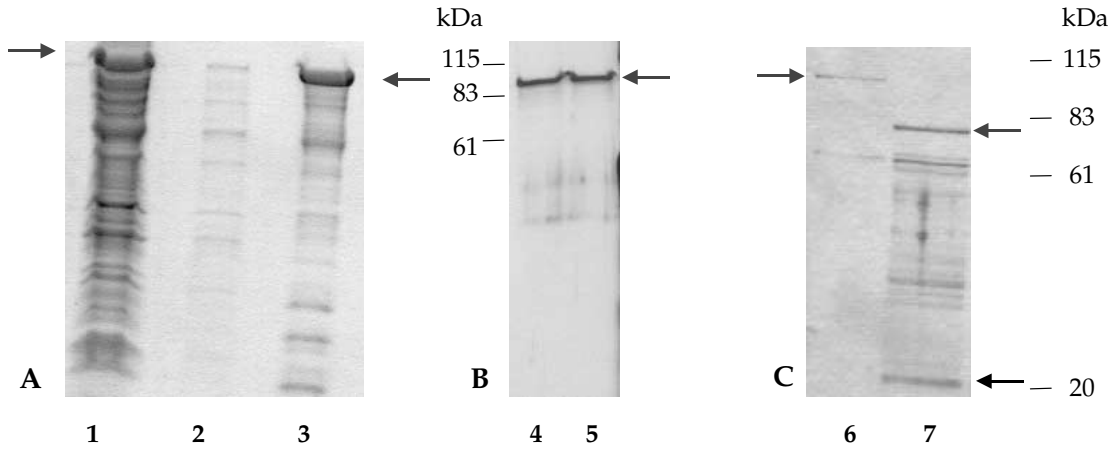


Abbildung 3.18 Aufreinigung des BPLF1-GST-Fusionsproteins mittels *Glutathion-Sepharose™ 4B* und *Prep-Cell-Page®*, sowie Abspaltung des GST-Fusionsanteils mit Hilfe der Thrombin-Protease. A) *Coomassie*-Gel zur Überprüfung der Affinitätsreinigung mittels Glutathion-Sepharose. Spur 1: Bakterienlysat mit löslichem BPLF1-GST-Fusionsprotein vor der Aufreinigung (durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet). Spur 2: Waschdurchlauf. Spur 3: Von den Sepharose-*Beads* eluiertes GST-Fusionsprotein, das direkt in die *Prep-Cell-Page®* eingesetzt werden konnte. Neben dem BPLF1-Proteinfragment (durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet) konnten zusätzlich kleinere Abbruchfragmente detektiert werden. B) Silbergel zur Überprüfung der *Prep-Cell-Page®*-Reinigung. Die Spuren 4 und 5 zeigen eine ca. 100 kDa große spezifische Bande des BPLF1-GST-Fusionsprotein. C) Silbergel zur Überprüfung der Abspaltung des GST-Fusionsanteils mit Hilfe einer Thrombin-Protease. Spur 6 zeigt das ca. 100 kDa große Fusionsprotein vor der Abspaltung (durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet). Eine 10 minütige Thrombin-Protease-Behandlung resultierte in einem prominenten ca 80 kDa–BPLF1-Proteinfragment (Spur 7, durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet) und weiteren unspezifischen Spaltungsprodukten. (Der abgespaltene GST-Anteil von ca. 26 kDa ist durch eine schwarzen Pfeil gekennzeichnet).

Das aus der *Prep-Cell-Page®* erhaltene Protein konnte nun direkt als Antigen in Westernblot-Analysen mit verschiedenen Humanseren eingesetzt werden. Die Detektion eines positiven Signals konnte ein erster Hinweis darauf sein, dass das verwendete Serum Antikörper gegen BPLF1 enthielt und BPLF1 somit *in vivo* auch exprimiert wurde. Da es sich bei dem exprimierten und aufgereinigten Protein allerdings um ein Fusionsprotein handelte, musste sichergestellt werden, dass die im Serum vorhandenen Antikörper nicht gegen den GST-Fusionsanteil gerichtet waren. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt. Zunächst wurden die verschiedenen Humanseren mit einem Bakterienlysat abgesättigt, das lediglich das GST-Protein in großen Mengen produzierte (d.h. induzierte TOPP3 Bakterien, die lediglich den Ausgangsvektor pGEX2T enthielten). Antikörper, die gegen GST gerichtet waren, konnten somit in einer Vorinkubation abgefangen werden. Um eine weitere Sicherheit zu erhalten, wurde der GST-Anteil von dem Fusionsprotein mit Hilfe einer Thrombin-Protease abgespalten (siehe Kapitel 2.6.3.1). Dabei mussten die Bedingungen so optimiert werden, dass von der Protease die Schnittstelle zwischen dem GST-Fusionsanteil und dem BPLF1-Proteinfragment genutzt wurde, nicht sekundäre Schnittstellen, die sich zusätzlich innerhalb der Proteinsequenz befanden. Inkubationszeiten von 10, 30, 60 und 120 Min wurden ausgetestet. Das beste Ergebnis wurde bereits nach 10 Min. erreicht (siehe Abbildung 3.18C, Spur 7). Das so erhaltene Proteine konnte nun ebenfalls in die Westernblot-Analysen eingesetzt werden. Die Westernblot-Analysen wurden wie in Kapitel 2.6.3.2 beschrieben durchgeführt. Das aufgereinigte BPLF1-Proteinfragment wurde als Antigen auf der Nitrozellulose-Membran fixiert. Als Primärantikörper dienten verschiedene Humanseren, die aufgrund ihrer Serologie bestimmten Krankheitsbildern zugeordnet werden konnten.

Abbildung 3.19 zeigt stellvertretend das Ergebnis für eine Anzahl von Westernblot-Analysen in denen verschiedene Humanseren eingesetzt und auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen BPLF1 getestet wurden. Neben dem aufgereinigten Proteinfragment und dem GST-haltigen Bakterienlysat (zur Kontrolle der Absättigung), wurden zusätzlich induzierte P3HR1/16-Zellen auf der Westernblot-Membran fixiert. Diese Zellen repräsentierten das lytische Expressionsmuster des Virus und stellten eine zusätzlich Kontrolle für die Humanseren dar. Seren von EBV-negativen Patienten dienten als Negativkontrolle und zeigten wie erwartet kein Signal im Bereich des aufgereinigten Proteinfragments (Abbildung 3.19 A, Spur 3, durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet). Im Vergleich dazu konnte sowohl in einem Pool von Seren aus NPC-Patienten (Abbildung 3.19 B, Spur 6, durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet), als auch in Patienten mit einer starken lytischen Vermehrung (Abbildung 3.19 B, Spur 9, durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet) Antikörper gegen das BPLF1-Protein nachgewiesen werden. Dass diese Signale nicht von einer unspezifischen Kreuzhybridisierung mit GST herrühren konnten, zeigen jeweils die Spuren 2, 5 und 8 der Abbildung, die das GST-haltige Bakterienlysat enthielten. Im Bereich des GST-Proteins (schwarzer Pfeil) konnte kein positives Signal nachgewiesen werden. Somit war die Absättigung der Humanseren erfolgreich durchgeführt worden. Die Ergebnisse wurden auch mit aufgereinigtem BPLF1-Protein bestätigt, dem der GST-Fusionsanteil mit Hilfe einer Thrombin-Protease entfernt worden war (Daten nicht gezeigt).

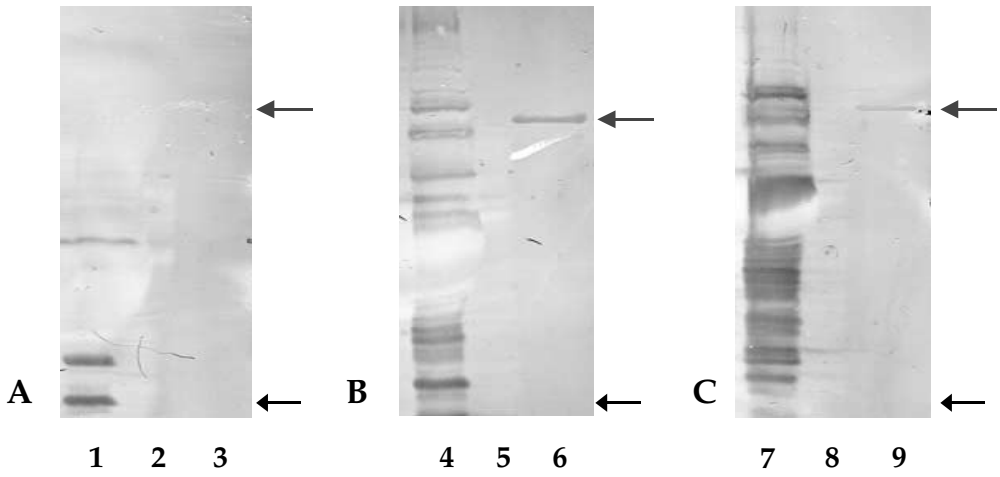


Abbildung 3.19 Westernblot-Analysen zum Nachweis von BPLF1-spezifischen Antikörpern in verschiedenen humanen Patientenseren. Neben EBV-positiven induzierten P3HR1/16-Zellen (Spuren 1, 4 und 7) wurde GST-haltiges Bakterienlysat (Spuren 2, 5 und 8) und aufgereinigtes GST-BPLF1-Proteinfragment-II (Spuren 3, 6 und 9) auf der Westernblot-Membran fixiert. Für die Hybridisierung wurden Seren von EBV-negativen Patienten (A), Seren von NPC-Patienten (B) und EBV-positiven Patienten mit starker lytischer Virusvermehrung (C) eingesetzt. EBV negative Patienten wiesen keine BPLF1-spezifischen Antikörper auf (A, Spur 3, durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet), in den EBV-positiven Patienten konnten jeweils BPLF1-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (B und C Spur 6 und 9, durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet). Unspezifische Kreuzhybridisierungen mit GST konnten in keinem der Ansätze detektiert werden (A - C Spuren 2, 5 und 8, durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet)

Durch diese Westernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass *in vivo* BPLF1-spezifische Antikörper in verschiedenen Humanseren vorhanden sind. Um eine Zuordnung zu einem Krankheitsbild und damit das Auftreten des BPLF1-Proteins zu einem bestimmten Zeitpunkt während der EBV-Infektion treffen zu können, wurden jeweils 5-10 Seren definierter Krankheitsbilder auf BPLF1-spezifische Antikörper getestet. Dazu gehörten Blutproben EBV-negativer Patienten, Patienten mit Primärinfektion/IM, seropositiv gesunde Patienten, seropositive Patienten mit einer Reaktivierung und NPC-Patienten. Zusätzlich wurden Seren getestet bei denen im Immunfluoreszenztest IgA-Antikörper gegen VCA/EA detektiert wurden und die somit Patienten mit einer starken lytischen Vermehrung entweder aufgrund einer Erstinfektion oder einer Reaktivierung zugeordnet werden konnten. Abbildung 3.20 zeigt die Auswertung der Westernblot-Analysen. Darin ist die Anzahl der getesteten Seren, die BPLF1-spezifische Antikörper aufwiesen, in Prozenten wiedergegeben. Wie erwartet konnten in keinem Serum der EBV-negativen Patienten BPLF1-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Negativkontrolle, 0 %). NPC- und IgA-positive Patienten wiesen hingegen zu 100 % Antikörper gegen BPLF1 auf. Für die Seren von Patienten mit IM, Reaktivierung und gesunden Personen wurden Ergebnisse im Bereich von 10%, 50 % und 3 % erzielt. Personen mit verstärkter lytischer Virus-Vermehrung (z.B. Primärinfektion oder Reaktivierung) wiesen dabei im Vergleich zu seropositiv-gesunden Patienten vermehrt Antikörper gegen BPLF1 auf. Um jedoch eindeutige Aussagen treffen zu können, müssen weitere Blutproben überprüft werden.

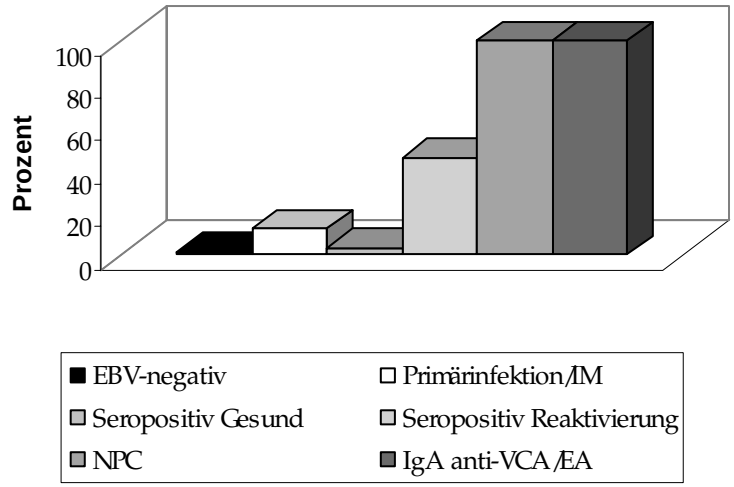


Abbildung 3.20 Nachweis von BPLF1-spezifischen Antikörpern in Humanseren, die definierten EBV-assoziierten Krankheitsbildern zugeordnet werden können. Die Anzahl der getesteten Seren, die BPLF1-spezifische Antikörper aufwiesen, ist in Prozent angegeben.

Durch die Westernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen EBV-positiven Humanseren Antikörper gegen BPLF1 vorhanden waren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch *in vivo* BPLF1-Protein exprimiert wird. Das Auftreten des BPLF1-Proteins konnte jedoch nicht eindeutig einem bestimmten Zeitpunkt der EBV-Infektion zugeordnet werden. Der Nachweis BPLF1-spezifischer Antikörper in Patienten mit starker lytischer Vermehrung bestätigte jedoch die Ergebnisse aus den RT-PCR- und Northernblot-Analysen. Demnach wurde BPLF1 als ein sehr spätes Gen deklariert, das möglicherweise als Tegumentprotein in der sehr frühen und vor allem während der späten lytischen Phase aktiv ist.

3.2.3 Nachweis des BPLF1-Proteins mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchenserums

In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen humanen Patientenseren BPLF1-spezifische Antikörper vorhanden waren, die indirekt die Existenz eines BPLF1-Proteins *in vivo* bestätigten. Durch diese Westernblot-Analysen konnte zwar das Vorhandensein des Proteins überprüft werden, nicht aber dessen Größe, Lokalisation oder Expressionszeitpunkt näher beschrieben werden. Um weitere Aussagen über das Protein treffen zu können, wurde ein BPLF1-spezifischer Antikörper benötigt. Da kein kommerzieller Antikörper zur Verfügung stand, sollte durch die Immunisierung eines Kaninchens mit bakteriell exprimiertem und aufgereinigtem BPLF1-Protein ein polyklonales Serum mit BPLF1-spezifischen Antikörpern hergestellt werden. Für die Immunsierung wurde ein Bereich des BPLF1-Gens exprimiert, von dem angenommen werden konnte, dass er sicher in dem BPLF1-Protein enthalten ist. Als besonders geeignet erschien der Abschnitt des Gens, der in Vorversuchen durch die Synthese der cDNA als sicherer Bestandteil der mRNA bestätigt worden war (siehe Kapitel 3.1.3).

Die Expression des Proteinanteils erfolgte wiederum als GST-Fusionsprotein in TOPP3-Bakterien mit Hilfe des pGEX-Systems (siehe Kapitel 2.6.3). Dazu wurde zunächst das

ursprüngliche cDNA-Fragment aus dem Cosmid cMB14 amplifiziert. Für die Amplifikation mit Hilfe der *Power-Script-Polymerase* wurden die Primer 5`rabbit und 3`rabbit verwendet (siehe Tabelle 2.2 und Kapitel 2.5.2.1). Die Oligonukleotide waren an ihren 5`Enden mit einer BamHI-Schnittstelle versehen, so dass das resultierende PCR-Produkt über diese *in frame* in den Vektor pGEX2T kloniert werden konnte. Durch Sequenzierung mit Hilfe der Primer pGEX5`/3`*Sequencing (*siehe Tabelle 2.4*)* wurde neben der eigentlichen Gensequenz auch der Übergang zwischen Vektor und Insert überprüft, der bei einer korrekten Klonierung gewährleistete, dass auch die Thrombin-Schnittstelle erhalten blieb. Der resultierende Vektor pGEX2T-BPLF1/cDNA1,5m, der nun für ein Fusionsprotein von ca. 78 kDa kodierte (siehe Anhang A.6), konnte nach der Transformation in den Bakterienstamm TOPP3 für die Proteinsynthese verwendet werden. Die Expression des Proteins und die anschließenden Aufreinigungen über den GST-Anteil mittels Glutathion-Sepharose und die Größenauftrennung mittels *Prep-Cell-Page®* wurden wie in Kapitel 2.6.3.1 beschrieben durchgeführt. Auch die Besonderheiten beim Aufschluss der Bakterien mittels Ultraschall-Behandlung wurden berücksichtigt. So konnte nach zwei Reinigungsschritten ein sehr sauberes Proteinfragment von ca. 78 kDa in ausreichenden Mengen erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Eine Abspaltung des GST-Fusionsanteils von dem aufgereinigten Protein über die Thrombin-Spaltstelle konnte leider nicht erfolgreich durchgeführt werden, was vermutlich auf eine ungünstige Faltung des Proteins zurückzuführen ist. Somit wurde das BPLF1-Proteinfragment als GST-Fusionsprotein in die Immunisierung eingesetzt. Die Immunisierung erfolgte wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben.

In Westernblot-Analysen konnte nun das polyklonale Serum auf die Anwesenheit von BPLF1-spezifischen Antikörpern getestet werden. Dazu wurden neben dem aufgereinigten BPLF1-Proteinfragment, das auch zur Immunisierung eingesetzt worden war (Positivkontrolle), eine EBV-negative (DG75 nicht induziert/induziert) und eine EBV-positive Zelllinie (P3HR1/16 nicht induziert/induziert) auf der Westernblot-Membran fixiert. Das polyklonale Kaninchenserum wurde in einem Verhältnis von 1:20 bis 1:50 in die Analysen eingesetzt. Um Antikörper abzufangen, die gegen den GST-Anteils des Proteins gerichtet waren, wurde das Serum wiederum mit einem GST-haltigen Bakterienlysat abgesättigt (siehe Kapitel 2.6.3.3). Abbildung 3.21 zeigt das Ergebnis der Westernblot-Analysen. Daraus wird ersichtlich, dass die Immunisierung des Kaninchens erfolgreich war. Das aufgereinigt BPLF1-Proteinfragment wurde durch spezifische Antikörper detektiert (Positivkontrolle, Spur 6). Dabei konnte durch die Absättigung des Serums gewährleistet werden, dass die Antikörper gegen den Proteinanteil und nicht gegen das GST gerichtet waren (Spur 1, keine GST-Bande detektierbar; durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet). Sowohl in der EBV-negativen Zelllinie (Spuren 2 und 3) als auch in der EBV-positiven Zelllinie (Spuren 4 und 5) konnte jedoch kein BPLF1-spezifisches Signal mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 100 kDa detektiert werden.

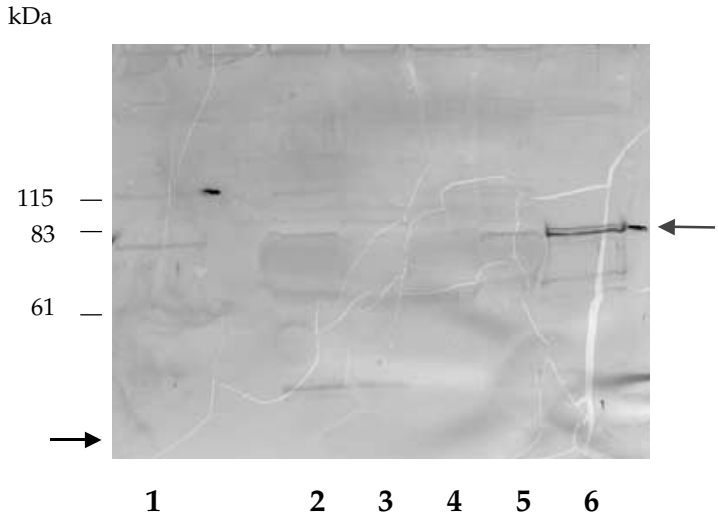


Abbildung 3.21 Westernblot-Analysen zum Austesten des polyklonalen BPLF1-Kaninchen Serums. Neben der EBV-negativen Zelllinie DG75 (Spur 2 nicht induziert, Spur 3 induziert) und der EBV-positiven Zelllinie P3HR1/16 (Spur 4 nicht induziert und Spur 5 induziert) wurde GST-haltiges Bakterienlysat (Spur 1) und aufgereinigtes GST-BPLF1-Proteinfragment (Spur 6, Positivkontrolle) auf der Westernblot-Membran fixiert. Für die Hybridisierung wurde das polyklonale Kaninchen-Serum, das zuvor mit GST-haltigem Bakterienlysat abgesättigt worden war, in einer Verdünnung von 1:20 in TBS eingesetzt. Das aufgereinigte Proteinfragment konnte durch BPLF1-spezifische Antikörper im Serum detektiert werden (Spur 6, durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet). Die Absättigung gegen GST konnte erfolgreich durchgeführt werden (Spur 1, kein Signal im Bereich des GST, durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet). Sowohl in der EBV-negativen Zelllinie DG75 (Spuren 2 und 3) als auch in der EBV-positiven Zelllinie P3HR1/16 (Spuren 4 und 5) wurde kein BPLF1-spezifisches Signal detektiert.

4 Diskussion

4.1 Der Leserahmen BPLF1- ein spätes Gen des Epstein-Barr-Virus

Für das Epstein-Barr-Virus wurde bereits eine Anzahl von Genen des lytischen und latenten Vermehrungszyklus beschrieben. Auf der doppelsträngigen Virus-DNA sind insgesamt über 100 Gene kodiert, die teilweise unter Verwendung unterschiedlicher Leseraster von miteinander überlappenden Leserahmen in verschiedenen Orientierungen exprimiert werden. Die Expression jedes Gens wird meist von einem spezifischen, dem Leserahmen vorgelagerten Promotor kontrolliert, der die üblichen Erkennungsstellen für die eukaryotische RNA-Polymerase II besitzt. Zusätzlich verfügen die Promotorbereiche über Bindungsstellen für zelluläre und virale Transaktivatoren, die bestimmen, zu welchem Zeitpunkt des Infektionszyklus das entsprechende Gen aktiviert und exprimiert wird. Viele Proteine werden von gespleißten mRNA-Molekülen translatiert. Insbesondere die Proteine, die während der Latenz des Epstein-Barr-Virus synthetisiert werden, werden von mRNA-Molekülen translatiert, die mehrfachen, sich über große Genombereiche erstreckenden Spleißvorgänge unterliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein weiteres, bislang unbekanntes Gen des Epstein-Barr-Virus identifiziert und genauer charakterisiert werden: das Gen des offenen Leserahmens BPLF1. Computeranalysen wiesen BPLF1 als ein sogenanntes *Left-Frame*-Gen des Virus aus, das auf dem eigentlichen Gegenstrang des Genoms lokalisiert ist. Mit einer Größe von 9450 bp handelt es sich bei BPLF1 um einen überdurchschnittlich großen offenen Leserahmen. Eine Besonderheit liegt darin, dass das Gen weder durch interne *Stop-Codons* unterbrochen wird, noch bekannte *Consensus*-Spleißstellen aufweist (GT-AG-Regel der Exon-Intron-Grenzen). Dies deutete zunächst darauf hin, dass dieses Gen keine typischen Exon-Intron-Strukturen aufweist, sondern vielmehr aus einer einzigen, riesigen kodierenden Sequenz besteht. Bei einer Transkription des gesamten BPLF1-Gens musste von einer mRNA mit fast 10 kbp Länge ausgegangen werden und daraus resultierend bei einer Translation von einem Protein mit mehr als 300 kDa. Diese Beobachtungen gaben Anlass zu der Überlegung, ob der BPLF1-Leserahmen überhaupt in ein oder mehrere Proteine übersetzt wird. Andererseits schien es eher unwahrscheinlich, dass ein Gen solchen Umfangs ohne Selektion auf ein funktionelles Genprodukt nicht Sequenzmutationen ansammeln würde, die den *open reading frame* unterbrächen und inaktivierten. Auch im Hinblick darauf, dass Gene solcher Größenordnung nicht nur bei EBV zu finden sind, wurde von der Existenz eines BPLF1-Genproduktes ausgegangen. Andere Herpesviren wie z.B. HSV1 oder HCMV weisen ebenso große Leserahmen auf. Dabei kodieren Gene dieser Größe bei den meisten Herpesviren für Strukturproteine, die an der Ausbildung der Nukleokapside beteiligt sind, oder als Tegumentkomponenten ihre Funktion während der sehr frühen Replikationsphase bzw. der späten Virusreifung übernehmen (z.B. VP1/2 bei HSV1). Ob auch dem BPLF1-Protein möglicherweise eine solche Funktion zukommt, wurde durch verschiedenste Computeranalysen und Homologie-Vergleiche mit anderen herpesviralen Proteinen überprüft. Detaillierte Ergebnisse dieser Analysen sind in Kapitel 4.2 zusammengefasst.

Im Mittelpunkt der ersten experimentellen Untersuchungen stand der Nachweis der transkriptionellen Aktivität des BPLF1-Gens. Mit Hilfe von RT-PCR und Northernblot-Analysen wurden die Ergebnisse theoretischer Computeranalysen überprüft und bestätigt. Die Detektion eines BPLF1-spezifischen Transkripts lieferte Hinweise auf die Aktivität

des Gens und auf seine mögliche Funktion. Von besonderem Interesse war hierbei, ob die BPLF1-spezifische RNA tatsächlich in Form eines ungespleißten ca. 10 kbp großen, polyadenylierten Transkripts synthetisiert wurde.

RT-PCR-Analysen bestätigten die theoretischen Hinweise auf ein BPLF1-Transkript während der späten lytischen Vermehrungsphase von EBV.

Erste RT-PCR-Analysen sollten zeigen, ob überhaupt eine BPLF1-spezifische RNA transkribiert wird. Für den RNA-Nachweis wurde ein relativ kleiner Genbereich von ca. 360 bp ausgewählt, um zu gewährleisten, dass nicht die Technik der RT-PCR selbst den limitierenden Faktor für ein positives Signal darstellte. Da nicht bekannt war, welche Bereiche des Leserahmens tatsächlich auch in der mRNA vorhanden waren, oder möglicherweise über alternative Spleißvorgänge entfernt werden, wurde nach dem *Antigenic Index*, einer Computeranalyse mit der besonders antigene Bereiche innerhalb des BPLF1-Leserahmens identifiziert werden konnten, ein Bereich des offenen Leserahmens ausgewählt, der später mit hoher Wahrscheinlichkeit im Protein enthalten sein würde. Abbildung A.3 des Anhangs zeigt neben verschiedenen Sekundärstrukturen auch den *Antigenic Index* von BPLF1. Daraus wird ersichtlich, dass besonders im Bereich der Aminosäuren 1321-2321 das Protein eine starke Antigenität aufweist. Das in der RT-PCR zu amplifizierende Fragment wurde deshalb innerhalb dieses Abschnittes positioniert.

Schon zu Beginn der Experimente zeigte sich, dass durch die Größe des Leserahmens hohe Anforderungen an die Versuchsansätze gestellt wurden, die sich in einzelnen Bereichen sogar als unüberwindbar herausstellten. Bei den RT-PCR-Analysen bereitete vor allem der hohe GC-Gehalt der Gensequenz große Schwierigkeiten. So mussten neben einer Anzahl von Primern auch verschiedenste Polymerase-Systeme und spezielle Versuchsbedingungen ausgetestet werden (z.B. die Verwendung von DMSO), um ein BPLF1-Transkript nachweisen zu können.

Durch den Einsatz von Gesamt-RNA verschiedener EBV-positiver und EBV-negativer Zelllinien (Kontrollen) in den RT-PCR-Analysen, konnte eindeutig gezeigt werden, dass von dem Leserahmen BPLF1 eine genspezifische RNA transkribiert wird. Die Verwendung der unterschiedlichen Zelllinien erlaubte nicht nur den Nachweis des BPLF1-Transkripts, sondern gleichzeitig auch eine Eingrenzung der Genaktivität auf einen bestimmten Zeitpunkt während der Virusvermehrung. Für die RT-PCR-Analysen wurde Gesamt-RNA von EBV-negativen DG75–Zellen, strikt latenten EM-Zellen, Raji-Zellen und nicht induzierten bzw. chemisch induzierten P3HR1/16-Zellen eingesetzt. Dabei konnte ausschließlich in induzierten P3HR1/16-Zellen eine BPLF1-spezifische RNA detektiert werden. In dieser Zellinie waren die Viren durch chemische Induktion zur lytischen Vermehrung angeregt worden und durchliefen dadurch die komplette Replikationskaskade bis zur Synthese infektiöser Viruspartikel. In Bezug auf den Vermehrungszyklus des Epstein-Barr-Virus konnte das BPLF1-Gen aufgrund dieser Beobachtungen den späten Genen (*late*, γ) zugeordnet werden. Die Einschränkung auf die späte lytische Phase der Vermehrung wurde durch die Ergebnisse mit induzierten Raji-Zellen bestätigt. Das Virus in diesen Zellen ist aufgrund einer Deletion nicht in der Lage, die komplette lytische Genkaskade zu durchlaufen. Lediglich die Expression der *immediate early* und der *early*-Gene während der lytischen Phase ist möglich. Das Fehlen eines Signals bei diesen induzierten Zellen deutete darauf hin, dass die Transkription des BPLF1-Gens nicht in der sehr frühen oder frühen Phase der lytischen Replikation stattfindet. Eine Aktivität des BPLF1-Gens während der latenten Vermehrungsphase

konnte durch die Überprüfung der strikt latenten lymphoblastoiden Zellinie EM ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 4.1).

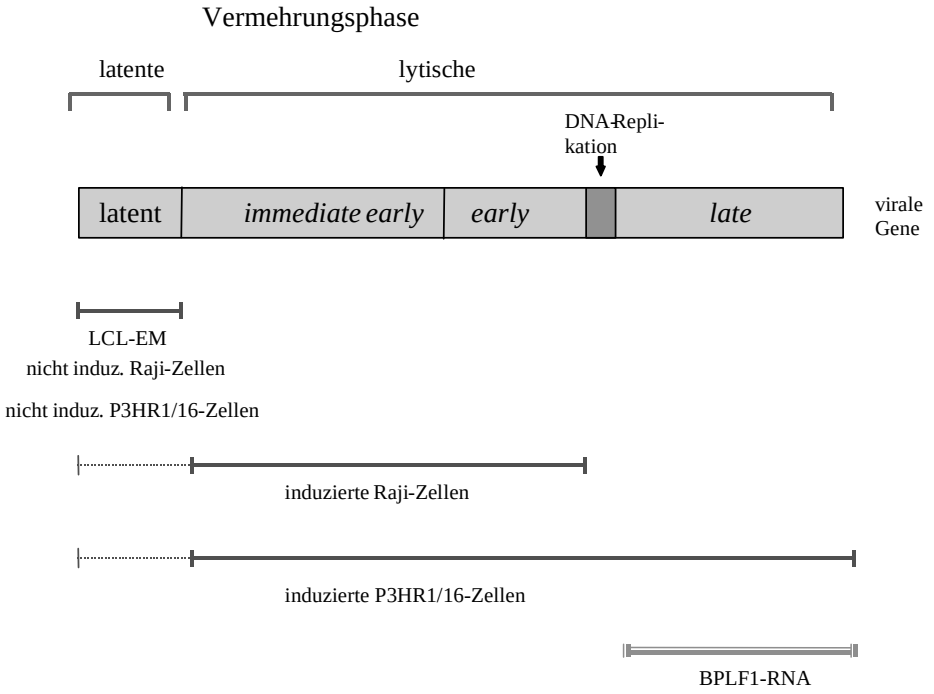


Abbildung 4.1 Aktivität viraler Gene in verschiedenen Zelllinien während der lytischen und latenten Vermehrungsphase. Die Aktivität der viralen Gene in den unterschiedlichen Zelllinien ist durch rote Balken, der Nachweis der BPLF1-spezifischen RNA durch einen blauen Balken gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie weist darauf hin, dass durch eine chemische Induktion niemals alle Zellen von der latenten Phase in den lytischen Zyklus überführt werden können.

Durch die RT-PCR-Analysen konnte somit nicht nur gezeigt werden, dass es zur Transkription einer BPLF1-spezifischen RNA kommt, sondern es war bereits eine Eingrenzung der Genaktivität auf die späte lytische Vermehrungsphase des Virus möglich. Dies erschien nicht unwahrscheinlich. Denn Computeranalysen und vergleichende Untersuchungen mit anderen herpesviralen Proteinen reihten BPLF1 in die Familie der Tegumentproteine ein (siehe unten). Die Mehrzahl dieser Proteine zeigt eine Genaktivität während der späten lytischen Vermehrungsphase und sie werden deshalb als sogenannte *true late* Gene eingestuft. Einen ergänzenden Hinweis auf die Genaktivität von BPLF1 während der späten lytischen Vermehrungsphase des Virus lieferten die Analysen des Promotor-Bereichs des Gens. Vergleichende Studien von frühen und späten EBV-Promotoren (z.B. BMRF1, ein früher Promotor bzw. BcLF1, ein später Promotor) zeigten, dass die Regulation der späten Promotoren ausschließlich über einen *core*-Promotor mit einer TATA-Box erfolgt, unabhängig von *upstream*- oder *downstream*-regulatorischen Sequenzen (z.B. *Initiator*-Element) oder der Rekrutierung DNA-bindender Faktoren (z.B. über *Enhancer*-Strukturen) (Serio *et al.*, 1998). Eine genaue Überprüfung dieser Promotoren zeigte außerdem, dass die TATA-Box an Position 4 ein Thymidin anstelle eines Adenins trägt (TATTAAA). Von 18 späten Promotoren wiesen 72 % diesen Sequenzaustausch auf. Somit stellen die Promotoren der späten Gene von EBV eine neue

Promotor-Klasse dar, in der die Regulation, im Gegensatz zu frühen und ebenso latenten Genen, lediglich über den *core*-Bereich reguliert wird. Auch die Architektur des BPLF1-Promotors stimmte mit diesen Beobachtungen überein. Die TATA-Box des *core*-Promotors wies den typischen Austausch der Basen Adenin zu Thymidin auf und durch Computeranalysen wurden keine weiteren regulatorischen Elemente im *upstream*- oder *downstream*-Bereich detektiert. Ferner konnte keine Bindung *trans*-wirksamer Transkriptionsfaktoren aufgedeckt werden, wie es für Promotoren, die von der RNA-Polymerase II transkribiert werden, typisch ist.

Northernblot-Analysen enthüllten die Besonderheit des BPLF1-Transkripts.

Bei den Northernblot-Analysen zeigte sich ein außergewöhnliches Ergebnis. Wider Erwarten konnte in der Gesamt-RNA induzierter P3HR1/16-Zellen (diese hatten sich in den Vorversuchen mit der RT-PCR als geeignet erwiesen) nicht nur das erwartete Vollänge-Transkript von ca. 10 kbp detektiert werden, sondern zusätzlich eine offensichtlich gespleißte, genspezifische RNA. Trotz fehlender *Consensus*-Spleißstellen wurde das 9450 bp große Ausgangs-Transkript in eine ca. 3 kbp große mRNA überführt. Dass es sich dabei auch wirklich um ein BPLF1-spezifisches Signal handelte, war in Northernblot-Analysen mit einer sogenannten „*sense*"-Sonde , also einer Sonde, welche die gleiche Sequenz wie die mRNA trägt und deshalb nicht an diese binden kann, bestätigt worden. Offensichtlich nutzte das Epstein-Barr-Virus für den Reifungsprozess der BPLF1-mRNA alternative Spleißstellen, die sich wesentlich von den bereits bekannten *Consensus*-Sequenzen unterschieden. Zunächst war dieses Ergebnis etwas überraschend. Eine genaue Literaturrecherche offenbarte jedoch, dass auch bei einem anderen Herpesvirus dieses Phänomen beobachtet worden war. Das Humane-Herpes-Virus 6 (HHV 6) zeigte für sein Gen des Leserahmens U83 ebenfalls eine alternative bzw. eine neue Spleißvariante (French *et al*., 1999). Dabei entsprachen die Spleißdonor- und –akzeptorstellen für dieses Gen keineswegs den bislang bekannten *Consensus*-Sequenzen, sondern zeichneten sich aus durch eine völlig neue Intron-Struktur. Im Bereich der Spleißdonor- und –akzeptorstellen war eine direkte Sequenzwiederholung der Basen TACC identifiziert worden. Die bekannten Sequenzen der *major class introns* (GT-AG[9]) bzw. der *minor class introns* (AT-AC[10]) wurden nicht gefunden. Dadurch konnte die Spleißstelle für das U83-Gen weder der einen, noch der anderen Klasse zugeordnet werden und stellte eine neue Form der *minor class of introns* (CT-AC) dar. Warum das HHV 6 diese alternativen Spleißstellen verwendet, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise nutzt das Virus eine spezifische Endonuklease für das Spleißen seiner U83-RNA.

Die Existenz einer gespleißten BPLF1-RNA schien aufgrund dieser Beobachtungen nicht mehr ungewöhnlich. Um Aussagen treffen zu können auf welche Art und Weise nun die Prozessierung des BPLF1-Transkriptes erfolgte, stand fortan vor allem die Charakterisierung der ca. 3 kbp großen BPLF1-mRNA und die Identifikation möglicher Spleißstellen im Vordergrund. In verschiedenen Versuchsansätzen wurden dazu weitere Aussagen getroffen. Mit Hilfe von Northernblot-Analysen und der Synthese einer cDNA konnte der Bereich der BPLF1-RNA, der an dem prozessierten Transkript beteiligt war, weiter eingegrenzt werden.

---

[9] AG^GURAGU für die Spleißdonorstelle und YAG^ für die Spleißakzeptorstelle

[10])^AUAUCUU für die Spleißdonorstelle und YCAC^ für die Spleißakzeptorstelle; Y = Pyrimidin; R = Purin; ^ = Spleißstelle

Charakterisierung der BPLF1-mRNA durch Northernblot-Analysen mit genspezifischen Sonden.

Der starke Größenunterschied zwischen dem Vollängetranskript (9450 kbp) und der gespleißten BPLF1-mRNA (ca. 3 kbp) gab Anlass zu der Überlegung, welche Bereiche der Ausgangs-RNA bei dem Reifungsprozess erhalten blieben bzw. welche Anteile entfernt wurden. In Northernblot-Analysen konnten dazu BPLF1-spezifische Sonden[11] eingesetzt werden, die so kreiert waren, dass sie das gesamte BPLF1-Gen in weiten Bereichen überspannten. Abbildung 4.2 zeigt einen schematischen Überblick über die verwendeten Sonden und die Ergebnisse aus den RT-PCR und Northernblot-Analysen.

Für parallele Expressions-Experimente war das BPLF1-Gen aufgrund des *Antigenic Index* in fünf überlappende Fragmente unterteilt worden (BPLF1-I bis BPLF1–V). Die Northernblot-Sonden BPLF1-I, -II und IV entsprachen den jeweiligen Bereichen des BPLF1-Gens; die Sonde BPLF1-361 *antisense* war innerhalb des Fragments III lokalisiert und stimmte mit dem Bereich des Gens überein, der auch in der RT-PCR amplifiziert worden war. Überraschenderweise zeigten die Sonden BPLF1-I, -II und –IV keinerlei positive Signale. Im Vergleich dazu wurde mit der Sonde BPLF1-361 *antisense*, die innerhalb des Fragments III lokalisiert war, eine BPLF1-spezifische Bande nachgewiesen. Ein fehlendes Signal mit den Sonden BPLF1-I, -II und –IV konnte verschiedene Ursachen haben. Entweder waren diese Sonden nicht für die Northernblot-Analysen geeignet, oder die Genbereiche, die diese Sonden detektierten, waren nicht in der BPLF1-mRNA enthalten. Insgesamt wurde ein RNA von ca. 3 kbp erwartet. Durch die Sonde BPLF1-*antisense* wurde ein Genbereich von 361 bp abgedeckt. Die restlichen ca. 2600 bp der BPLF1-mRNA konnten auf verschiedenste Art und Weise auf der ursprünglichen DNA verteilt sein. Dabei konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Exon-Bereiche der mRNA so kurze Sequenzabfolgen beinhalteten und weit über das Gen verteilt waren, dass sie von den Northernblot-Sonden nicht erkannt werden konnten. Auch eine Optimierung der Sonden und der Versuchsbedingungen führte zu keinen positiven Signalen. Daher war es sehr wahrscheinlich, dass die Bereiche, die von den Sonden BPLF1-I, -II und -IV überspannt wurden, nicht in der BPLF1-mRNA enthalten waren. Letztendlich konnten durch die Northernblot-Analysen keine weiteren Bereich der BPLF1-mRNA identifiziert werden. Die Ergebnisse aus der RT-PCR wurden aber eindeutig verifiziert.

Die Frage, ob es sich bei dem detektierten BPLF1-Bereich überhaupt um eine mRNA handelte, wurde durch Northernblot-Analysen mit aufgereinigter poly-A-mRNA aus induzierten P3HR1/16-Zellen bestätigt. Auch hier zeigte sich mit der Sonde BPLF1-361 *antisense* ein positives Signal. Dadurch konnte bestätigt werden, dass es sich bei der detektierten RNA um eine BPLF1-spezifische mRNA handelte, die am 3`-Ende polyadenyliert ist. Durch Computeranalysen war bereits zu Beginn ein poly-A-Signal am 3`-Ende der Gensequenz identifiziert worden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die BPLF1-RNA gespleißt und poly-adenyliert und mit großer Wahrscheinlichkeit auch translatiert wird.

[11] Sonden: BPLF1-I, -II, -361-*antisense*, -IV

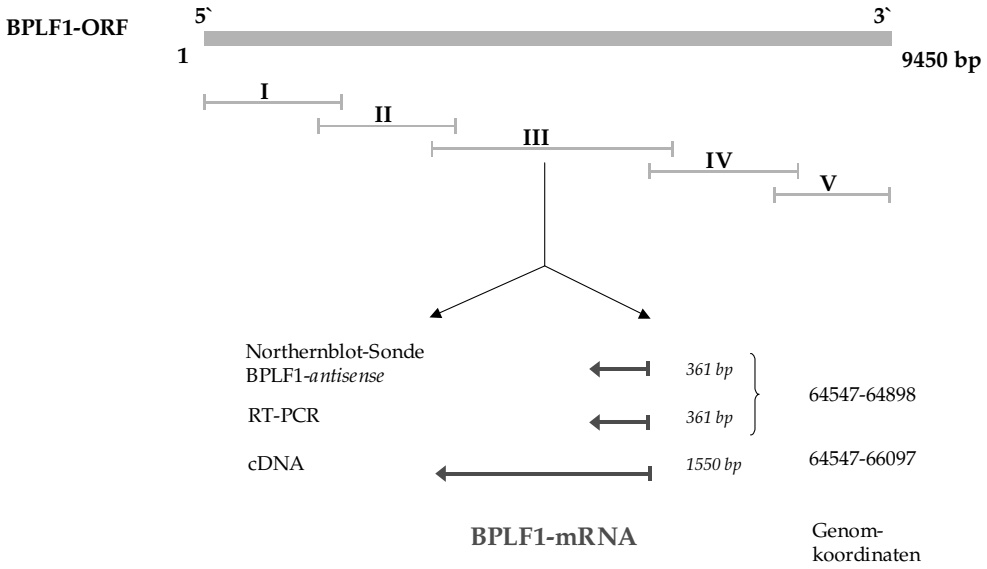


Abbildung 4.2 Schematische Übersicht, über die Bereiche der BPLF1-mRNA, die mit Hilfe von Northernblot-Analysen, RT-PCR und cDNA-Synthese innerhalb der BPLF1-Gesamtsequenz identifiziert wurden. Mit Hilfe des *Antigenic Index* wurde das BPLF1-Gen in fünf überlappende Fragmente (I-V) aufgeteilt. Durch verschiedenste Versuchsansätze wurde die BPLF1-mRNA im Bereich des sehr antigenen Fragments III lokalisiert. RT-PCR und Northernblot-Analysen mit der Sonde BPLF1-361 *antisense* detektierten übereinstimmend einen Bereich von ca. 361 bp der mRNA. Durch die Synthese einer cDNA konnte dieser Bereich in 5`-Richtung des Gens um ca. 1200 bp erweitert werden.

Charakterisierung der BPLF1-mRNA durch Synthese einer genspezifischen cDNA.

In der RT-PCR-Analyse wurde spezifisch ein begrenzter 361 bp großer Anteil der BPLF1-mRNA gezeigt. Die Northernblot-Analysen lieferten den Hinweis auf eine ca. 3 kbp große RNA im gleichen Bereich innerhalb der BPLF1-Gensequenz. Wie das ursprüngliche BPLF1-Vollängetranskript allerdings gespleißt wurde und welche Anteile des Gens in der resultierenden mRNA enthalten waren, konnte dadurch nicht gezeigt werden. Die Synthese einer cDNA sollte darüber mehr Aufschluss geben. Ausgehend von der Mitte des Gens wurde dazu mit einem Gen-spezifischen Primer (3`RT, dabei handelt es sich um das gleiche Oligonukleotid wie in der RT-PCR-Reaktion) eine modifizierte RACE-Reaktion durchgeführt und dadurch insgesamt 1550 Basenpaare der BPLF1-mRNA in Richtung 5`-Ende des Gens identifiziert (siehe Abbildung 4.2). Der Einsatz von poly-A-aufgereinigter RNA in der cDNA-Synthese-Reaktion gewährleistete, dass es sich bei dem amplifizierten Transkript tatsächlich um prozessierte mRNA handelte. Das Ende des cDNA-Fragments lag an Position 66097 der EBV-Gesamtsequenz. Dabei brach das Transkript *in frame* mit dem offenen Leserahmen ab. Das abrupte Ende des amplifizierten Transkripts wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit durch einen Abbruch der RT-PCR infolge des hohen GC-Gehaltes der Sequenz hervorgerufen. Innerhalb des amplifizierten cDNA-Fragments wurden keine Spleißereignisse gefunden. Es handelte sich um ein durchgehendes Transkript, das ausgehend von dem genspezifischen Primer bis hin zur Abbruchstelle keine Sequenzverluste aufzeigte.

Um die BPLF1-mRNA weiter einzugrenzen, wurden ausgehend von dem bekannten Gen-Abschnitt weitere RT-PCR-Reaktionen durchgeführt. In diesen Reaktionen wurden verschiedenste Primer-Konstellationen getestet, die sowohl in Richtung 5`-Ende als auch in Richtung 3`-Ende der mRNA gerichtet und auf der restlichen Gensequenz verteilt waren. Mit Hilfe dieser RT-PCR-Reaktionen konnten weitere Bereiche des BPLF1-Leserahmens ausgeschlossen werden, die nicht an der Gen-spezifischen mRNA beteiligt sind.

Überprüfung der Spleißvorgänge in eukaryotischen Cos7-Zellen.

Die Ergebnisse aus der cDNA-Synthese zeigten, welche Bereiche des BPLF1-Gens mitunter an der mRNA beteiligt waren. Um die RNA weiter charakterisieren und auch mögliche Spleißvorgänge in eukaryotischen Zellen beobachten zu können, sollte das BPLF1-Gen in EBV-negativen Zellen vorübergehend überexprimiert und somit ausreichend mRNA für weitere Analysen produziert werden. Für diesen experimentellen Ansatz wurde der gesamte Leserahmen des BPLF1-Gens in den eukaryotischen Expressionsvektor pCDNA3 unter die Kontrolle des CMV-Promotors kloniert und in Cos7-Zellen transfiziert.

Durch Northernblot-Analysen wurde die Transkription des Leserahmens in den eukaryotischen Cos7-Zellen, ausgehend von dem transfizierten Expressionsplasmid, überprüft. Dabei konnte ein BPLF1-spezifischer RNA-„Schmier“ detektiert werden, dessen Menge durch die Induktion des Plasmid-kodierten CMV-Promotors stark erhöht werden konnte. Diese RNA-Population deutete darauf hin, dass von dem eingeführten Plasmid zwar eine BPLF1-spezifische RNA transkribiert wurde, die aber nicht der erwarteten RNA von 9,4 kbp bzw. ca. 3 kbp entsprach. Für das Auftreten der verkürzten Transkripte kamen verschiedene Ursachen in Frage. Zum einen bestand die Möglichkeit, dass keine vollständige Transkription der RNA von dem eingeführten Plasmid erfolgte. Möglicherweise sind für eine exakte Abschrift des BPLF-1-Gens *cis*-wirksame Sequenzmotive oder in *trans*-wirkende EBV-spezifische Faktoren notwendig. Ein weiterer Grund könnte in einer Instabilität und Degradierung der BPLF1-RNA liegen. Virus-spezifische, eventuell stabilisierende Faktoren sind in den EBV-negativen Cos7-Zellen nicht vorhanden und führen so unter Umständen zu einem sofortigen Abbau der neu synthetisierten RNA. Auch ein unsachgemäßes Spleißen könnte eine Ursache für die unerwartete Länge der BPLF1-Transkripte sein. Unter Umständen sind für das Spleißen der BPLF1-RNA viruseigene Endonukleasen notwendig, die spezifisch alternative Spleißstellen in der RNA erkennen können. Am wahrscheinlichsten erscheint jedoch eine unvollständige Transkription der RNA, da auch in poly-A aufgereinigter RNA keine BPLF1-spezifischen Signale detektiert werden konnten.

4.2 Das BPLF1-Protein – eine Tegumentkomponente

Die Erkenntnis, dass es sich bei BPLF1 um ein aktives Gen des Epstein-Barr-Virus handelte, war die Voraussetzung für weitere Untersuchungen zum Nachweis und zur Charakterisierung des BPLF1-Proteins. Der Nachweis eines gespleißten Transkripts während der späten lytischen Virusvermehrung deutete darauf hin, dass von dem Leserahmen auch ein funktionstüchtiges Protein exprimiert wird. Ähnlich wie bei der Untersuchung des BPLF1-Gens, wurden zunächst Computeranalysen durchgeführt, um wichtige Eigenschaften des Proteins aufzudecken. Verschiedene Anzeichen führten zu der Annahme, dass es sich bei dem BPLF1-Protein um ein Strukturprotein bzw. ein Tegumentprotein handeln könnte. In der *Swiss-Prot*-Datenbank wurde BPLF1 in eine Reihe unterschiedlicher herpesviraler Tegumentproteine eingeordnet. Dazu zählten unter anderem die bereits bekannten Leserahmen UL36 (VP1/2) von HSV1, UL48 von HCMV oder ORF24 von EHV1. Ein anderer Literaturhinweis (Roizman und Sears, 1996) deutete auf eine Homologie zwischen dem BPLF1-Protein und dem Transaktivator VP16 von HSV1. Bei VP16 handelt es sich um ein weiteres Tegumentprotein des Herpes-Simplex-Virus 1, das sowohl in seinen funktionellen Domänen als auch in seiner Wirkungsweise eingehend untersucht ist:

Durch die Fusion der Virus-Hüllmembran mit der Zellmembran wird das VP16-Protein bei der Infektion zusammen mit anderen Tegumentbestandteilen in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen. Nach dem Import in den Kern übt VP16 seine Funktion als Transaktivator für die sehr frühen Gene des Virus aus. Dabei erfolgt die Initiation der *immediate-early* Gene von HSV1, indem VP16 mit zwei zellulären Faktoren, dem *host cell factor* (HCF) und dem Oct-1-Bindeprotein, einen Multiproteinkomplex ausbildet, der an definierte Promotorsequenzen in den sehr frühen Genen bindet. An der Ausbildung des Multiproteinkomplexes und damit der Bindung an die DNA ist ausschließlich die aminoterminale VIC[12]-Domäne (AS 49-75 und AS 360-390) beteiligt. Die saure carboxyterminale Domäne (AS 410 –490) hingegen übernimmt die Aktivierung der sehr frühen Gene (Cress und Triezenberg, 1991). Damit VP16 seine transaktivierende Funktion ausführen kann, muss der Multiproteinkomplex eine *proximal promotor position* einnehmen, d.h. eine Position in relativ enger räumlicher Nähe zum Promotor. Dies ist erforderlich, um eine optimale Interaktion der sauren Aktivierungsdomäne von VP16 mit den Transkriptionsfaktoren, die für die Ausbildung des Präinitiationskomplexes bei der Transkription verantwortlich sind (besonders TFIID, TFIIB, TFIIA), zu gewährleisten. Durch diese Bindung kann innerhalb des Multiproteinkomplexes eine Konformationsänderung des VP16 Proteins erfolgen, die ihm die Interaktion mit den übrigen Transkriptionsfaktoren erlaubt. Die Bindung des Komplexes an eine *distal enhancer position* ermöglicht diese Konformationsänderung und damit eine Transaktivierung der Gene nicht. Die Funktion dieser positionsabhängigen Aktivierung könnte darin bestehen, dass durch die räumliche Nähe zum Promotor eine absolut spezifische Genaktivierung im eng gepackten HSV-Genom ermöglicht wird. Aber VP16 spielt nicht nur eine wichtige Rolle als Transaktivator, sondern ist auch unbedingt erforderlich für eine korrekte Virusreifung. In der späten Phase des lytischen Replikationszyklus bindet VP16 an das *vhs*-Protein (*virion host shutoff*) des Herpes-Simplex-Virus 1. Die Aufgabe dieses Proteins besteht normalerweise darin, den Abbau der zellulären und viralen mRNA zu beschleunigen (Kwong *et al.*, 1988). Spät im

[12] *VIC: VP16 induced complex*

Infektionszyklus wird es in der Zelle angehäuft und durch die Bindung an VP16 in das Virion-Tegument verpackt. Diese Bindung führt außerdem dazu, dass VP16 keinen Multiproteinkomplex mehr ausbilden kann und die Transaktivierung der sehr frühen Gene unterbleibt (Smibert *et al*., 1994).

Für den Homologie-Vergleich des EB-viralen Proteins BPLF1 mit VP16 wurden eine Reihe von Datenbankanalysen durchgeführt. Dabei konnte die in der Literatur vorausgesagte Homologie von 30 % zwischen den beiden Proteinen nur bedingt bestätigt werden. Beide Moleküle wiesen starke Größenunterschiede (BPLF1 3149 AS, VP16 490 AS) auf und zeigten jeweils nur über sehr kurze Bereiche eine gute Homologie zueinander. Dabei wurde jedoch deutlich, dass alle funktionell wichtigen Domänen des VP16-Proteins auch in der Sequenz von BPLF1 enthalten waren. Für kurze Folgen von 5 bis 28 Aminosäuren konnten Homologien von mehr als 80% detektiert werden (siehe Abbildung Abbildung 3.13). Die Orientierung bzw. die Anordnung der homologen Sequenzen im BPLF1-Protein war dabei jedoch genau entgegengesetzt zu der von VP16, d.h. die Domänen für die Ausbildung des Multiproteinkomplexes waren nicht im aminoterminalen, sondern im carboxyterminalen Bereich lokalisiert. Inwieweit diese guten Sequenzübereinstimmungen auch für die Funktion des BPLF1-Proteins eine Rolle spielen, kann zum jetzigen Zeitpunkt und alleine durch die Computeranalysen nicht beurteilt werden. Hierzu müssen experimentelle Nachweise getroffen werden. Neben den bereits erwähnten Tegumentproteinen konnte eine weitere Aminosäure-Sequenz aufgezeigt werden, die gute Übereinstimmungen zu BPLF1 aufwies. Der sehr große Leserahmen ORF22 des Varizella-Zoster-Virus (8289 bp) offenbarte eine 40 %ige Homologie zu BPLF1 über den gesamten Bereich. Auch dieses Protein wurde im Rahmen der *Swiss-Prot*-Datenbank-Analyse in die Reihe der Tegumentproteine eingeordnet. Da es sich jedoch auch bei diesem Protein um ein bislang nicht charakterisiertes Gen des Varizella-Zoster-Virus handelte, waren hinsichtlich der Funktion von BPLF1 keine weiteren Aussagen möglich.

Durch die Homologie-Vergleiche konnten keine weiteren Erkenntnisse bezüglich der Funktion von BPLF1 gewonnen werden, protein-spezifische Kennzeichen bestärkten jedoch die Vermutung, dass es sich bei BPLF1 um ein Strukturprotein handelt, das möglicherweise in das Tegument des Virus verpackt wird. Die Computer-Analysen deckten auf, dass das relativ instabile und möglicherweise phosphorylierte BPLF1-Protein im Zellkern lokalisiert ist. Verschiedenste Kernlokalisations-Signale deuteten darauf hin, dass das Protein als möglicher Tegumentbestandteil unmittelbar nach der Infektion der Wirtszelle durch das Virus in den Zellkern derselbigen geschleust werden und dort eine transaktivierende Funktion auf die sehr frühen Gene ausüben könnte. Auch für den Transaktivator VP16 wurde eine solche Vorgehensweise beschrieben. Ein weiterer Hinweis auf die Funktion als Tegumentkomponente lieferte das Expressionsmuster des BPLF1-Gens. Durch eine Aktivität während der späten lytischen Vermehrungsphase des Virus konnte das neusynthetisierte BPLF1-Protein möglicherweise direkt am Virusassembly beteiligt sein und anschließend als Tegumentprotein in das fertige Viruspartikel verpackt werden. Wie bereits erwähnt handelt es sich bei den meisten Tegumentproteinen um sogenannte *true late* Gene, die selbst erst sehr spät während der Virusvermehrung synthetisiert werden.

Auffällig bei der Analyse der Primärstruktur des BPLF1-Proteins erschien eine Prolin-reiche Region im Bereich der Aminosäuren 452 bis 606, d.h. relativ nahe am Aminoterminus des Proteins. Durch seine Ringstruktur übt Prolin generell einen deutlichen Einfluss auf die Architektur von Proteinen aus. Prolin scheut den Kontakt mit Wasser nicht

und ist häufig in Knicken gefalteter Proteinketten zu finden. Eine genaue Funktion für diese Prolin-reiche Region ist jedoch nicht bekannt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das BPLF1-Protein aufgrund seiner Größe, seines Expressionsmusters und auch im Vergleich mit anderen herpesviralen Tegumentproteinen durchaus der Familie der Strukturproteine zugeordnet werden kann.

Humanseren zeigten BPLF1-spezifische Antikörper und lieferten einen Hinweis auf das BPLF1-Protein.

Im Anschluss an die Computer-Analysen stand nun der experimentelle Nachweis des BPLF1-Proteins im Vordergrund. Da zu Beginn der Untersuchungen kein BPLF1-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, wurde zunächst ein indirekter Nachweis des Proteins angestrebt. Bakteriell exprimiertes BPLF1-Protein wurde dazu als Antigen in Westernblot-Analysen eingesetzt und mit humanen Patientenseren als Primärantikörper überprüft. Die Detektion eines positiven Signals konnte einen Hinweis darauf geben, dass Antikörper gegen das Protein in verschiedenen Patienten vorhanden waren und dass BPLF1 *in vivo* exprimiert wird.

Für die Westernblot-Analysen musste zunächst aufgereinigtes BPLF1-Protein zur Verfügung stehen. Ähnlich wie bei den Untersuchungen der RNA stellte jedoch auch hier die Größe des Proteins einen limitierenden Faktor dar. Ursprünglich musste von einem Protein mit mehr als 300 kDa ausgegangen werden. Dieses konnte in Bakterien nicht in seiner Gesamtheit exprimiert werden. Deshalb wurde das hypothetische Molekül in 5 überlappende Fragmente aufgeteilt, die eine maximale Größe von 100 kDa aufwiesen (siehe Abbildung 4.2). Die Auswahl wurde mit Hilfe des *Antigenic Index* getroffen, um zu vermeiden, dass hypothetisch antigene Domänen durch die Wahl der Fragmentgrenzen zerstört wurden. In Vorversuchen wurden die fünf Fragmente in unterschiedlichen Expressionssystemen getestet. Letztendlich konnte das Fragment BPLF1-II sehr gut als GST-Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt, sowie anschließend erfolgreich als Antigen in Westernblot-Analysen eingesetzt werden.

Die verschiedenen Humanseren, die als Primärantikörper in den Westernblot-Analysen dienten, wurden eingehend auf ihren Virus-Status sowie EBV-spezifische Antikörper überprüft. Zur Diagnose von EBV-Infektionen und EBV-assoziierten Erkrankungen steht generell eine umfangreiche EBV-Serolgie mittels ELISA (Enzym-Immunoassay) und Immunfluoreszenztest (IFT) zur Verfügung (siehe Abbildung 4.3 und Tabelle 4.1). Da verschiedene Antikörper zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion festzustellen sind, ist mit einer Serumprobe und der Untersuchung mehrerer EBV-spezifischer Antikörper meist schon eine differenzierte Beurteilung möglich. Zur Bestätigung einer EBV-Infektion werden dabei die Antikörpertiter gegen die EBV-Antigenklassen EA („*early-antigen*"-Komplex), gegen die Kapsidantigene VCA (*virus capsid antigen*, *late*) und gegen nukleäre Antigene (EBNA, latent), insbesondere EBNA-1 der Immunglobulintypen IgG, IgM und IgA bestimmt. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Zuteilung der Antikörper zu den Krankheitsbildern. Die Tabelle zeigt auch, dass die alleinige Bestimmung eines einzelnen Antikörpers im IFT (oder Elisa) nicht ausreichend ist. Nur die Kombination verschiedener Antikörperbestimmungen ergibt ein typisches Muster, welches die differenzierte Beurteilung ermöglicht.

Tabelle 4.1 Serologische Profile von EBV-assoziierten Erkrankungen. (Ergebnisse aus dem IFT)

Antikörper gegen Antigen	Laufende Primärinfektion, IM	Kürzlich durchgemachte Primärinfektion	Seropositiv gesund	Seropositiv Reaktivierung	Burkitt`s-Lymphom	Nasopharynx-Karzinom (NPC)
IgM VCA	+	-	-	-	-	-
IgG VCA	++	++	+	+++	++	++
IgA VCA	+/-	-	-	+/-	-	++
IgG EA	+	+	-	+/-	-	++
IgA EA	-	-	-	-	-	++
Anti-EBNA	-	+/-	+	+	+	+

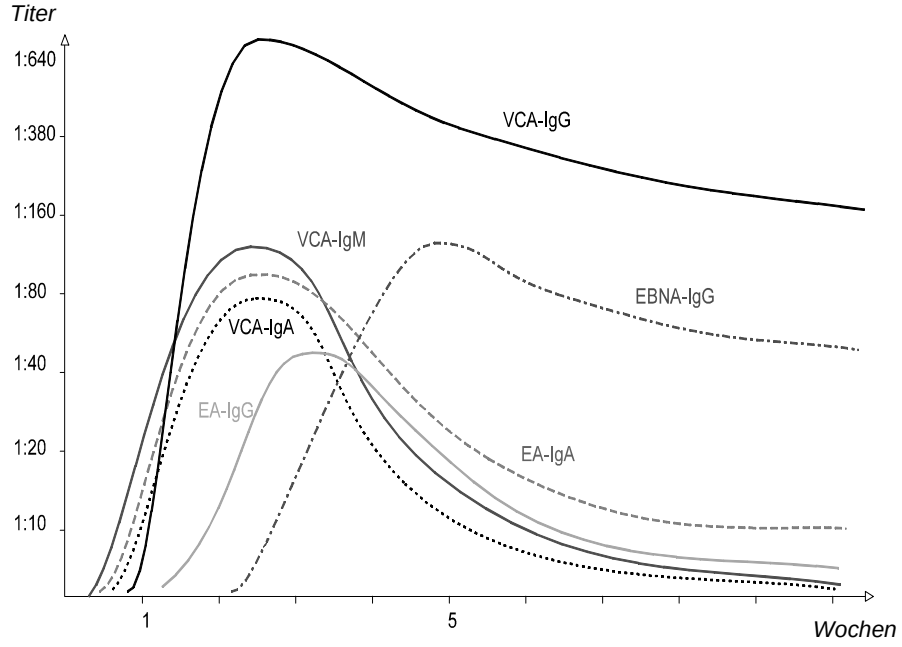


Abbildung 4.3 Verlauf der Antikörperbildung bei einer Epstein-Barr-Virus-Infektion. Angegeben sind die Antikörper der Klassen IgM, IgG und IgA, die man zu den verschiedenen Zeiten im Verlauf einer Primärinfektion mit dem Epstein-Barr-Virus durch den Immunfluoreszenztest nachweisen kann (EA= *early antigen*, frühe Virusproteine; EBNA= *Epstein-Barr virus nuclear antigen*; VCA= *virus capsid antigen*, Strukturproteine)

Zum Zeitpunkt der Symptome der Primärinfektion sind IgM-, IgG- und IgA-Antikörper gegen das VCA-Antigen in der Regel nachweisbar. Im Gegensatz zu den IgG-Antikörpern verschwinden die IgM-Antikörper zumeist 4-5 Wochen nach Auftreten der klinischen Symptomatik und ihr Nachweis gilt als nahezu beweisend für eine frische EBV-Infektion. IgG gegen die Strukturproteine (VCA) hingegen bleibt lebenslang vorhanden. Hohe Titer oder ein Titeranstieg von anti-VCA IgG werden auch beim NPC oder BL gesehen. IgG-

Antikörper gegen EA treten zum Zeitpunkt der Symptomatik oder 2-3 Wochen danach auf. Sie bleiben insgesamt über einen Zeitraum von 6 - 12 Monaten, selten 2 - 4 Jahren nachweisbar. Das Vorhandensein von Anti-EA-Antikörpern spricht also für eine frische oder vor kurzem stattgefundene EBV-Infektion. Als weiterer wichtiger Parameter in der Frühphase der IM und beim NPC gilt der Nachweis von Anti-VCA-IgA und Anti-EA-IgA in hohen Titern. In Südchina wird dieser Nachweis für die Frühdiagnose von NPC eingesetzt, in der westlichen Welt dient er zur Therapiekontrolle und als Verlaufsparameter, wobei der Wiederanstieg des Titers das Rezidiv anzeigt. Nie im früh-akuten Stadium werden Anti-EBNA-1-IgG-Antikörper gefunden. Diese lassen sich erst nach Wochen oder Monaten nachweisen und erreichen ihr Maximum nach etwa einem halben Jahr. Sie bleiben lebenslang nachweisbar und schließen eine frische Infektion weitgehend aus. Sie sind ein diagnostisches Anzeichen für eine abgelaufene Epstein-Barr-Virus-Infektion. Bei Patienten mit einer chronisch-aktiven Epstein-Barr-Virus-Infektion fehlen sie meist. Das weist darauf hin, dass das Virus bei diesen Personen nicht oder nur in geringem Ausmaß in den latenten Zyklus übergeht und EBNA-Proteine deswegen nur in niedrigen Konzentrationen synthetisiert werden. EBV-negative Patienten weisen keinerlei Antikörper gegen die EBV-spezifischen Antigene auf.

Für den Nachweis BPLF1-spezifischer Antikörper wurden Seren EBV-negativer Personen, Seren von Patienten mit Primärinfektion bzw. Infektiöser Mononukleose, seropositiver Gesunder, NPC-Patienten und von Personen mit einer Reaktivierung bzw. hohen Titern an IgA gegen VCA/EA verwendet. In einigen Patientenseren konnte das Vorhandensein BPLF1-spezifischer Antikörper gezeigt werden. Besonders auffällig erschien, dass in erster Linie Patienten mit starker Vermehrung des Virus Antikörper gegen das BPLF1-Protein aufwiesen. Dabei zeigten in 100 % der Fälle die Seren positive Signale, die von Patienten mit NPC oder hohen Titern an IgA-Antikörper gegen VCA bzw. EA stammten. Personen mit starker Vermehrung aufgrund einer Primärinfektion (Infektiöser Mononukleose) oder einer Reaktivierung wiesen in 10 % bzw. 30 % der Fälle BPLF1-spezifische Antikörper auf. EBV-negative Personen zeigten keine und Seropositiv-Gesunde lediglich in 3 % der untersuchten Fälle positive Signale. Diese Beobachtungen bestärkten die Ergebnisse aus den RT-PCR und Northernblot-Analysen. Offensichtlich steht die Aktivität des BPLF1-Gens und damit die Expression des BPLF1-Proteins in Zusammenhang mit einer starken systemischen Vermehrung des Virus. Eine eindeutige Eingrenzung auf bestimmte Patientengruppen ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich und erfordert umfangreiche Untersuchungen weiterer Humanseren. Besonders auffällig erschien jedoch die Präsenz BPLF1-spezifischer Antikörper in Tumorpatienten und in Personen mit hohen Titern an IgA-Antikörpern gegen VCA/EA. Inwieweit der Nachweis des BPLF1-Proteins in Zukunft als ein weiterer Parameter für die EBV-Diagnostik eingesetzt werden kann, ist momentan noch nicht untersucht. Die Existenz des BPLF1-Proteins *in vivo* wurde jedoch durch diese Versuche eindeutig geklärt.

Der Nachweis des BPLF1-Proteins mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Die Existenz des BPLF1-Genprodukts war eindeutig gezeigt. Aussagen bezüglich Größe, Lokalisation, Expressionszeitpunkt oder Zellspezifität konnten dadurch jedoch nicht getroffen werden. Somit wurde in einem nächsten Schritt der Nachweis des BPLF1-Proteins selbst angestrebt. Mit Hilfe von Westernblot-Analysen und einem BPLF1-spezifischen Antikörper sollte das Protein selbst identifiziert und genauer charakterisiert werden. Da für die Detektion kein kommerzieller BPLF1-spezifischer Antikörper zur

Verfügung stand, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein polyklonales Kaninchen-Serum (=Antiserum) hergestellt, das Antikörper gegen einen bestimmten Anteil des BPLF1-Proteins enthielt. Für die Immunisierung des Kaninchens wurde bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes BPLF1-GST-Fusionsprotein eingesetzt. Da jedoch wiederum nicht das gesamte BPLF1-Protein synthetisiert werden konnte, wurde ein Bereich des Gens ausgewählt, von dem man ausgehen konnte, dass er mit hoher Wahrscheinlichkeit im Protein enthalten ist. Am besten geeignet erschien der Anteil der Sequenz, der bereits in der cDNA identifiziert worden war. Somit konnte man davon ausgehen, dass dieser Bereich in der mRNA enthalten war und exprimiert wurde. Die Immunisierung des Kaninchens wurde erfolgreich durchgeführt. Dies konnte durch den Nachweis des ursprünglich exprimierten BPLF1-Proteinfragments in Westernblot-Analysen gezeigt werden. Die Spezifität des Serums für den Proteinanteil wurde durch die Absättigung des Kaninchen-Serums mit GST-haltigem Bakterienlysat überprüft. Ursprünglich wurde von einem Protein von mehr als 300 kDa ausgegangen. Die Ergebnisse aus den Northernblot-Analysen ließen jedoch nur ein Protein von ca. 100 kDa erwarten. Für den Nachweis des Proteins wurden EBV-negative Zellen (Negativkontrolle), induzierte P3HR1/16-Zellen (in diesen wurde die RNA in der späten lytischen Phase detektiert) und aufgereinigte Viruspartikel des Virus-Stamm B95-8 eingesetzt. Der Nachweis des BPLF1-Proteins konnte leider nicht erfolgreich durchgeführt werden. Sowohl in den induzierten Zellen als auch in den aufgereinigten Viruspartikeln wurde kein spezifisches Protein detektiert. Dies konnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Ein Grund konnte in der Menge des produzierten Proteins liegen. Es ist möglich, dass durch die Induktion der EBV-positiven Zellinie P3HR1/16 nicht ausreichend Protein synthetisiert wurde, um dieses auch in Westernblot-Analysen detektieren zu können. Aus diesem Grund wurde der Nachweis in Viruspartikeln angestrebt, der jedoch auch negativ verlief. Als weiterer möglicher Grund konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der BPLF1-Proteinanteil, der für die Immunisierung verwendet wurde, zwar immunogen war, *in vivo* im Kontext des vollständigen Proteins aber nicht von Bedeutung ist. Möglicherweise wurden BPLF1-spezifische Antikörper synthetisiert, die das bakteriell exprimierte BPLF1-Protein hervorragend detektierten, *in vivo* aber kein BPLF1-Protein-Epitop erkannten.

Aufklärung der Funktion des BPLF1-Proteins durch Herstellung eines rekombinanten EBV.

Parallel zur Aufklärung des Proteins und seiner Eigenschaften, wurden auch Vorbereitungen getroffen, die Funktion des BPLF1-Proteins zu zeigen. Zu diesem Zweck sollte ein rekombinantes EBV hergestellt werden, in dem das BPLF1-Gen komplett bzw. teilweise eliminiert wurde. Abbildung 4.4 zeigt schematisch einen Überblick, welche Bereiche des BPLF1-Gens entfernt werden sollten. Dabei musste bedacht werden, dass auf beiden Strängen des EBV-Genoms Gene kodiert sind. Die Entfernung des gesamten BPLF1-Gens hätte somit zur Folge, dass auch Bereiche des EBNA-Gens entfernt würden. Um keine essentiell wichtigen Sequenzen zu zerstören, wurden in verschiedenen Ansätzen Teilbereiche von BPLF1-entfernt.

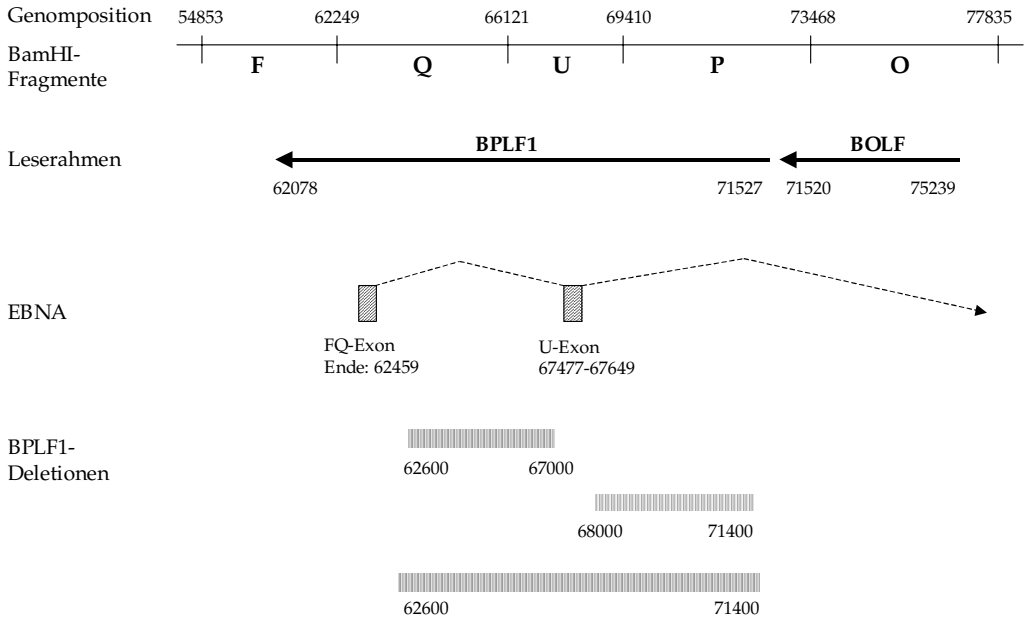


Abbildung 4.4 Schematische Übersicht über die Bereiche des BPLF1-Gens die in einem rekombinanten EBV eliminiert werden sollten. Auf dem doppelsträngigen DNA-Genom des Epstein-Barr-Virus sind die Gene in beiden Orientierungen kodiert. Auf dem Gegenstrang zu dem Leserahmen BPLF1 ist das EBNA-Gen lokalisiert. Um keine wichtigen Exon-Strukturen dieses Gens zu zerstören, sollten für das rekombinante EBV in mehreren Ansätzen verschiedene Teilbereiche und zur Aufklärung der Funktion auch das gesamte BPLF1-Gen eliminiert werden (blau gekennzeichnet).

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 durch diese Methode keine Gene untersucht werden, die an der Immortalisierung von B-Zellen beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Herstellung rekombinanter Epstein-Barr-Viren nach einem von Dr. H.-J. Delecluse (Delecluse *et al*., 1998) modifizierten System der Methode von Messerle (Messerle *et al*., 1997) durchgeführt werden. 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. Die gesamten Klonierungs-, Rekombinations- und Selektionsschritte finden dabei zunächst in *E.coli* statt und sind von der immortalisierenden Eigenschaft des EBV unabhängig. Die Technik zur Herstellung rekombinanter EB-Viren nach Delecluse *et al.* ist in der Dissertation von Dr. H. Sommer (Dissertation Universität Regensburg, 2001) detailliert beschrieben. Ausgehend von einem BAC-Plasmid, welches das gesamte EBV-Genom (B95-8) umfasst, erfolgt dabei die Rekombination mit dem entsprechend mutierten Rekombinationsplasmid in *E.coli*. Nach erfolgreicher Rekombination und Selektion wird das so mutierte EBV-Genom wieder in EBV-negative eukaryotische Zellen transfiziert und die Produktion infektiöser Viruspartikel überprüft. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die für die homologe Rekombination notwendigen Plasmide kloniert und auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

Der Anhang A.7 zeigt eine detaillierte Beschreibung der Plasmide. Diese können nun direkt in die homologe Rekombination mit dem BAC-Plasmid eingesetzt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei BPLF1 um ein aktives und funktionstüchtiges Gen des Epstein-Barr-Virus handelt. In den verschiedenen Versuchs-Ansätzen wurden die Besonderheiten des Gens deutlich. Nicht nur die Größe des Leserahmens, sondern auch die Umsetzung der genetischen Information erfolgt offensichtlich nicht nach herkömmlichen Regeln. Möglicherweise stellt BPLF1 somit eine neue Klasse von EB-viralen Genen dar, die noch deutlicher zeigt, welche Komplexität dieses Virus besitzt.

LITERATURVERZEICHNIS

Abbot, S.D., Rowe, M., Cadwallader, K. *et al*. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) induces expression of the virus-coded latent membrane protein (LMP). *J Virol*. **64**, 2126-2134.

Alfieri, C., Birkenbach, M. und Kieff, E. (1991). Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes [published erratum appears in Virology 1991 Dec; 185(2):946]. *Virology*. **181**, 595-608.

Allday, M.J., Crawford, D.H. (1988). Role of epithelium in EBV persistence and pathogenesis of B-cell tumors. *Lancet*. **1**, 855-857.

Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C. und Stein, H. (1995). Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood*. **85**, 744-750.

Arrand, J.R., Rymo, L., Walsh, J.E., Bjorck, E., Lindahl, T. und Griffin, B.E. (1981). Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments. *Nucleic Acids Res*. **9**, 2999-3014.

Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M., Thorley-Lawson, D.A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunitiy*. **9**, 395-404.

Bachmair, A., Finley, D. und Varshavsky A. (1986). *Science*. **234,** 179-186

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. und Barrell, B.G. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*. **310**, 207-211.

Banfield, B.W. und Tufaro, F. (1990). Herpes simplex virus particles are unable to traverse the secretory pathway in the mouse L-cell mutant gro29. *J Virol*. **64**, 5716-5729.

Bauer, G., Hofler, P. und Zur. H.H. (1982). Epstein-Barr virus induction by a serum factor. Induction and cooperation with additional inducers. *Virology*. **121**, 184-194.

Ben-Bassat, H., Polliack, A., Mitrani-Rosenbaum, S., Reichert, F., Froimovici, M. und Goldblum, N. (1977). A comparative study of human cell lines derived from patients with lymphoma, leukemia and infectious mononucleosis: membrane properties, ultrastructure, and surface morphology. *Cancer*. **40 (4),**1481-91.

Birx, D.L., Redfield, R.R. und Tosato, G. (1986). Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related disorders. *N Engl J Med*. **314**, 874-879.

Bogedain, C. Wolf, H., Modrow, S., Stuber, G. und Jilg, W. (1995). Specific cytotoxic T lymphocytes recognize the immediate-early transactivator Zta of Epstein-Barr virus. *J. Virol*. **69**, 4872-4879.

Browne, H., Bell, S., Minson, T. und Wilson, D.W. (1996). An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions: evidence for reenvelopment during egress. *J Virol*. **70**, 4311-4316.

Buisson, M., Manet, E., Trescol-Biemont, M.C., Gruffat, H., Durand, B. und Sergeant, A. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) early protein EB2 is a posttranscriptional activator expressed under the control of EBV transcription factors EB1 and R. *J Virol*. **63**, 5276-5284.

Burkhardt, A.L., Bolen, J.B., Kieff, E. und Longnecker, R. (1992). An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *J Virol*. **66**, 5161-5167.

Burkitt, D. (1958). A 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.

Campadelli-Fiume, G., Farabegoli, F., Di Gaeta, S. und Roizman, B. (1991). Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with herpes simplex virus1. *J Virol*. **65**, 1589-1595.

Campadelli-Fiume, G., Brandimarti, R., Di Lazzaro, C., Ward, P.L., Roizman, B. und Torrisi, B.R. (1993). Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**, 2798-2802.

Campbell, M.E., Palfreyman, J.W. und Preston, C.M. (1984). Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a *trans*-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *J Mol Biol*. **180**, 1-19.

Card, J.P., Rinaman, L. Lynn, R.B., Lee, B.H., Meade, R.P., Miselis, R.R. und Enquist, L.W. (1993) Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system: ultrastructural characterization of viral replication, transport, and pathogenesis. *J Neurosci*. **13**, 2515-2539.

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

Cherepanov, P.P. und 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 (1),** 9-14.

Clarke, P.A., Sharp, N.A. und Clemens, M.J. (1992). Expression of genes for the Epstein-Barr virus small RNAs EBER-1 and EBER-2 in Daudi Burkitt`s Lymphoma cell: effects of interferon treatment. *J Gen Virol*. **73**, 3169-3175

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

Cooper, N.R., Bradt, B.M., Rhim, J.S. und Nemerow, G.R. (1990). CR2 complement receptor. *J Invest Dermatol*. **94**, 112S-117S.

Countryman, J., Jenson, H., Siebl, R., Wolf, H. und Miller, G. (1987). Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency. *J Virol*. **61**, 3672-3679.

Delecluse, H.J., Bartnizke, S., Hammerschmidt, W., Bullerdiek, J. und 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. und 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 (14)**, 8245-50.

Diehl, V., Henle, G., Henle, W. und Kohn, G. (1968). Demonstration of a herpes group virus in cultures of peripheral leukocytes from patients with infectious mononucleosis. *J Virol*. **2**, 663-669.

Di Lazzaro, C., Campadelli-Fiume, G. und Torrisi, M.R. (1995). Intermediate forms of glycoconjugates are present in the envelope of herpes simplex virions during their transport along the exocytic pathway. *Virology*. **214**, 619-623.

Donnelly, M. und Elliott, G. (2001a). Nuclear localization and shuttling of Herpes simplex virus tegument protein VP13/14. *J Virol*. **75**, 2566-2574.

Donnelly, M. und Elliott, G. (2001b). Fluorescent tagging of Herpes simplex virus tegument protein VP13/14 in virus infection. *J Virol*. **75**, 2575-2583.

Eliopoulos, A.G., Stack, M., Dawson, C.W. *et al*. (1997). Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene*. **14**, 2899-2916.

Enquist, L.W., Husak, P.J., Banfield, B.W. und Smith, G.A. (1998). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res*. **51**, 237-347.

Epstein, M.A. und Barr, Y.M. (1964a). Cultivation in vitro of human fibroblasts from Burkitt`s malignant lymphoma. *Lancet*. **1**, 252-253.

Epstein, M.A. und Barr, Y.M. (1964b). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt`s lymphoma. *Lancet*. **1**, 702-703.

Epstein, M.A.; Barr, Y.M. und Achong, B.G. (1965). Studies with Burkitt's lymphoma. *Wistar Inst Symp Monogr*. **4**, 69-82.

Fingeroth, J.D., Clabby, M.L. und Strominger, J.D. (1988). Characterization of a T-lymphocyte Epstein-Barr virus/C3d receptor (CD21). *J Virol*. **62**,, 1442-1447.

Fingeroth, J.D., Diamond, M.E., Sage, D.R., Hayman, J. und Yates, J. (1999). CD21-Dependent infection of an epithelial cell line, 293, by Epstein-Barr virus. *J Virol*. **73**, 2115-2125.

Fixman, E.D., Hayward, G.S. und Hayward, S.D. (1992). Trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. J Virol. **66**, 5030-5039.

Floettmann, J.E., Eliopoulos, A.G., Jones, M., Young, L.S. und Rowe, M. (1998). Epstein-Barr

virus latent membrane protein-1 (LMP1) signalling is distinct from CD40 and involves physical cooperation of its two C-terminus functional regions. *Oncogene*. **17**, 2383-2392.

Frade, R., Barel, M., Ehlin-Henriksson, B. und 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.

Frangioni, V.J. und Neel, B.G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active Glutatione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analyt Biochem*. **210**, 179-187.

French, C., Menegazzi, P., Nicholson, L., Macaulay, H., DiLuca, D. und Gompels, U.A. (1999). Novel, nonconsensus cellular splicing regulates expression of a gene encoding a chemokine-like protein that shows high variation and is specific for Human herpesvirus 6. *Virology*. **262**, 139-151.

Fries, K.L., Miller, W.E. und Raab-Traub, N. (1996). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol*. **70**, 8653-8659.

Fries, K.L., Sculley, T.B., Webster-Cyriaque, J., Rajadurai, P., Sadler, R.H. und 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. und 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. und Longnecker, R. (1997). The immunoreceptor tyrosine-based activation motiv of Epstein-barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction *Virology*. **235**, 241-251.

Fruehling, S., Swart, R., Dolwick, K.M., Kremmer, E. und Longnecker, R. (1998). Tyrosine 112 of latent membrane protein 2A is essential for protein tyrosine kinase loading and regulation of Epstein-Barr virus latency. *J Virol*. **72**, 7796-7806.

Furlong, D., Swift, H. und Roizman, B. (1972). Arrangement of herpesvirus desoxyribonucleic acid in the core. *J Virol*. **10**, 1071-1074.

Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E. *et al*. (1999) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*. **18**, 3064-3073.

Gires, O., Zimber-Strobl, U., Gonnella, R. *et al*. (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J*. **16**, 6131-6140.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. **23 (1),** 175-82.

Gong, M. und Kieff, E. (1990) Intracellular trafficking of two major Epstein-Barr virus glycoproteins, gp350/220 and gp110. *J Virol*. **64**, 1507-1516.

Granzow, H., Weiland, F., Jöns, A., Klupp, B.G., Karger, A. und Mettenleiter, T.C. (1997).

Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol*. **71**, 2072-2082.

Granzow, H., Klupp, B.B., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N. und Mettenleiter, T.C. (2001). Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol*. **75**, 3675-3684.

Grapes, M. und O`Hare, P. (2000). Differences in determinants required for complex formation and transactivation in related VP16 proteins. *J Virol*. **74**, 10112-10121.

Gratama, J.W., Oosterveer, M.A.P., Zwann, F.E., Lepoutre, J., Klein, G. und Ernberg, I. (1988). Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**, 8693-8696.

Greaves, R.F. und O`Hare, P. (1990). Structural requirements in the Herpes simplex virus type 1 transactivator Vmw65 for interaction with the cellular octamer binding protein and target TAATGARAT sequences. *J Virol*. **64**, 2716-2724.

Greenspan, J.S., Greenspan, D., Lenette, E.T., Abrams, D.I., Conant, M.A., Petersen, V. und 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.

Grogan, E., Jenson, H., Countryman, J., Heston, L., Gradoville, L. und Miller, G. (1987).Transfection of a rearranged viral DNA fragment, Wzhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 1332-1336.

Guruprasad, K., Reddy, B.V.B. und Pandit, M.W. (1990). *Protein Engineering*. **4**, 155-161.

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

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

Henderson S., Rowe, M., Gregory, C. *et al*. (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. und Peterson, M.G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science*. **265**, 92-95.

Henle, G. und Henle, W. (1966). Immunofluorescence in cells derived from Burkitt`s lymphoma. *J Bacteriol*. **91**, 1248-1256.

Henle, G., Henle, W. und 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.

Hitt, M.M., Allday, M.J., Hara, T., Karran, L., Jones, M.D., Busson, P., Tursz, T., Ernberg, I. und Griffin, B.E. (1989). EBV gene expression in an NPC-related tumour. *EBMO J*. **8**, 2639-2651.

Holley Guthrie, E.A., Quinlivan, E.B., Mar, E.C. und Kenney, S. (1990). The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *J. Virol*. **64**, 3753-3759.

Howe, J.G. und 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.

Irmiere, A. und Gibson, W. (1983). Isolation and characterization of a non-infectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*. **130**, 118-133.

Johnson, D.C. und Spear, P.G: (1982). Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J Virol*. **43**, 1102-1112.

Kaiseries, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W. und Kempkes, B. (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol*. **73**, 4481-4484.

Karajannis, M.A., Hummel, M., Anagnostopoulos, I. und Stein, H. (1997). Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *Blood*. **89**, 2856-2862.

Kenney, S., Kamine, J., Holley Guthrie, E., Lin, J.C., Mar, E.C. und 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.

Kenney, S. und Zalani, S. (1995). Regulation of BZLF1 function by viral and host cell factors. *Epstein-Barr virus-report.* **2/2**, 23-28.

Kienzle, N., Buck, M., Greco, S., Krauer, K. und Sculley, T.B. (1999). Epstein-Barr virus-encoded RK-BARF0 protein expression. *J Virol*. **78**, 8902-8906.

Kieff, E. (1996). *Virology* [Fields B.N. und Knipe, D.M. (Eds)]. Third edition, 1889-1911.

Kieseries, A., Kilger, E., Gires, O. *et al*. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J*. **16**, 6478-6485.

Kilger, E., Kieseries, A., Baumann, M. und Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J*. **17**, 1700-1709.

Knutson, J.C. (1990). The level of c-frg RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J Virol*. **64**, 2530-2536.

Kulwichit, W. Edwards, R.H., Davenport, E.M., Baskar, J.F., Godfrey, V. und Raab-Traub, N. (1998). Expression of the EpsteinBarr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 11963-11968.

Kwong, A.D., Kruper, J.A. und Frenkel, N. (1988). Herpes simplex virus virion host shutoff function. *J Virol*. **62**, 912-921.

Laherty, C.D., Hu, H.M., Opipari, A.W., Wang, F. und Dixit, V.M. (1992). Epstein-Barr virus

LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kB. *J Biol Chem*. **267**, 24157-24160.

Lai, J.S. und Herr, W. (reprint author) (1997). Interdigitated residues within a small region of VP16 interact with Oct1, HCF and DNA. *Mol Cell Biol*. **17**, 3937-3946.

Laemmli, U.K., Beguin, F. und Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol*. **47 (1)**, 69-85.

Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V. *et al*. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* **375**, 685-688.

Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. und Masucci, M.G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**, 12616-12621.

Levy, J.A. und Henle, G. (1966). Indirect immunofluorescence tests with sera from African children and cultured Burkitt lymphoma cells. *J Baceriol*. **92**, 275-276.

Lewin, N., Aman, P., Akerlund, B., Gustavsson, E., Carenfelt, C., Lejdeborn, L., Klein, G. und Klein, E. (1990). Epstein-Barr virus-carrying B cells in the blood during acute infectious mononuleosis give rise to lymphoblastoid lines in vitro by release of transforming virus and by proliferation. *Immunol Lett*. **26**, 59-65.

Liebowitz, D. (1998). Epstein-Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *N Engl J Med*. **338**, 1413-1421.

Lindahl, T., Adams, A., Bjursell, G., Bornkamm, G.W., Kaschka-Dierich, C. und Jehn, U. (1976) Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol*. **102**, 511-530.

Longnecker, R. und Miller, C.L. (1996). Regulation of Epstein-Barr virus latency by latent membrane protein 2. *Trends Microbiol*. **4**, 38-42.

Luka, J., Kallin, B. und Klein, G. (1979). Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology*. **94**, 228-231.

Marschall, M., Schwarzmann, F., Leser, U., Oker, B., Alliger, P., Mairhofer, H. und Wolf, H. (1991). The BI`LF4 trans-activator of Epstein-Barr virus is modulated by type and differentiation of the host cell. *Virology*. **181**, 172-179.

Masucci, M.G. and Ernberg, I. (1994). Epstein-Barr virus: adaptation to a life within the immune system. *Trends Microbiol*. **2**, 125-130.

McLauchlan, J. und Rixon, F.J. (1992). Characterization of enveloped tegument structures (L particles) produced by alphaherpesviruses: integrity of the tegument does not depend on the presence of capsid or envelope. *J Gen Virol*. **73**, 269-276.

McNabb D.S. und Courtney R.J. (1992). Analysis of the UL36 open reading frame encoding the large tegument protein (ICP1/2) of Herpes simplex virus type 1. *J Virol*. **66**, 7581-7584.

Mellinghof, I., Daibata, M., Humphreys, R.E., Mulder, C., Takada, K. und Sairenji, T. (1991). Early events in Epstein-Barr virus genome expression after activation: regulation by second messengers of B cell activation. *Virology*. **185**, 922-928.

Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H., und 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 (26),**14759-63.

Middleton, T. und Sugden, B. (1992). EBNA1 can link the enhancer element to the initiator element of the Epstein-Barr virus plasmid origin of DNA replication. *J Virol*. **66**, 489-495.

Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D. und Lipman, M. (1972). Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **69(2),** 383-7.

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

Mosialos, G. Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T. Ware, C. und Kieff, E. (1995).The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*. **80**, 389-399.

Moriuchi, H. Moriuchi, M., Straus, S.E. und Cohen, J.I. (1993). Varicella-zoster virus open reading frame 10 protein, the Herpes simplex virus VP16 homolog, transactivates herpesvirus immediate-early gene promoters. *J Virol*. **67**, 2739-2746.

Muraki, Y., Yamada, M., Yoshida, M., Yamada, S., Padilla, J., Hatano, Y., Hiramatsu, Y., Uno, F. und Nii, S. (1996). Electron microscopic observations of aberrant capsids of pseudorabies virus. *J Electron Microsc*. **45**, 223-231.

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

Niedobitek, G. Agathanggelou, A., Herbst, H. Whitehead, L., Wright, D.H., Young, L.S. (1997). Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol*. **182,** 151-159.

Nii, S., Morgan, C. und Rose, H.M. (1968). Electron microscopy of herpes simplex virus. II. Sequence and development. *J Virol*. **2**, 517-536.

Nii, S. (1992). Electron microscopic study on the development of herpesviruses. *J Electron Microsc*. **41**, 414-423.

O´Hare, P., Goding, C.R. und Haigh, A. (1988). Direct combinatorial interaction between a herpes simplex virus regulatory protein and a cellular octamer-binding factor mediates specific induction of virus immediate-early gene expression. *EMBO J*. **7**, 4231-4238.

O`Reilly, D., Hanscombe, O., O´Hare, P. (reprint author) (1997). A single serine residue at position 375 of VP16 is critical for complex assembly with Oct1 and HCF and is a target of

phosphorylation by casein kinase II. *EMBO J*. **16**, 2420-2430.

Polack, A., Hartl, G., Zimber, U., Freese, U.K., Laux, G., Takaki, K., Hohn, B., Gissmann, L. und Bornkamm, G.W. (1984). A complete set of overlapping cosmid clones of M-ABA virus derived from nasopharyngeal carcinoma and its similarity to other Epstein-Barr virus isolates. *Gene*. **27**, 279-288.

Pope, J.H., Achong, B.G., Epstein, M.A. und 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.S., Hornef, M.W., Jaeger, M., Wagner, H.J., Wolf, H. und Schwarzmann, F. (1997). Lytic replication of Epstein-Barr virus in the peripheral blood: analysis of viral gene expression in B lymphocytes during infectious mononucleosis and in the normal carrier state [see comments]. *Blood*. **89**, 1665-1677.

Prang, N. Wolf, H. und Schwarzmann, F. (1999). Latency of Epstein-Barr virus is stabilized by antisense-mediated control of the viral immediate-early gene BZLF1. *J Med Virol*. **59**, 512-519.

Pulvertaft, R.J.V. (1964). Cytology of Burkitt`s tumor (African lymphoma). *Lancet*. **1**, 238-240.

Qu, L. und Rowe, D.T. (1992). Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes. *J Virol*. **66**, 3715-3724.

Radsak, K., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hübinger, A. und Reschke, M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol*. **141**, 557-572.

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

Reisman, D. und Sugden, B. (1986). Trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. *Mol Cell Biol*. **6**, 3838-3846.

Rickinson, A.B. und Kieff, E. (1996). *Fields Virology* (Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (Eds.) Third edition. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia. 2397-2446.

Rixon, F.J., Addison, C. und McLauchlan, J. (1992). Assembly of enveloped tegument structures (L particles) can occur independently of virion maturation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Gen. Virol*. **73**, 277-284.

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

Robertson, E.S., Lin, J. und Kieff, E. (1996). The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ (kappa). *J Virol*. **70**, 3068-3074.

Roizman, B., Carmichael, L.E., Deinhart, F., de-The, G., Nahmias, A.J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. und Wolf, K. (1981). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, The International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*. **16**, 201-217.

Roizman, B. (1996). The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci US A*. **93**, 11307-11312.

Roizman, B. und Sears, A.E. (1996). Herpes simplex viruses and their replication, p. 2231-2295. *In* B.N. Fields, Knipe, D.M. und Howley P.M. (Eds.), Fields virology, Third edition, vol 2. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia.

Rooney, C., Howe, J.G., Speck, S.H. und 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. und 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.

Rowe, D.T. (1999). Epstein-Barr virus immortalization and latency. *Front Biosci*. **4**, D346-D371.

Sadler, R.H. und Raab-Traub, N. (1995). Structural analysis of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J Virol*. **69**, 1132-1141.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY).

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977 [classical article]. *Biotechnology*. **24**, 104-108.

Serio, T.R., Cahill, N., Prout, M.E. und Miller, G. (1998). A functionally distinct TATA box required for late progression through the Epstein-Barr virus life cycle. *J Virol*. **72**, 8338-8343.

Sharp, T.V., Schwemmle, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, C.G., Hilse, K. und 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.

Simmen, K.A., Newell, A., Robinson, M., Mills, J.S., Canning, G., Handa, R., Parkes, K., Borkakoti, N. und Jupp, R. (1997). Protein interactions in the herpes simplex virus type 1 VP16-induced complex: VP16 peptide inhibition and mutational analysis of host cell factor requirements. *J Virol*. **71**, 3886-3894.

Sinclair, A.J., Palmero, I., Peters, G. und 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.

Sixbey, J.W., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Hanes, R.A. und Pagano, J.S. (1984). Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med*. **310**, 1225-1230.

Sixbey, J.W., Lemon, S.M. und Pagano, J.S. (1986). A second site for Epstein-Barr virus shedding: The uterine cervix. *The Lancet*. **2**, 1122-1124.

Smibert, C.A., Popova, B., Xiao, P., Capone, J.P. und Smiley, J.R. (1994). Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. *J Virol*. **68**, 2339-

2346.

Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988). *Gene*. **67**, 31

Stephens, E.B. und Compans, R.W. (1988). Assembly of animal viruses at cellular membranes. *Annu Rev Microbiol*. **42**, 489-516.

Szilagyi, F.F. und Cunningham, C. (1991). Identification and characterization of a novel non-infectious herpes simplex virus-related particle. *J Gen Virol*. **72**, 661-668.

Talbot, P. und Almeida, J.D. (1977). Human cytomegalovirus purification of enveloped virions and dense bodies. *J Gen. Virol*. **36**, 345-349.

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

Tao, Q., Srivastava, G., Chan, A.C., Chung, L.P., Loke, S.L. und 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. und Miller, G. (1989). Expression of the BZLF1 latency-disrupting gene differs in standard and defective Epstien-Barr viruses. *J Virol*, **63**, 1721-1728.

Thorley-Lawson, D.A., Miyashita, E.M. und Kahn, G. (1996). Epstein-Barr virus and the B-cell: That`s all it takes. *Trends Microbiol*. **4**, 204.

Tierney, R.J., Steven, N., Young, L.S. und Rickinson, A.B. (1994). Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol*. **68**, 7374-7385.

Tomkinson, B., Robertson, E. und 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.

Torrisi, M.R., Di Lazzaro, C., Pavan, A., Pereira, L. und Campadelli-Fiume, G. (1992). Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label. *J Virol*. **66**, 554-561.

Wang, D., Liebowitz, D. und Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*. **43**, 831-840.

Wang, F., Tsang, S.F., Kurilla, M.G., Cohen, J.I. und Kieff, E. (1990b). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J Virol*. **64**, 3407-3416.

Watry, D., Hedrick, J.A., Siervo, S., Rhodes, G., Lamberti, J.J., Lambris, J.D. und Tsoukas, C.D. (1991). Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J Exp Med*. **173**, 971-980.

Weinheimer, S.P., Boyd, B.A., Durham, S.K., Resnick, J.L. und O Boyle II, D.R. (1992). Deletion of the VP16 open reading frame of Herpes simplex virus type 1. *J Virol*. **66**, 258-269.

Whealy, E.M., Card, J.P., Meade, R.P., Robbins, A.K. und Enquist, L.W. (1991). Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress. *J Virol*. **65**, 1066-1081.

Whiteley, A., Bruun, B., Minson, T. und Browne, H. (1999). Effects of targeting herpes simplex virus type 1 gD to the endoplasmic reticulum and *trans*-Golgi network. *J Virol*. **73**, 9515-9520.

Whittaker, G.R. und Helenius, A. (1998). Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology*. **246**, 1-23.

Wildy, P. und Watson, D.H. (1963). Electron microscopic studies on the architecture of animal viruses. *Spring Harbour Symp Quant Biol*. **27**, 25-47.

Wolf, H., Haus, M. und Wilmes, E. (1984). Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *J Virol*. **51**, 795-798.

Woodcock, D. (1989).*Nucleic Acid Res*. **17**, 3469-3478.

Yao, Q.Y., Ogan, P., Rowe, M., Wood, M. und Rickinson, A.B. (1989). Epstein-Barr virus-infected B cells persist in the circulation of acyclovir-treated virus carriers. *Int J Cancer*. **43**, 67-17.

Yates, J., Warren, N., Reisman, D. und Sugden, B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **81**, 3806-3810.

Zalani, S. Holley Guthrie, E. und Kenney, S. (1996). Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1-protein through a cell-specific mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 9194-9199.

Zhu, Z., Gershon, M.D., Hao, Y., Ambron, R.T., Gabel, C.A. und Gershon, A.A. (1995). Envelopment of varicella-zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the *trans*-Golgi network. *J Virol*. **69**, 7951-7959.

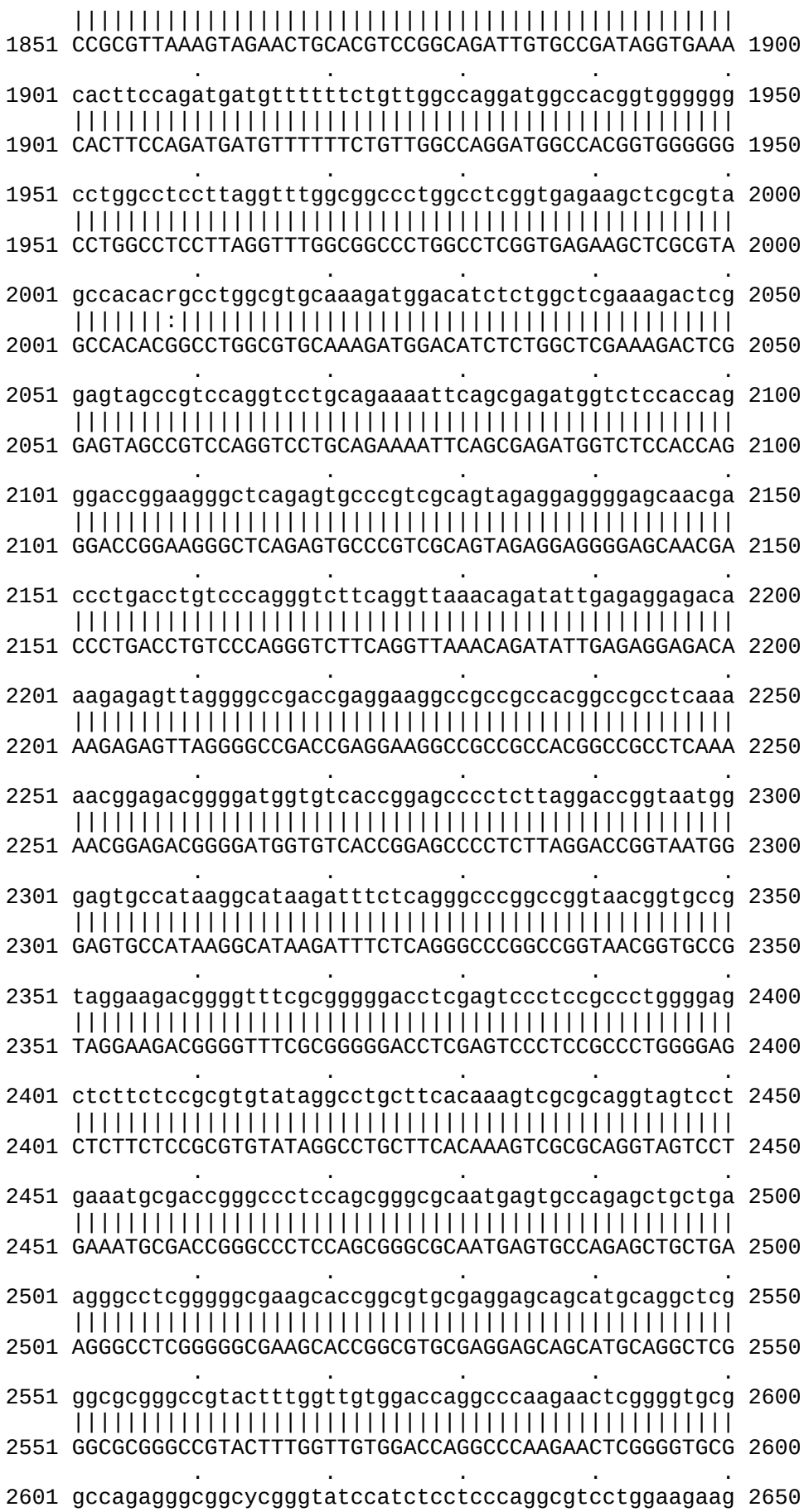
Anhang

A.1. Homologievergleich der BPLF1-Nukleinsäuresequenz aus den Virus-Stämmen M-ABA und B95-8

```
BESTFIT of: BPLF1-M-ABA  from: 1  to: 9540
to:         BPLF1-B95-8  from: 1  to: 9450


         Gap Weight:   50   Average Match: 10.000
         Length Weight: 3   Average Mismatch: -9.000

        Maximum penalized length: 1500

            Quality:  93826             Length:   9540
              Ratio:  9.929               Gaps:      2
 Percent Similarity: 99.831   Percent Identity: 99.534

        Match display thresholds for the alignment(s):
                    | = IDENTITY
                    : =   5
                    . =   1



                .         .         .         .         .
M-ABA  1 ttacagatacaaaaacttgagtctctcgaggtctgcgatgaggcggtggg 50
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
B95-8  1 TTACAGATACAAAAACTTGAGTCTCTCGAGGTCTGCGATGAGGCGGTGGG 50
                .         .         .         .         .
      51 tggaacgctccagcttgcggcgaagctggctcacgaagcgagacagtact 100
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
      51 TGGAACGCTCCAGCTTGCGGCGAAGCTGGCTCACGAAGCGAGACAGTACT 100
                .         .         .         .         .
     101 cggctagcctgactaagggtgaggctataacgcaggtcctgttccggggc 150
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     101 CGGCTAGCCTGACTAAGGGTGAGGCTATAACGCAGGTCCTGTTCCGGGGC 150
                .         .         .         .         .
     151 rgcggtggatagagaggaggggatccggaggggaccactaggtcgccgg 200
         :||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     151 GGCGGTGGATAGAGAGGAGGGGGATCCGGAGGGGACCACTAGGTCGCCGG 200
                .         .         .         .         .
     201 aggtcgaccctcctgtcaccacctccctgataatgtcttcaatagacaga 250
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     201 AGGTCGACCCTCCTGTCACCACCTCCCTGATAATGTCTTCAATAGACAGA 250
                .         .         .         .         .
     251 aattgggtgaccactgagggagtgttccacagtaatgttgtctggtcgct 300
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     251 AATTGGGTGACCACTGAGGGAGTGTTCCACAGTAATGTTGTCTGGTCGCT 300
                .         .         .         .         .
     301 agatggcgcgggtgaggccacgctttgcgaaaacgaaagtgcttgaaaag 350
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     301 AGATGGCGCGGGTGAGGCCACGCTTTGCGAAAACGAAAGTGCTTGAAAAG 350
                .         .         .         .         .
     351 gcgcgggatagcgtgcgctaccggatggcgggtaatacatgctatcctta 400
```

```
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 351 GCGCGGGATAGCGTGCGCTACCGGATGGCGGGTAATACATGCTATCCTTA 400
               .         .         .         .         .
 401 cattttggcattttgggcagctgggaggcggcggatgggggtgcttcttt 450
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 401 CATTTTGGCATTTTGGGCAGCTGGGAGGCGGCGGATGGGGGTGCTTCTTT 450
               .         .         .         .         .
 451 tcgcacggtgtatgtttggggacccgcatgccggtactgggataggcgca 500
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 451 TCGCACGGTGTATGTTTGGGGACCCGCATGCCGGTACTGGGATAGGCGCA 500
               .         .         .         .         .
 501 cctcgggccgcgcgccaggctccgagccggaatgcattgggggcaatggg 550
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 501 CCTCGGGCCGCGCGCCAGGCTCCGAGCCGGAATGCATTGGGGGCAATGGG 550
               .         .         .         .         .
 551 attgcgggggattgttgctgtctgctcctgacagggagagacacgcgcgg 600
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 551 ATTGCGGGGGATTGTTGCTGTCTGCTCCTGACAGGGAGAGACACGCGCGG 600
               .         .         .         .         .
 601 cggagatgcagccgacggcggggccgcggtgggctgcccccgaggwcggg 650
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||
 601 CGGAGATGCAGCCGACGGCGGGGCCGCGGTGGGCTGCCCCCGAGGACGGG 650
               .         .         .         .         .
 651 cgccggccgccagcgcccccgtggcctttggcacgggcctggcacccacc 700
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 651 CGCCGGCCGCCAGCGCCCCCGTGGCCTTTGGCACGGGCCTGGCACCCACC 700
               .         .         .         .         .
 701 gctttaattgtgggggtgggcagggcagctgcatcttggggcctttgtgc 750
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 701 GCTTTAATTGTGGGGGTGGGCAGGGCAGCTGCATCTTGGGGCCTTTGTGC 750
               .         .         .         .         .
 751 ttgcgtttttgggggcgcggtgccaatgcaccaactggggtgtgcgccg 800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 751 TTGCGTTTTTTGGGGGCGCGGTGCCAATGCACCAACTGGGGTGTGCGCCG 800
               .         .         .         .         .
 801 gggcggccaagccggaccccagggcgggtgcctgggggatgggaaagccg 850
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 801 GGGCGGCCAAGCCGGACCCCAGGGCGGGTGCCTGGGGGATGGGAAAGCCG 850
               .         .         .         .         .
 851 gacggcgcttctcccgggtcgaacgctggagtagcggaggctgctgcgcc 900
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 851 GACGGCGCTTCTCCCGGGTCGAACGCTGGAGTAGCGGAGGCTGCTGCGCC 900
               .         .         .         .         .
 901 ggcggccaccacgggcgcacggggtcgcagcccgacggccgtggggaggc 950
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 901 GGCGGCCACCACGGGCGCACGGGGTCGCAGCCCGACGGCCGTGGGGAGGC 950
               .         .         .         .         .
 951 gggtggcggagggccgaatctccgcggcttcttcccggccccctgctgt 1000
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 951 GGGTGGCGGAGGGCCGAATCTCCGCGGCTTCTTCCCGGCCCCCCTGCTGT 1000
               .         .         .         .         .
1001 ttcttctcccgttgcatgatagaatggccatagggtgggtcctgagagga 1050
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1001 TTCTTCTCCCGTTGCATGATAGAATGGCCATAGGGTGGGTCCTGAGAGGA 1050
               .         .         .         .         .
1051 ggcttgtgtgtcctggggctggagcccaaaagtcgttaaagatgccgctg 1100
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1051 GGCTTGTGTGTCCTGGGGCTGGAGCCCAAAAGTCGTTAAAGATGCCGCTG 1100
               .         .         .         .         .
1101 atggtgtgggagctatgcctcccgtcgactggccgggcttgtaggggct 1150
```

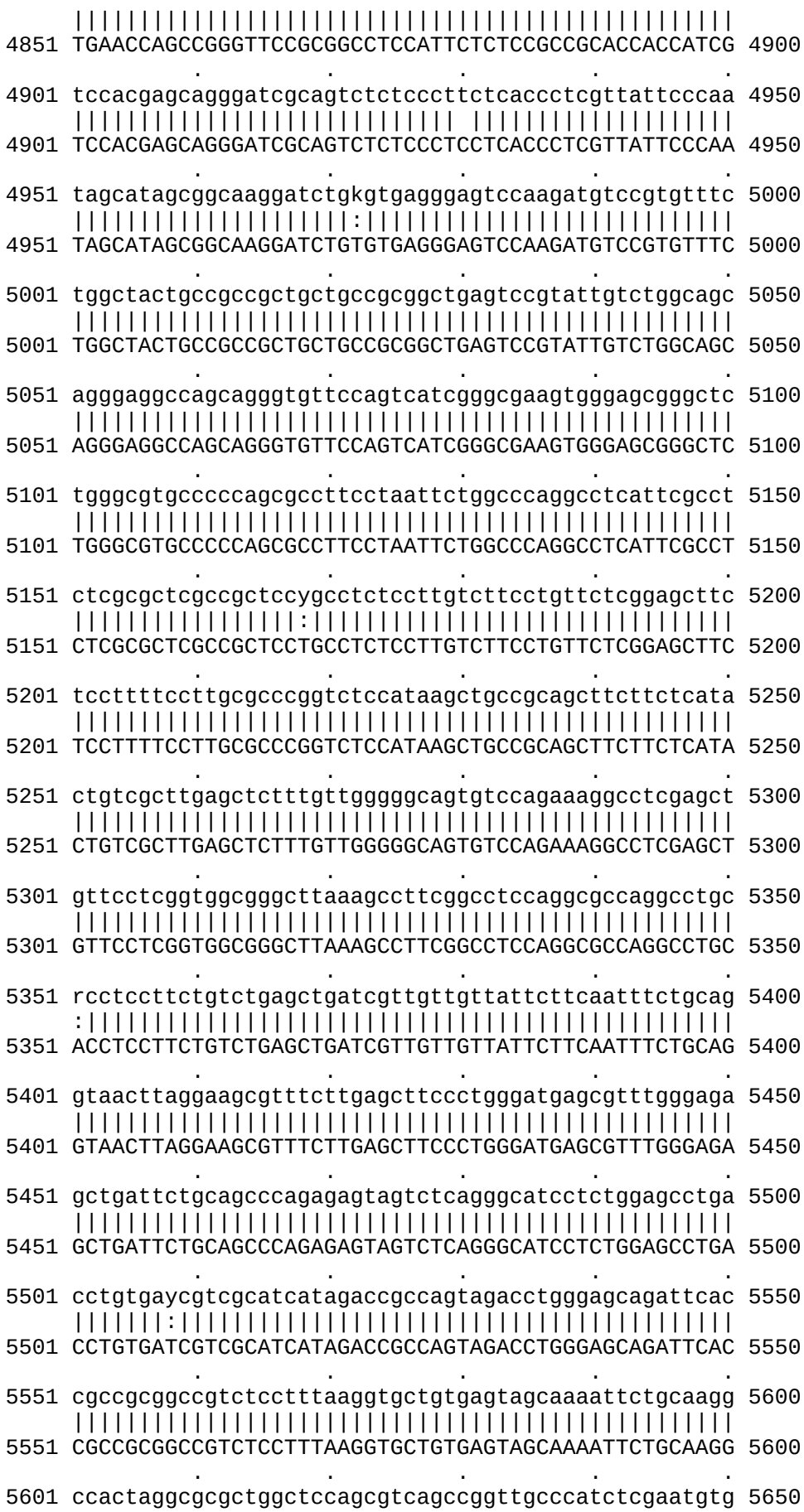
```
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1101 ATGGTGTGGGAGCTATGCCTCCCGTCGACTGGCCGGGCTTGTAGGGGGCT 1150
               .         .         .         .         .
1151 gagggtggataactgggcttctgtgaaggcaccaaccctggaatctggat 1200
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1151 GAGGGTGGATAACTGGGCTTCTGTGAAGGCACCAACCCTGGAATCTGGAT 1200
               .         .         .         .         .
1201 ggtatgtttcttctgtgaccccgaggcagtcgatggtgtagagtgtggag 1250
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1201 GGTATGTTTCTTCTGTGACCCCGAGGCAGTCGATGGTGTAGAGTGTGGAG 1250
               .         .         .         .         .
1251 acaatgtgtagacgatgggcccttgttcagaagcccagggacttgagggg 1300
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1251 ACAATGTGTAGACGATGGGCCCTTGTTCAGAAGCCCAGGGACTTGAGGGG 1300
               .         .         .         .         .
1301 ggctgttgtggtgctggttggggaaggagctccagggaatctttgggcca 1350
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1301 GGCTGTTGTGGTGCTGGTTGGGGAAGGAGCTCCAGGGAATCTTTGGGCCA 1350
               .         .         .         .         .
1351 tggccttggggagcttcccggagaccggtctgggctctcggaagccctcg 1400
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1351 TGGCCTTGGGGAGCTTCCCGGAGACCGGTCTGGGCTCTCGGAAGCCCTCG 1400
               .         .         .         .         .
1401 tttcggccccgaaatagggccttgccatcaatcgggggcctgggagagtg 1450
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1401 TTTCGGCCCCGAAATAGGGCCTTGCCATCAATCGGGGGCCTGGGAGAGTG 1450
               .         .         .         .         .
1451 atgggggcggccaatcccggggtaactgtcacgtcccgggggggaggaggt 1500
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1451 ATGGGGGCGGCCAATCCCGGGGTAACTGTCACGTCCCGGGGGGAGGAGGT 1500
               .         .         .         .         .
1501 aggagacagccagtccctgggcctgccaggggccaccttctctaagaggg 1550
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1501 AGGAGACAGCCAGTCCCTGGGCCTGCCAGGGGCCACCTTCTCTAAGAGGG 1550
               .         .         .         .         .
1551 ggctctgtgggctgggagggccagaggcctcagattcagcagtagtgctc 1600
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1551 GGCTCTGTGGGCTGGGAGGGCCAGAGGCCTCAGATTCAGCAGTAGTGCTC 1600
               .         .         .         .         .
1601 ccctttcccccctggtccgtctcccctcctcccaactgctggagccggtc 1650
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1601 CCCTTTTCCCCCTGGTCCGTCTCCCCTCCTCCCAACTGCTGGAGCCGGTC 1650
               .         .         .         .         .
1651 ggaggaggccggggtgttatctgctgactgaaacccgtccccgctgacca 1700
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1651 GGAGGAGGCCGGGGTGTTATCTGCTGACTGAAACCCGTCCCCGCTGACCA 1700
               .         .         .         .         .
1701 gtccgtgccccacccttgggggggaaaccggagaacagctcctggacgttg 1750
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1701 GTCCGTGCCCCACCCTTGGGGGGAAACCGGAGAACAGCTCCTGGACGTTG 1750
               .         .         .         .         .
1751 cgtggattcgggggaagctggtatccaaccggcagtggaggatcttcgtg 1800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1751 CGTGGATTCGGGGGAAGCTGGTATCCAACCGGCAGTGGAGGATCTTCGTG 1800
               .         .         .         .         .
1801 ctcgtagaaggaggggttgagtacatcggtcggccatcgtgaggccccgg 1850
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1801 CTCGTAGAAGGAGGGGTTGAGTACATCGGTCGGCCATCGTGAGGCCCCGG 1850
               .         .         .         .         .
1851 ccgcgttaaagtagaactgcacgtccggcagattgtgccgataggtgaaa 1900
```


1851 CCGCGTTAAAGTAGAACTGCACGTCCGGCAGATTGTGCCGATAGGTGAAA 1900
1901 cacttccagatgatgtttttctgttggccaggatggccacggtgggggg 1950
1901 CACTTCCAGATGATGTTTTTTCTGTTGGCCAGGATGGCCACGGTGGGGGG 1950
1951 cctggcctccttaggtttggcggccctggcctcggtgagaagctcgcgta 2000
1951 CCTGGCCTCCTTAGGTTTGGCGGCCCTGGCCTCGGTGAGAAGCTCGCGTA 2000
2001 gccacacrgcctggcgtgcaaagatggacatctctggctcgaaagactcg 2050
2001 GCCACACGGCCTGGCGTGCAAAGATGGACATCTCTGGCTCGAAAGACTCG 2050
2051 gagtagccgtccaggtcctgcagaaaattcagcgagatggtctccaccag 2100
2051 GAGTAGCCGTCCAGGTCCTGCAGAAAATTCAGCGAGATGGTCTCCACCAG 2100
2101 ggaccggaagggctcagagtgcccgtcgcagtagaggaggggagcaacga 2150
2101 GGACCGGAAGGGCTCAGAGTGCCCGTCGCAGTAGAGGAGGGGAGCAACGA 2150
2151 ccctgacctgtcccagggtcttcaggttaaacagatattgagaggagaca 2200
2151 CCCTGACCTGTCCCAGGGTCTTCAGGTTAAACAGATATTGAGAGGAGACA 2200
2201 aagagagttaggggccgaccgaggaaggccgccgccacggccgcctcaaa 2250
2201 AAGAGAGTTAGGGGCCGACCGAGGAAGGCCGCCGCCACGGCCGCCTCAAA 2250
2251 aacggagacggggatggtgtcaccggagcccctcttaggaccggtaatgg 2300
2251 AACGGAGACGGGGATGGTGTCACCGGAGCCCCTCTTAGGACCGGTAATGG 2300
2301 gagtgccataaggcataagatttctcagggcccggccggtaacggtgccg 2350
2301 GAGTGCCATAAGGCATAAGATTTCTCAGGGCCCGGCCGGTAACGGTGCCG 2350
2351 taggaagacggggtttcgcgggggacctcgagtccctccgccctggggag 2400
2351 TAGGAAGACGGGGTTTCGCGGGGGACCTCGAGTCCCTCCGCCCTGGGGAG 2400
2401 ctcttctccgcgtgtataggcctgcttcacaaagtcgcgcaggtagtcct 2450
2401 CTCTTCTCCGCGTGTATAGGCCTGCTTCACAAAGTCGCGCAGGTAGTCCT 2450
2451 gaaatgcgaccgggccctccagcgggcgcaatgagtgccagagctgctga 2500
2451 GAAATGCGACCGGGCCCTCCAGCGGGCGCAATGAGTGCCAGAGCTGCTGA 2500
2501 agggcctcgggggcgaagcaccggcgtgcgaggagcagcatgcaggctcg 2550
2501 AGGGCCTCGGGGGCGAAGCACCGGCGTGCGAGGAGCAGCATGCAGGCTCG 2550
2551 ggcgcgggccgtactttggttgtggaccaggcccaagaactcggggtgcg 2600
2551 GGCGCGGGCCGTACTTTGGTTGTGGACCAGGCCCAAGAACTCGGGGTGCG 2600
2601 gccagagggcggcycgggtatccatctcctcccaggcgtcctggaagaag 2650

```
     |||||||||||||:||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2601 GCCAGAGGGCGGCTCGGGTATCCATCTCCTCCCAGGCGTCCTGGAAGAAG 2650
               .         .         .         .         .
2651 atgaagccggtgggtggaccggcgatgcggtggcgggtgaggcggcgcgc 2700
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2651 ATGAAGCCGGTGGGTGGACCGGCGATGCGGTGGCGGGTGAGGCGGCGCGC 2700
               .         .         .         .         .
2701 gtcttccccgtcgttgctgccgcgggtggttgagggcatgccccccctcc 2750
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2701 GTCTTCCCCGTCGTTGCTGCCGCGGGTGGTTGAGGGCATGCCCCCCCTCC 2750
               .         .         .         .         .
2751 cggaggctggactcctgaccagcctgtaggtgaggaccgagtccgacagg 2800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2751 CGGAGGCTGGACTCCTGACCAGCCTGTAGGTGAGGACCGAGTCCGACAGG 2800
               .         .         .         .         .
2801 aggtctcccaaacccccatctctcgctagagccgagaccaggccgagtcc 2850
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2801 AGGTCTCCCAAACCCCCATCTCTCGCTAGAGCCGAGACCAGGCCGAGTCC 2850
               .         .         .         .         .
2851 tgcgtagaacgatggggcgcccaggaaggcggcagcgtaggccggatgtg 2900
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2851 TGCGTAGAACGATGGGGCGCCCAGGAAGGCGGCAGCGTAGGCCGGATGTG 2900
               .         .         .         .         .
2901 tgccgaccagcagcgccatcatctcccgttgttccaatagaataacttcc 2950
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2901 TGCCGACCAGCAGCGCCATCATCTCCCGTTGTTCCAATAGAATAACTTCC 2950
               .         .         .         .         .
2951 cggtctgtggccggggctggataaggggggtgattcctagaggcgatgag 3000
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2951 CGGTCTGTGGCCGGGGCTGGATAAGGGGGGTGATTCCTAGAGGCGATGAG 3000
               .         .         .         .         .
3001 actggcgtgcgctaraagygtcatggccacaatkgggttgtctgccaggt 3050
     |||||||||||||:|||:|||||||||||||:||||||||||||||||||
3001 ACTGGCGTGCGCTAAAAGTGTCATGGCCACAATGGGGTTGTCTGCCAGGT 3050
               .         .         .         .         .
3051 cttccatcagggctttgggcgcagagacgtattcccgaagcagctccccg 3100
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3051 CTTCCATCAGGGCTTTGGGCGCAGAGACGTATTCCCGAAGCAGCTCCCCG 3100
               .         .         .         .         .
3101 gcgttggactccacgtcgggccaggtgtcccagtaggagtcggcggcggc 3150
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3101 GCGTTGGACTCCACGTCGGGCCAGGTGTCCCAGTAGGAGTCGGCGGCGGC 3150
               .         .         .         .         .
3151 ggcgctgaggcgggcggaagctacactggccagggttcttttcctcctct 3200
     |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
3151 GGCGCTGAGGCGGGCGGAAGCTACACTGGCCAGGGTTCTTCTCCTCCTCT 3200
               .         .         .         .         .
3201 cttggtcatcctgcgggggaccaatagcttgggggcgtccggctggggtc 3250
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3201 CTTGGTCATCCTGCGGGGGACCAATAGCTTGGGGGCGTCCGGCTGGGGTC 3250
               .         .         .         .         .
3251 agggaaaaggcctctgggttctccagcacggtgggcatgacatattccag 3300
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3251 AGGGAAAAGGCCTCTGGGTTCTCCAGCACGGTGGGCATGACATATTCCAG 3300
               .         .         .         .         .
3301 aaagttgtggtagacggggatgtagttgagcggctcctgggtgtctgcgg 3350
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3301 AAAGTTGTGGTAGACGGGGATGTAGTTGAGCGGCTCCTGGGTGTCTGCGG 3350
               .         .         .         .         .
3351 agacgtaggccgggttaaggggtcgcagggagactctgtttccagccag 3400
```

```
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3351 AGACGTAGGCCGGGTTAAGGGGGTCGCAGGGAGACTCTGTTTCCAGCCAG 3400
               .         .         .         .         .
3401 agggtgccggcgtatttcgccggccctgctgccgccagaaattgtgcccg 3450
     |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
3401 AGGGTGCCGGCGTATTTCGCCGGCCCTGCCGCCGCCAGAAATTGTGCCCG 3450
               .         .         .         .         .
3451 ccgggtcggggctccattgccccatccagttggtggggccgaaatcgtga 3500
     |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
3451 CCGGGTCGGGGCTCCATTGCCCCATCCAGTTGGTGGTGCCGAAATCGTGA 3500
               .         .         .         .         .
3501 tgaggaggggcaggttgttggtcaagggatgcttaacgaaaacggtaggc 3550
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3501 TGAGGAGGGGCAGGTTGTTGGTCAAGGGATGCTTAACGAAAACGGTAGGC 3550
               .         .         .         .         .
3551 tgggcggtctcgtaaaaagccaggaaactctgcttggccgaggcatagcg 3600
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3551 TGGGCGGTCTCGTAAAAAGCCAGGAAACTCTGCTTGGCCGAGGCATAGCG 3600
               .         .         .         .         .
3601 cagcagcttgtccttgaggagggcatactgggagccagccgaggccccaa 3650
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3601 CAGCAGCTTGTCCTTGAGGAGGGCATACTGGGAGCCAGCCGAGGCCCCAA 3650
               .         .         .         .         .
3651 gcgccaggcccctggcagcctccaccacgatcttgagctggcgcgggtcg 3700
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3651 GCGCCAGGCCCCTGGCAGCCTCCACCACGATCTTGAGCTGGCGCGGGTCG 3700
               .         .         .         .         .
3701 gtgtggcccctggcctgggtgaccaggtcctgcagcattccctgcagctg 3750
     |||||||||||||||||||||||||| ||||||||| ||||||||||||||
3701 GTGTGGCCCCTGGCCTGGGTGACCAGATCCTGCAGCGTTCCCTGCAGCTG 3750
               .         .         .         .         .
3751 ggactcttcctgggcctcctggatgatggcctccagtcgggagaggcgcc 3800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3751 GGACTCTTCCTGGGCCTCCTGGATGATGGCCTCCAGTCGGGAGAGGCGCC 3800
               .         .         .         .         .
3801 ttttccagtctgcgamggtctccttgccccccgcgacccgcttggggtcc 3850
     ||||||||||||||:||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3801 TTTTCCAGTCTGCGACGGTCTCCTTGCCCCCCGCGACCCGCTTGGGGTCC 3850
               .         .         .         .         .
3851 aacgtggccagagccaacctcagctcctccatgccatccatggarttctg 3900
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||
3851 AACGTGGCCAGAGCCAACCTCAGCTCCTCCATGCCATCCATGGAGTTCTG 3900
               .         .         .         .         .
3901 ggccatgccctcgacttccaggagccgtgttaggtcatgaatttcaccgt 3950
     |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
3901 GGCCATGCCCTCGACTTCCAGGAGCCGTGTTAGCTCATGAATTTCACCGT 3950
               .         .         .         .         .
3951 cagccgcagcggctaggttcagccaggcacccacacccccagctaaggcc 4000
     |||||||||||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||||||
3951 CAGCCGCAGCGGCTAGGTTCAGCCAGGCACCCGCGCCCCCAGCTAAGGCC 4000
               .         .         .         .         .
4001 agggctccttcggaaagaccccgcacggcctcgcagatgccccggatcca 4050
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4001 AGGGCTCCTTCGGAAAGACCCCGCACGGCCTCGCAGATGCCCCGGATCCA 4050
               .         .         .         .         .
4051 cttggcggctgccagggatttccggtagggccacgagccgttcccagccg 4100
     |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||| ||||
4051 CTTGGCGGCTGCCAGGGATTTCCGGTAGGGCCATGAGCCGTTCCCGGCCG 4100
               .         .         .         .         .
4101 ctgcccgggccagggcggcctcgaggggagcctggacaggggctttggat 4150
```

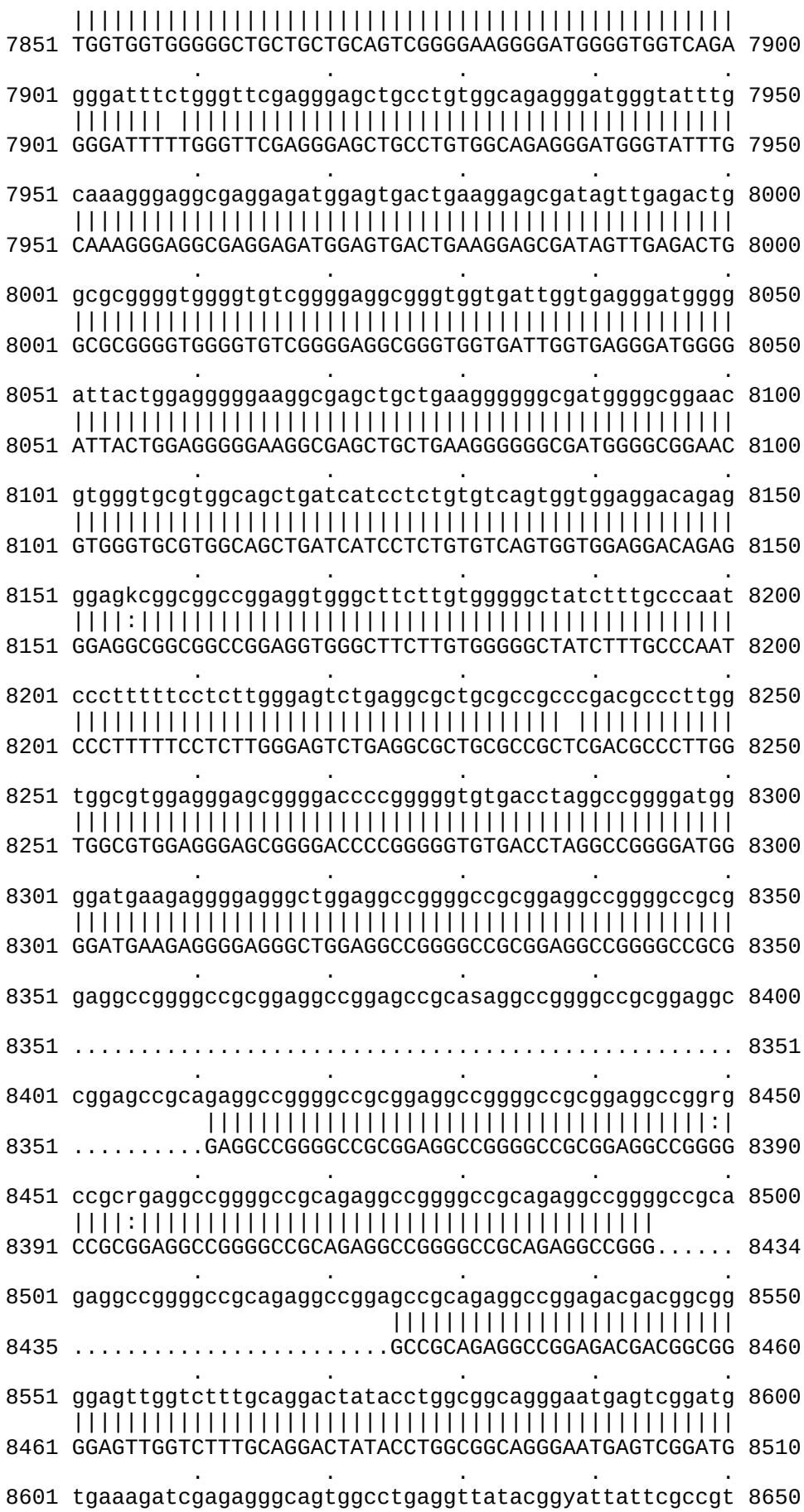
```
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4101 CTGCCCGGGCCAGGGCGGCCTCGAGGGGAGCCTGGACAGGGGCTTTGGGC 4150
                .         .         .         .         .
4151 ggggagggragcaggctccggagttcatcgtcgggggcttcgtcgcgtga 4200
     ||||||||:||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4151 GGGGAGGGAAGCAGGCTCCGGAGTTCATCGTCGGGGGCTTCGTCGCGTGA 4200
                .         .         .         .         .
4201 cctggagaggacggcctccagagccgtgtgaaagccccgccgagtgcttg 4250
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4201 CCTGGAGAGGACGGCCTCCAGAGCCGTGTGAAAGCCCCGCCGAGTGCTTG 4250
                .         .         .         .         .
4251 ccgccatctcgtgggccttcgccatcagggtctggctctcccggacctgc 4300
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4251 CCGCCATCTCGTGGGCCTTCGCCATCAGGGTCTGGCTCTCCCGGACCTGC 4300
                .         .         .         .         .
4301 tcttccagcgcccggacctcggccgcctcggcctcggtcagcagctccga 4350
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4301 TCTTCCAGCGCCCGGACCTCGGCCGCCTCGGCCTCGGTCAGCAGCTCCGA 4350
                .         .         .         .         .
4351 gaagaagtcccccgtggcctggaggagatcgtcccgctctcgccttgtca 4400
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4351 GAAGAAGTCCCCCGTGGCCTGGAGGAGATCGTCCCGCTCTCGCCTTGTCA 4400
                .         .         .         .         .
4401 gcagctggggcttcttaggccagagcgccgagtccgaggccagcctgggc 4450
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4401 GCAGCTGGGGCTTCTTAGGCCAGAGCGCCGAGTCCGAGGCCAGCCTGGGC 4450
                .         .         .         .         .
4451 ggggcggttgcctgggggatagttggaggaggaggcaggttagcctggcc 4500
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4451 GGGGCGGTTGCCTGGGGGATAGTTGGAGGAGGAGGCAGGTTAGCCTGGCC 4500
                .         .         .         .         .
4501 tgggtcattagtggcttcgggtagcgtccgatccacgtactcgctcacga 4550
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4501 TGGGTCATTAGTGGCTTCGGGTAGCGTCCGATCCACGTACTCGCTCACGA 4550
                .         .         .         .         .
4551 tggccgtcagggcagcctcggctgctcgtctttttccagaagcccggcc 4600
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4551 TGGCCGTCAGGGCAGCCTCGGCTGCTCGTCTTTTTTCCAGAAGCCCGGCC 4600
                .         .         .         .         .
4601 agcccccgctcgtactccgcgtaggggcctccagatccgtgttgaccac 4650
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4601 AGCCCCCGCTCGTACTCCGCGTAGGGGGCCTCCAGATCCGTGTTGACCAC 4650
                .         .         .         .         .
4651 cgctgatttcatgtccggggactgcagggcctggcgcgtctgcgcgaggg 4700
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4651 CGCTGATTTCATGTCCGGGGACTGCAGGGCCTGGCGCGTCTGCGCGAGGG 4700
                .         .         .         .         .
4701 ccgaacggatggcatcggccgccgtcctggcgcgaaagagggccccggcc 4750
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4701 CCGAACGGATGGCATCGGCCGCCGTCCTGGCGCGAAAGAGGGCCCCGGCC 4750
                .         .         .         .         .
4751 gcttcctccgctcctcgccctcctcctccttctttggcggtagccgcggg 4800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4751 GCTTCCTCCGCTCCTCGCCCTCCTCCTCCTTCTTTGGCGGTAGCCGCGGG 4800
                .         .         .         .         .
4801 ggtggcgggccaagcgtccagtctggccagagggccggtctcgatatccg 4850
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
4801 GGTGGCGGGCCAAGCGTCCAGTCTGGCCAGAGGGCCGGTCTCGATATCCG 4850
                .         .         .         .         .
4851 tgaaccagccgggttccgcggcctccattctctccgccgcaccaccatcg 4900
```


4851 TGAACCAGCCGGGTTCCGCGGCCTCCATTCTCTCCGCCGCACCACCATCG 4900
4901 tccacgagcagggatcgcagtctctcccttctcaccctcgttattcccaa 4950
4901 TCCACGAGCAGGGATCGCAGTCTCTCCCTCCTCACCCTCGTTATTCCCAA 4950
4951 tagcatagcggcaaggatctgkgtgagggagtccaagatgtccgtgtttc 5000
4951 TAGCATAGCGGCAAGGATCTGTGTGAGGGAGTCCAAGATGTCCGTGTTTC 5000
5001 tggctactgccgccgctgctgccgcggctgagtccgtattgtctggcagc 5050
5001 TGGCTACTGCCGCCGCTGCTGCCGCGGCTGAGTCCGTATTGTCTGGCAGC 5050
5051 agggaggccagcagggtgttccagtcatcgggcgaagtgggagcgggctc 5100
5051 AGGGAGGCCAGCAGGGTGTTCCAGTCATCGGGCGAAGTGGGAGCGGGCTC 5100
5101 tgggcgtgcccccagcgccttcctaattctggcccaggcctcattcgcct 5150
5101 TGGGCGTGCCCCCAGCGCCTTCCTAATTCTGGCCCAGGCCTCATTCGCCT 5150
5151 ctcgcgctcgccgctccygcctctccttgtcttcctgttctcggagcttc 5200
5151 CTCGCGCTCGCCGCTCCTGCCTCTCCTTGTCTTCCTGTTCTCGGAGCTTC 5200
5201 tccttttccttgcgcccggtctccataagctgccgcagcttcttctcata 5250
5201 TCCTTTTCCTTGCGCCCGGTCTCCATAAGCTGCCGCAGCTTCTTCTCATA 5250
5251 ctgtcgcttgagctctttgttgggggcagtgtccagaaaggcctcgagct 5300
5251 CTGTCGCTTGAGCTCTTTGTTGGGGGCAGTGTCCAGAAAGGCCTCGAGCT 5300
5301 gttcctcggtggcgggcttaaagccttcggcctccaggcgccaggcctgc 5350
5301 GTTCCTCGGTGGCGGGCTTAAAGCCTTCGGCCTCCAGGCGCCAGGCCTGC 5350
5351 rcctccttctgtctgagctgatcgttgttgttattcttcaatttctgcag 5400
5351 ACCTCCTTCTGTCTGAGCTGATCGTTGTTGTTATTCTTCAATTTCTGCAG 5400
5401 gtaacttaggaagcgtttcttgagcttccctgggatgagcgtttgggaga 5450
5401 GTAACTTAGGAAGCGTTTCTTGAGCTTCCCTGGGATGAGCGTTTGGGAGA 5450
5451 gctgattctgcagcccagagagtagtctcagggcatcctctggagcctga 5500
5451 GCTGATTCTGCAGCCCAGAGAGTAGTCTCAGGGCATCCTCTGGAGCCTGA 5500
5501 cctgtgaycgtcgcatcatagaccgccagtagacctgggagcagattcac 5550
5501 CCTGTGATCGTCGCATCATAGACCGCCAGTAGACCTGGGAGCAGATTCAC 5550
5551 cgccgcggccgtctcctttaaggtgctgtgagtagcaaaattctgcaagg 5600
5551 CGCCGCGGCCGTCTCCTTTAAGGTGCTGTGAGTAGCAAAATTCTGCAAGG 5600
5601 ccactaggcgcgctggctccagcgtcagccggttgcccatctcgaatgtg 5650

```
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
5601 CCACTAGGCGCGCTGGCTCCAGCGTCAGCCGGTTGCCCATCTCGAATGTG 5650
               .         .         .         .         .
5651 tgcagggcctctgagaccatggggtccaggatgcggtcaatgccatcctg 5700
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
5651 TGCAGGGCCTCTGAGACCATGGGGTCCAGGATGCGGTCAATGCCATCCTG 5700
               .         .         .         .         .
5701 cacctcagggtcaaggaccggcaagtcacgatagaggtggtctatgctct 5750
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
5701 CACCTCAGGGTCAAGGACCGGCAAGTCACGATAGAGGTGGTCTATGCTCT 5750
               .         .         .         .         .
5751 cctcgaaggaggcaatgtagttatcgatggtgtagaaggtgatggatttc 5800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
5751 CCTCGAAGGAGGCAATGTAGTTATCGATGGTGTAGAAGGTGATGGATTTC 5800
               .         .         .         .         .
5801 aggatgttcatcaggtacttttggagcgaacmatctgctgtatagkgtc 5850
     ||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||||||||||:|||
5801 AGGATGTTCATCAGGTACTTTTTGGAGCGAACAATCTGCTGTATAGTGTC 5850
               .         .         .         .         .
5851 acgtaggcggatgtacgtggggttctttgcggccccgactatcgaccctg 5900
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
5851 ACGTAGGCGGATGTACGTGGGGTTCTTTGCGGCCCCGACTATCGACCCTG 5900
               .         .         .         .         .
5901 catttgcgatgtacttttctatgacggggatggtgagggccgcggtgtcg 5950
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
5901 CATTTGCGATGTACTTTTCTATGACGGGGATGGTGAGGGCCGCGGTGTCG 5950
               .         .         .         .         .
5951 gccagcggtggcgtggcttcggggttgtcgyggttggcgggtgtcgcaga 6000
     ||||||||||||||||||||||||||||||:||||||||||||||||||||
5951 GCCAGCGGTGGCGTGGCTTCGGGGTTGTCGTGGTTGGCGGGTGTCGCAGA 6000
               .         .         .         .         .
6001 gggagaggcgggagagatgggggcgcctggggccgaggccacaccggcca 6050
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6001 GGGAGAGGCGGGAGAGATGGGGGCGCCTGGGGCCGAGGCCACACCGGCCA 6050
               .         .         .         .         .
6051 ggcccaacattgcctcgatgtcgtccaggatggtgcggaggcgctttcg 6100
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6051 GGCCCAACATTGCCTCGATGTCGTCCAGGATGGTGCGGAGGCGCTTTTCG 6100
               .         .         .         .         .
6101 ttttctctggtggtctcgagctccttctgtttttcgygactgtctcaaa 6150
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||||||||||
6101 TTTTCTCTGGTGGTCTCGAGCTCCTTCTGTTTTTTCGCGACTGTCTCAAA 6150
               .         .         .         .         .
6151 ctctggaaggggggcaatgctggggtcgtcctcctcaactcgctccaggg 6200
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6151 CTCTGGAAGGGGGGCAATGCTGGGGTCGTCCTCCTCAACTCGCTCCAGGG 6200
               .         .         .         .         .
6201 gccaggggataccgctcatatcactaagggcggtgcccaggtagaggagc 6250
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6201 GCCAGGGGATACCGCTCATATCACTAAGGGCGGTGCCCAGGTAGAGGAGC 6250
               .         .         .         .         .
6251 tcgcgatagtcccattcaatggacgtgtaccggatgtttaggagaggcag 6300
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6251 TCGCGATAGTCCCATTCAATGGACGTGTACCGGATGTTTAGGAGAGGCAG 6300
               .         .         .         .         .
6301 ggaggcgatgatctggcatgtgtgccgcaggtgtgtcaggaggtcgtcaa 6350
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6301 GGAGGCGATGATCTGGCATGTGTGCCGCAGGTGTGTCAGGAGGTCGTCAA 6350
               .         .         .         .         .
6351 aatccatcactgttgggaggyttgggtcctcaaggtaggagagataatcg 6400
```

```
     ||||||||||||||||||||:||||||||||||||||||||||||||||||||
6351 AATCCATCACTGTTGGGAGGCTTGGGTCCTCAAGGTAGGAGAGATAATCG 6400
               .         .         .         .         .
6401 gaggccgccgaggccaccttgtccctgatgtccgccgtacacctgcgcac 6450
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6401 GAGGCCGCCGAGGCCACCTTGTCCCTGATGTCCGCCGTACACCTGCGCAC 6450
               .         .         .         .         .
6451 gtgcagggccgcattcttggaccggacggccacgttgtggacaaaggggg 6500
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6451 GTGCAGGGCCGCATTCTTGGACCGGACGGCCACGTTGTGGACAAAGGGGG 6500
               .         .         .         .         .
6501 gcactgaggcggcgggaggggccccatactctatcgctgtcaacagcgcc 6550
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6501 GCACTGAGGCGGCGGGAGGGGCCCCATACTCTATCGCTGTCAACAGCGCC 6550
               .         .         .         .         .
6551 aaaaagcggacgtcctcctcatctaccccagcctgttgtctggccacggc 6600
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6551 AAAAAGCGGACGTCCTCCTCATCTACCCCAGCCTGTTGTCTGGCCACGGC 6600
               .         .         .         .         .
6601 cgttcgggcggcctccgccagggataggaggcgcttccagctytcgtcgt 6650
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||||
6601 CGTTCGGGCGGCCTCCGCCAGGGATAGGAGGCGCTTCCAGCTTTCGTCGT 6650
               .         .         .         .         .
6651 ccagkaccaaggggacgtccacgtgcgggcccctgtagatggaattatcc 6700
     ||||:||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6651 CCAGGACCAAGGGGACGTCCACGTGCGGGCCCCTGTAGATGGAATTATCC 6700
               .         .         .         .         .
6701 tcgggttctcctcctccttcccccgcctcctgatctccgcccgagagcag 6750
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6701 TCGGGTTCTCCTCCTCCTTCCCCCGCCTCCTGATCTCCGCCCGAGAGCAG 6750
               .         .         .         .         .
6751 gtcggtcaggcgtctgcgggccgcctccaggycaaattttccatcgtcgc 6800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||||||||||||||||
6751 GTCGGTCAGGCGTCTGCGGGCCGCCTCCAGGTCAAATTTTCCATCGTCGC 6800
               .         .         .         .         .
6801 tctcggccagctggggaatttcagccagcatcttagcaccggcatctaca 6850
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6801 TCTCGGCCAGCTGGGGAATTTCAGCCAGCATCTTAGCACCGGCATCTACA 6850
               .         .         .         .         .
6851 cggaccgcgtccttcgtggccagggacggcaggcaggcctccagctttgc 6900
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6851 CGGACCGCGTCCTTCGTGGCCAGGGACGGCAGGCAGGCCTCCAGCTTTGC 6900
               .         .         .         .         .
6901 ggccaggtgcttatggaactctcccgctcttcccttgttttctgatagca 6950
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6901 GGCCAGGTGCTTATGGAACTCTCCCGCTCTTCCCTTGTTTTCTGATAGCA 6950
               .         .         .         .         .
6951 tgtttgcgaggttttggatgttaagttcggaagtgagcagttgctccagg 7000
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6951 TGTTTGCGAGGTTTTGGATGTTAAGTTCGGAAGTGAGCAGTTGCTCCAGG 7000
               .         .         .         .         .
7001 tccagcgtggggacctgcagatgtcccgaccagtcctttaagaattccag 7050
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7001 TCCAGCGTGGGGACCTGCAGATGTCCCGACCAGTCCTTTAAGAATTCCAG 7050
               .         .         .         .         .
7051 cagatttagcacagacgatcggtccctactccttattagcccctgctcga 7100
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7051 CAGATTTAGCACAGACGATCGGTCCCTACTCCTTATTAGCCCCTGCTCGA 7100
               .         .         .         .         .
7101 ggaccactgtcacaagaagatagtctatcatgctcaaggcatctgcctct 7150
```

```
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7101 GGACCACTGTCACAAGAAGATAGTCTATCATGCTCAAGGCATCTGCCTCT 7150
               .         .         .         .         .
7151 ggcacttcccggttagaggccgggtcgtagacgatggcctgttcctggta 7200
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7151 GGCACTTCCCGGTTAGAGGCCGGGTCGTAGACGATGGCCTGTTCCTGGTA 7200
               .         .         .         .         .
7201 ggtatgtccggctattctcgcaatgttgctctcgaggggcacaaagtcca 7250
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7201 GGTATGTCCGGCTATTCTCGCAATGTTGCTCTCGAGGGGCACAAAGTCCA 7250
               .         .         .         .         .
7251 tctcaggagtctctatgtcaaaggtggtctgatagtattggctcctggcg 7300
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7251 TCTCAGGAGTCTCTATGTCAAAGGTGGTCTGATAGTATTGGCTCCTGGCG 7300
               .         .         .         .         .
7301 gtgtccagtgtgatgggggacgtgggggcactggatcccgattccaggct 7350
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7301 GTGTCCAGTGTGATGGGGGACGTGGGGGCACTGGATCCCGATTCCAGGCT 7350
               .         .         .         .         .
7351 gttggagaacacttcatcttcgaacatgtcttcatcctctgtggtgggga 7400
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7351 GTTGGAGAACACTTCATCTTCGAACATGTCTTCATCCTCTGTGGTGGGGA 7400
               .         .         .         .         .
7401 tatcggaggctaagtcgctctccgcttcttcagagtcggacatggatagg 7450
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7401 TATCGGAGGCTAAGTCGCTCTCCGCTTCTTCAGAGTCGGACATGGATAGG 7450
               .         .         .         .         .
7451 aaaggctcctctaggycagacaggtagcggacgaggccagaaccccccaga 7500
     ||||||||||||||||:||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7451 AAAGGCTCCTCTAGGTCAGACAGGTAGCGGACGAGGCCAGAACCCCCAGA 7500
               .         .         .         .         .
7501 tgcatcatccccaaaggagggctgctgcccgaagggaggtgatggggata 7550
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7501 TGCATCATCCCCAAAGGAGGGCTGCTGCCCGAAGGGAGGTGATGGGGATA 7550
               .         .         .         .         .
7551 tctccgttccagccctgtcagcggccgggggatggtttttttctggttcg 7600
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7551 TCTCCGTTCCAGCCCTGTCAGCGGCCGGGGGATGGTTTTTTTCTGGTTCG 7600
               .         .         .         .         .
7601 agtgtcgtggctgatggtgggagctgctgagcaggaggaggagccggggt 7650
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7601 AGTGTCGTGGCTGATGGTGGGAGCTGCTGAGCAGGAGGAGGAGCCGGGGT 7650
               .         .         .         .         .
7651 agctgatggcaggggctgctgctgaggaggaagaggagaaggagcccggg 7700
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7651 AGCTGATGGCAGGGGCTGCTGCTGAGGAGGAAGAGGAGAAGGAGCCCGGG 7700
               .         .         .         .         .
7701 cggctgatggcgggggctgctgctgaggaagaagtggagaaggagccggg 7750
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7701 CGGCTGATGGCGGGGGCTGCTGCTGAGGAAGAAGTGGAGAAGGAGCCGGG 7750
               .         .         .         .         .
7751 gcggctgatggcgtgggctgctgctgaggaagaagtggagaaggagccgg 7800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7751 GCGGCTGATGGCGTGGGCTGCTGCTGAGGAAGAAGTGGAGAAGGAGCCGG 7800
               .         .         .         .         .
7801 ggcggctgattgcgggggctgctgctgagttggaggaggagaaagagtcg 7850
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7801 GGCGGCTGATTGCGGGGGCTGCTGCTGAGTTGGAGGAGGAGAAAGAGTCG 7850
               .         .         .         .         .
7851 tggtggtgggggctgctgctgcagtcggggaaggggatggggtggtcaga 7900
```


7851 TGGTGGTGGGGGCTGCTGCTGCAGTCGGGGAAGGGGATGGGGTGGTCAGA 7900
7901 gggatttctgggttcgagggagctgcctgtggcagagggatgggtatttg 7950
7901 GGGATTTTTGGGTTCGAGGGAGCTGCCTGTGGCAGAGGGATGGGTATTTG 7950
7951 caaagggaggcgaggagatggagtgactgaaggagcgatagttgagactg 8000
7951 CAAAGGGAGGCGAGGAGATGGAGTGACTGAAGGAGCGATAGTTGAGACTG 8000
8001 gcgcggggtggggtgtcggggaggcgggtggtgattggtgagggatgggg 8050
8001 GCGCGGGGTGGGGTGTCGGGGAGGCGGGTGGTGATTGGTGAGGGATGGGG 8050
8051 attactggaggggggaaggcgagctgctgaaggggggcgatggggcggaac 8100
8051 ATTACTGGAGGGGGAAGGCGAGCTGCTGAAGGGGGGCGATGGGGCGGAAC 8100
8101 gtgggtgcgtggcagctgatcatcctctgtgtcagtggtggaggacagag 8150
8101 GTGGGTGCGTGGCAGCTGATCATCCTCTGTGTCAGTGGTGGAGGACAGAG 8150
8151 ggagkcggcggccggaggtgggcttcttgtgggggctatctttgcccaat 8200
8151 GGAGGCGGCGGCCGGAGGTGGGCTTCTTGTGGGGGCTATCTTTGCCCAAT 8200
8201 ccctttttcctcttgggagtctgaggcgctgcgccgcccgacgcccttgg 8250
8201 CCCTTTTTCCTCTTGGGAGTCTGAGGCGCTGCGCCGCTCGACGCCCTTGG 8250
8251 tggcgtggagggagcggggaccccgggggtgtgacctaggccggggatgg 8300
8251 TGGCGTGGAGGGAGCGGGGACCCCGGGGGTGTGACCTAGGCCGGGGATGG 8300
8301 ggatgaagaggggagggctggaggccggggccgcggaggccggggccgcg 8350
8301 GGATGAAGAGGGGAGGGCTGGAGGCCGGGGCCGCGGAGGCCGGGGCCGCG 8350
8351 gaggccggggccgcggaggccggagccgcasaggccggggccgcggaggc 8400
8351 8351
8401 cggagccgcagaggccggggccgcggaggccggggccgcggaggccggrg 8450
8351 ..........GAGGCCGGGGCCGCGGAGGCCGGGGCCGCGGAGGCCGGGG 8390
8451 ccgcrgaggccggggccgcagaggccggggccgcagaggccggggccgca 8500
8391 CCGCGGAGGCCGGGGCCGCAGAGGCCGGGGCCGCAGAGGCCGGG...... 8434
8501 gaggccggggccgcagaggccggagccgcagaggccggagacgacggcgg 8550
8435 ........................GCCGCAGAGGCCGGAGACGACGGCGG 8460
8551 ggagttggtctttgcaggactatacctggcggcagggaatgagtcggatg 8600
8461 GGAGTTGGTCTTTGCAGGACTATACCTGGCGGCAGGGAATGAGTCGGATG 8510
8601 tgaaagatcgagagggcagtggcctgaggttatacggyattattcgccgt 8650

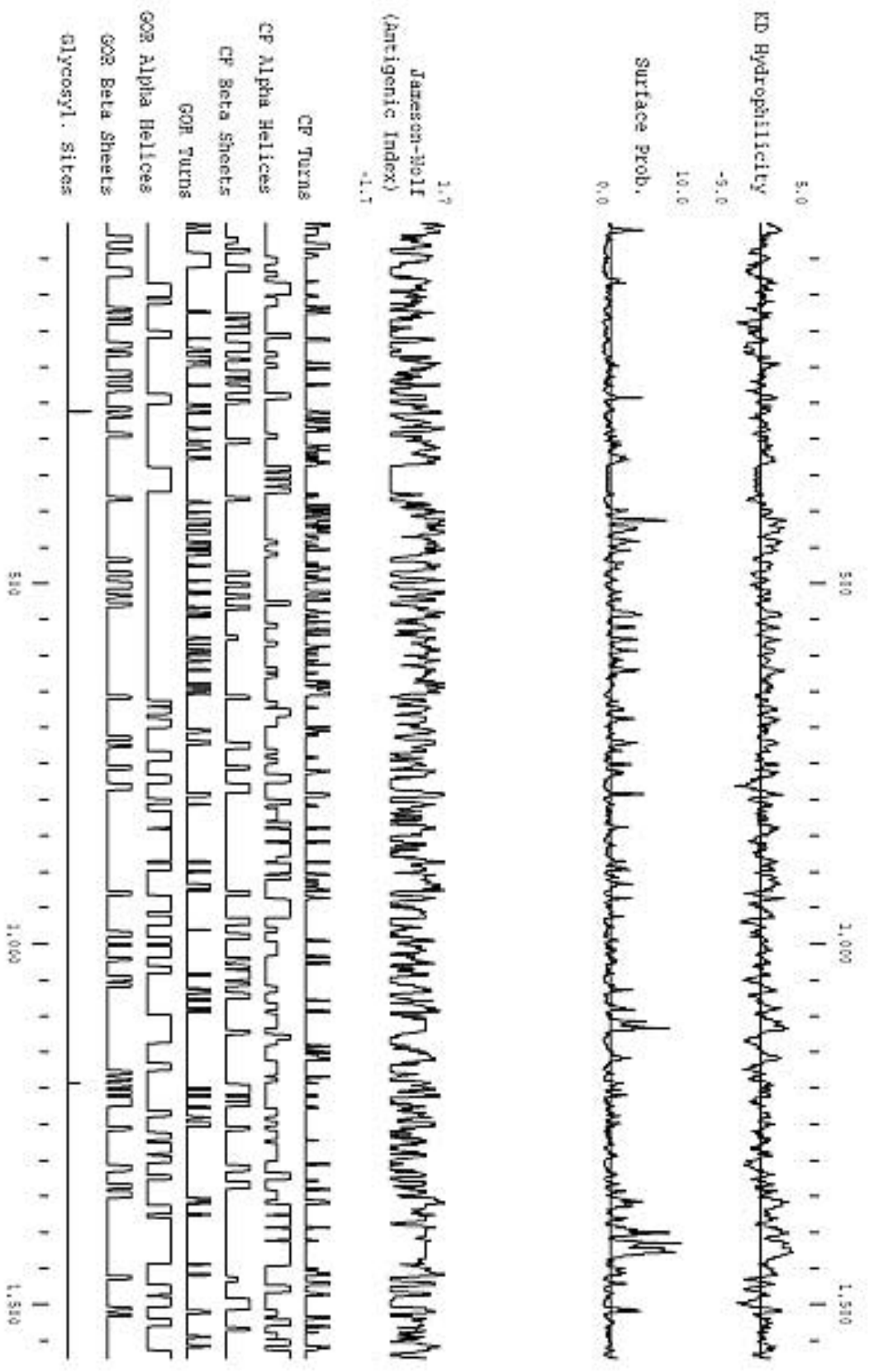
```
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||:||||||||||||
8511 TGAAAGATCGAGAGGGCAGTGGCCTGAGGTTATACGGTATTATTCGCCGT 8560
               .         .         .         .         .
8651 tcaaacggtagcatgacgggagggctgctatcagcaccgggcgtccccgc 8700
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
8561 TCAAACGGTAGCATGACGGGAGGGCTGCTATCAGCACCGGGCGTCCCCGC 8610
               .         .         .         .         .
8701 cgcctccccatcactggacacaagctcgggccccaccaggtcaaagccgc 8750
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
8611 CGCCTCCCCATCACTGGACACAAGCTCGGGCCCCACCAGGTCAAAGCCGC 8660
               .         .         .         .         .
8751 tgccgttggcctcataaaagtcatacacgccatagtgttccagcataaag 8800
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
8661 TGCCGTTGGCCTCATAAAAGTCATACACGCCATAGTGTTCCAGCATAAAG 8710
               .         .         .         .         .
8801 atgcgggggtcctctgtctcraaggcctcgggtagaaaatagagatgcac 8850
     ||||||||||||||||||||:||||||||||||||||||||||||||||||
8711 ATGCGGGGGTCCTCTGTCTCAAAGGCCTCGGGTAGAAAATAGAGATGCAC 8760
               .         .         .         .         .
8851 gcaagtgtactgggcccctggtgcccccacgtactgcaggatgtcgtgcg 8900
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
8761 GCAAGTGTACTGGGCCCCTGGTGCCCCCACGTACTGCAGGATGTCGTGCG 8810
               .         .         .         .         .
8901 cataggtgctgactctgacatgggcgggggtgcccggggccgcatccttc 8950
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
8811 CATAGGTGCTGACTCTGACATGGGCGGGGGTGCCCGGGGCCGCATCCTTC 8860
               .         .         .         .         .
8951 tggcagtgggggtcaaacaagtagaaggagccatctgtctcgatgatgat 9000
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
8861 TGGCAGTGGGGGTCAAACAAGTAGAAGGAGCCATCTGTCTCGATGATGAT 8910
               .         .         .         .         .
9001 ggcccccgtgtagatgtcgcagatgtagaggatgaactgggccaccccgt 9050
     ||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
8911 GGCCCCCGCGTAGATGTCGCAGATGTAGAGGATGAACTGGGCCACCCCGT 8960
               .         .         .         .         .
9051 tgtaactgccgtgcaggacctcggccagggactgaacaactgccgagttt 9100
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
8961 TGTAACTGCCGTGCAGGACCTCGGCCAGGGACTGAACAACTGCCGAGTTT 9010
               .         .         .         .         .
9101 gcgatctgggcagggaataggacgaggccaaagatctccgccgagcggta 9150
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
9011 GCGATCTGGGCAGGGAATAGGACGAGGCCAAAGATCTCCGCCGAGCGGTA 9060
               .         .         .         .         .
9151 tatgtgcacgcgcccaccgcccctcaggaccacggagctgggcacgtccg 9200
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
9061 TATGTGCACGCGCCCACCGCCCCTCAGGACCACGGAGCTGGGCACGTCCG 9110
               .         .         .         .         .
9201 tcaactgggccatctcgtgccccttgaggatgccgctctggcgcatgagg 9250
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
9111 TCAACTGGGCCATCTCGTGCCCCTTGAGGATGCCGCTCTGGCGCATGAGG 9160
               .         .         .         .         .
9251 gcatccagccgcgcccccctcgtccaggacctcgtccagctcagggcggga 9300
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
9161 GCATCCAGCCGCGCCCCCTCGTCCAGGACCTCGTCCAGCTCAGGGCGGGA 9210
               .         .         .         .         .
9301 ggtcagggggcggccggccaggaagctcttgaccaggtagaggacgcagt 9350
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
9211 GGTCAGGGGGCGGCCGGCCAGGAAGCTCTTGACCAGGTAGAGGACGCAGT 9260
               .         .         .         .         .
9351 tgctgacgcactggatgccggcaaagcggccaaacttgcagtgggcctgg 9400
```

```
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
9261 TGCTGACGCACTGGATGCCGGCAAAGCGGCCAAACTTGCAGTGGGCCTGG 9310
          .         .         .         .         .
9401 ttgcacgaggccgtgcctaggatgcggagggccgagcctccactcccgcc 9450
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
9311 TTGCACGAGGCCGTGCCTAGGATGCGGAGGGCCGAGCCTCCACTCCCGCC 9360
          .         .         .         .         .
9451 cccgggggcattcacatccatggtcctgattccgcgcacggggccggttc 9500
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
9361 CCCGGGGGCATTCACATCCATGGTCCTGATTCCGCGCACGGGGCCGGTTC 9410
          .         .         .         .
9501 cccgggtgcgctggctttgcccccagtcgccgttactcat 9540
     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
9411 CCCGGGTGCGCTGGCTTTGCCCCCAGTCGCCGTTACTCAT 9450
```

A.2. Nukleinsäuresequenz des BPLF1-cDNA-Abschnittes aus dem Virus-Stamm P3HR-1

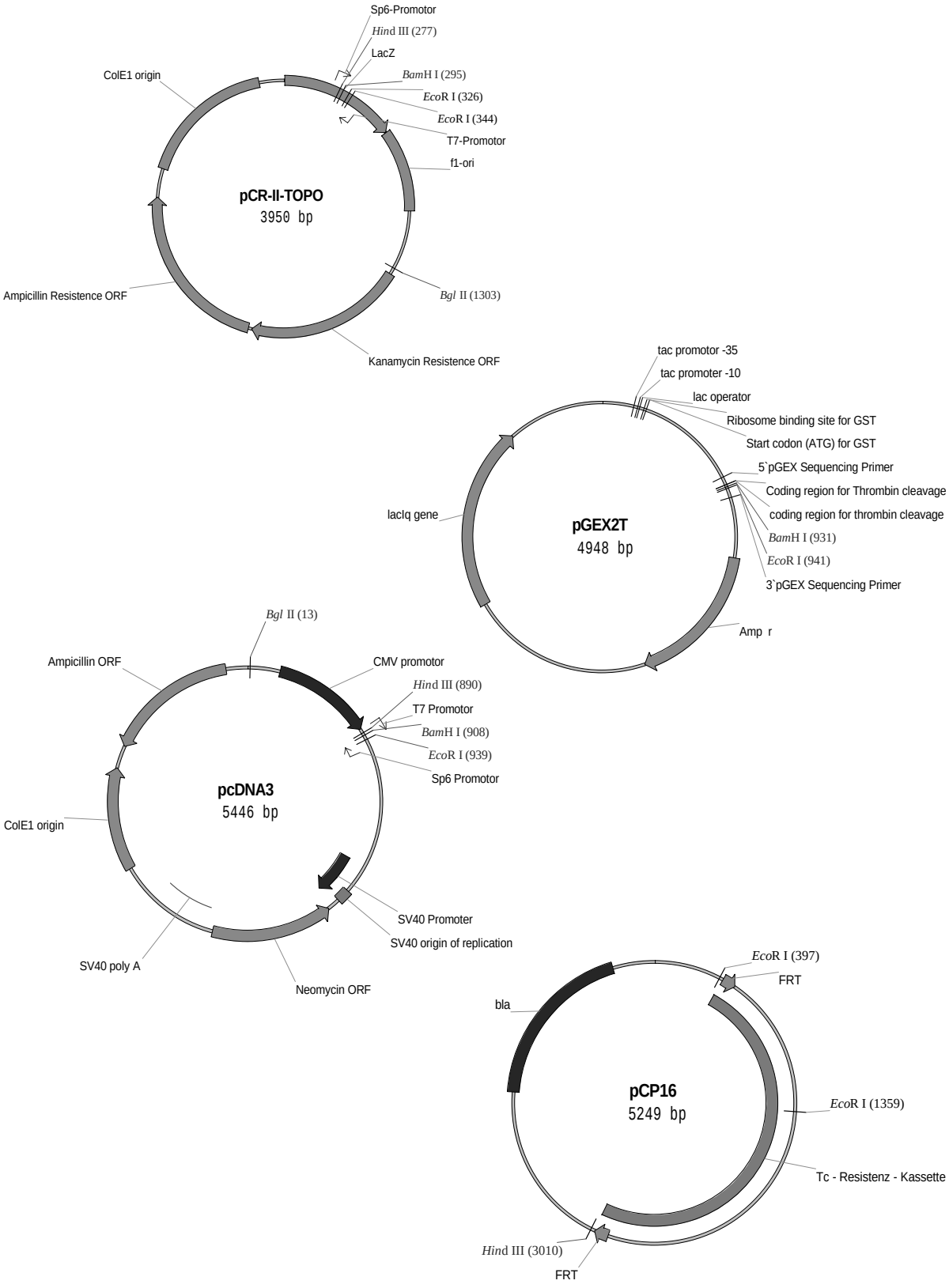
1 gtctttccga aggagccctg gccttagctg ggggtgtggg tgcctggctg aacctagccg
61 ctgcggctga cggtgaaatt catgagctaa cacggctcct ggaagtcgag ggcatggccc
121 agaactccat ggatggcatg gaggagctga ggttggctct ggccacgttg gaccccaagc
181 gggtcgcagg gggcaaggag accgtcgcag actggaaaag gcgcctctcc cgactggagg
241 ccatcatcca ggaggcccag gaagagtccc agctgcaggg aacgctgcag gatctggtca
301 cccaggccag gggccacacc gacccgcgcc agctcaagat cgtggtggag gctgccaggg
361 gcctggcgct tggggcctcg gctggctccc agtatgcact cctcaaggac aagctgctgc
421 gctatgcctc ggccaagcag agtttcctgg ctttttacga gaccgcccag cctaccgttt
481 tcgttaagca tcccttgacc aacaacctgc ccctcctcat cacgatttcg gcaccaccaa
541 ctggatgggg caatggagcc ccgacccggc gggcacaatt tctggcggcg gcagggccgg
601 cgaaatacgc cggcaccctc tggctggaaa cagagtctcc ctgcgacccc cttaacccgg
661 cctacgtctc cgcagacacc caggagccgc tcaactacat ccccgtctac cacaactttc
721 tggaatatgt catgcccacc gtgctggaga acccagaggc cttttccctg accccagccg
781 gacgccccca agctattggt cccccgcagg atgaccaaga gaggaggaga agaaccctgg
841 ccagtgtagc ttccgcccgc ctmagcgccg ccgccgccga ctcctactgg gacacctggc
901 ccgacgtgga gtccaacgcc ggggagctgc ttcgggaata cgtctttgcg cccaaagccc
961 tgatggaaga cctggcagac aaccccattg tggccatgac gcttttagcg cacgccagtc
1021 tcatcgcctc taggaatcac cccccttatc cagccccggc cacagaccgg gaagttattc
1081 tattggaaca acgggagatg atggcgctgc tggtcggcac acatccggcc tacgctgccg
1141 ccttcctggg cgccccatcg ttctacgcag gactcggcct ggtctcggct ctagcgagag
1201 atgggggttt gggagacctc ctgtcggact cggtcctcac ctacaggctg gtcaggaatc
1261 cagcctccgg gagggggggc atgccctcaa ccacccgcgg cagcaacgac ggggaagacg
1321 cgcgccgcct cacccgccac cgcatcgccg gtccacccac cggcttcatc ttcttccagg
1381 acgcctggga ggagatggat acccgggccg ccctctggcc gcaccccgag ttcttgggcc
1441 tggtccacaa ccaaagtacg gcccgcgccc gagcctgcat gctgctcctc gcacgccggt
1501 gcttcgcccc cgaggccctt cagcagctct gg

A.3. Sekundärstrukturen des BPLF1-Proteins

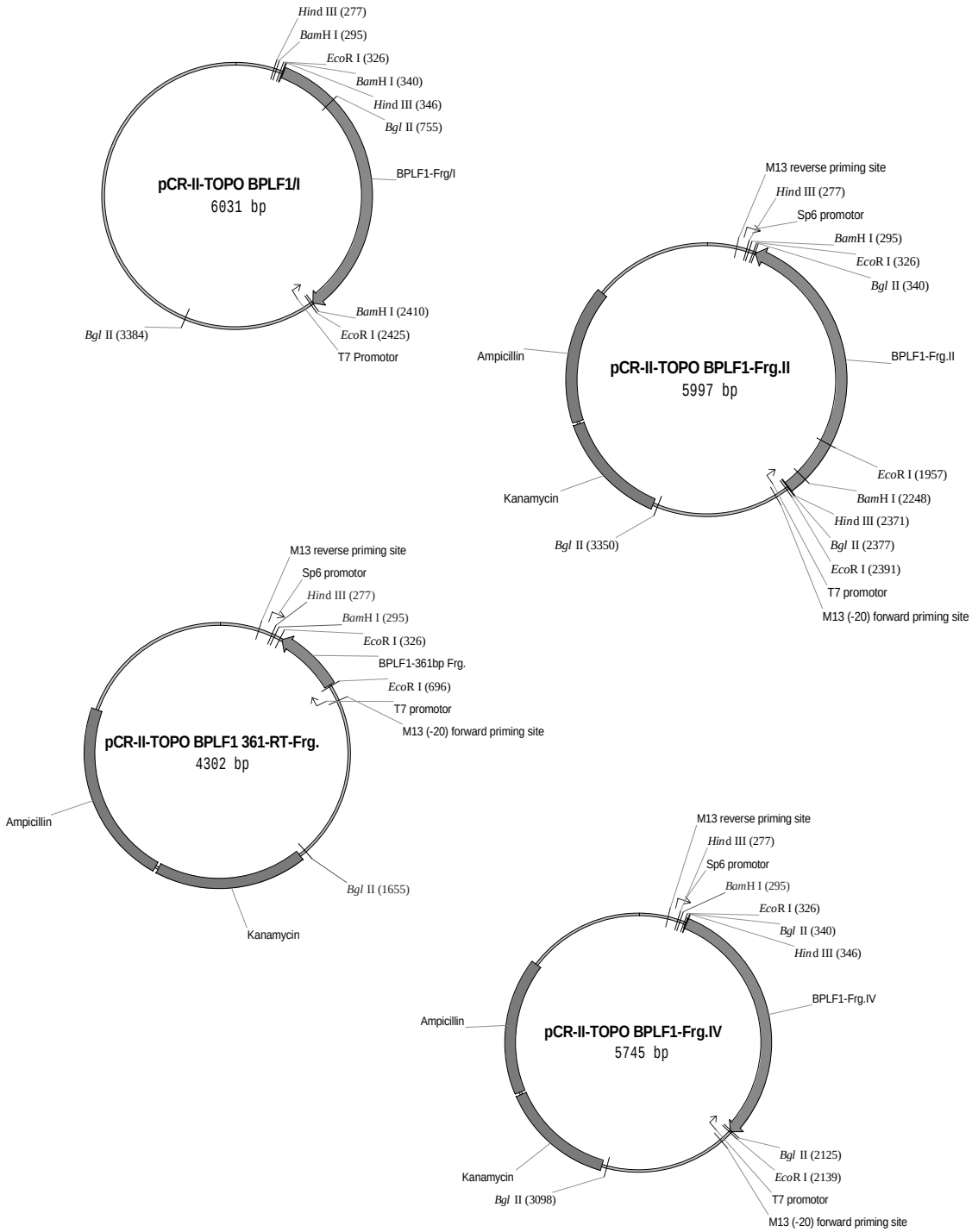


KD Hydrophilicity
5.0
-5.0
500
1,000
1,500
Surface Prob.
10.0
0.0
Jameson-Wolf
(Antigenic Index)
1.7
-1.7
CP Turns
CP Alpha Helices
CP Beta Sheets
GOR Turns
GOR Alpha Helices
GOR Beta Sheets
Glycosyl. Sites
500
1,000
1,500

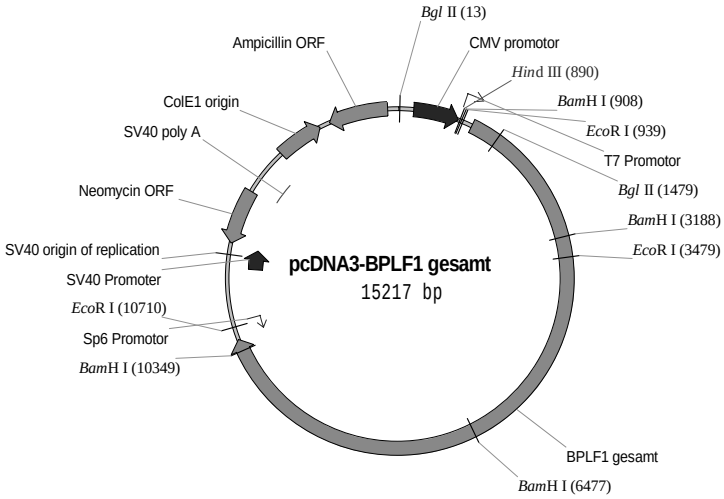
A.4. Ausgangsplasmide

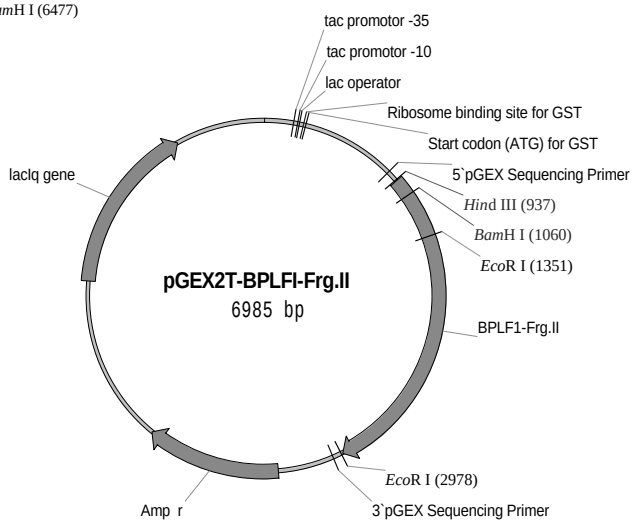


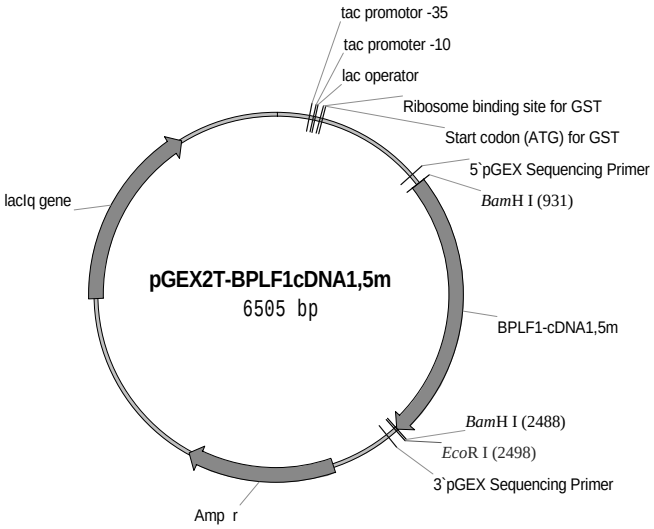
A.5. Plasmide zur Herstellung von *in vitro*-transkribierten RNA-Sonden



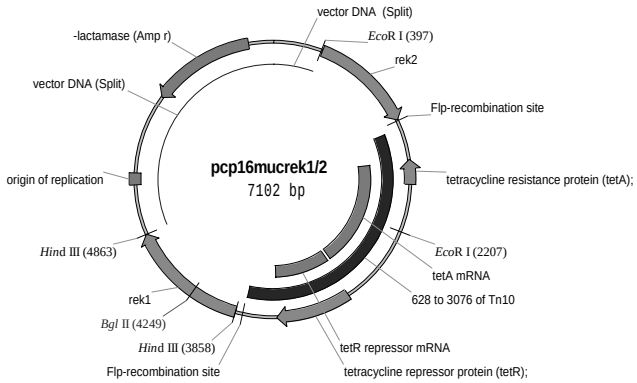
A.6. Expressionsplasmide

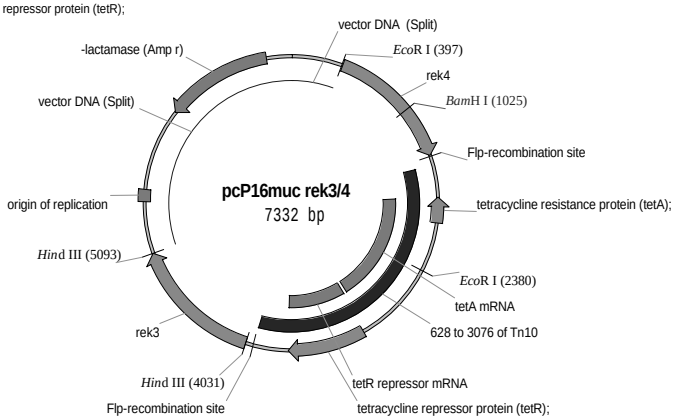


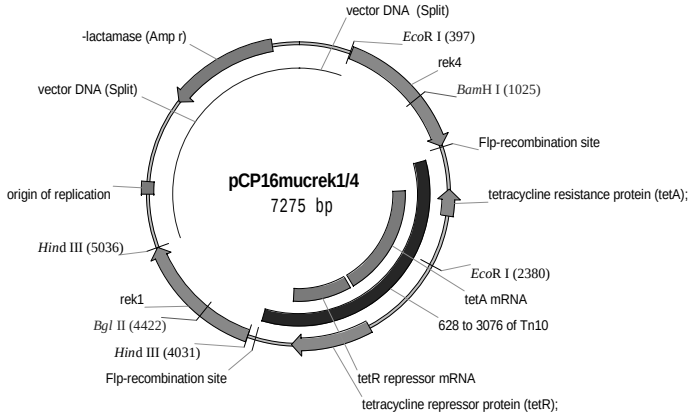




A.7. Plasmide für die homologe Rekombination zur Herstellung eines rekombinanten EBV







Lebenslauf

Susanne Schmaus

Diplom-Biologin
geboren am 07.01.1972 in Regensburg
ledig

Hochschulausbildung

10/1991 – 9/1992 **Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg**

10/1992 – 11/1997 Studium der Biologie an der Universität Regensburg
mit den Schwerpunkten Genetik und Medizinische Mikrobiologie,
Abschluß: Diplom-Biologin

Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung des BPLF1-Gens des Epstein-Barr-Virus

seit 01/1998 Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg von Prof. H. Wolf unter der Anleitung von PD. Dr. F. Schwarzmann
Abschluß voraussichtlich 02/2002

Thema: Das BPLF1-Gen des Epstein-Barr-Virus

Schulausbildung

1978 –1991 Grundschule in Mittenwald , St. Irmengard-Gymnasium in Garmisch-Partenkirchen,
Abschluß : Abitur

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolf für sein Interesse an dieser Arbeit und seine freundliche Unterstützung. Seinem fortwährenden Engagement hatte nicht nur ich ein ideales Forschungsumfeld zu verdanken.

Bei Herrn PD Dr. Charalampos Aslanidis möchte ich mich recht herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Herrn PD Dr. Fritz Schwarzmann danke ich für die Anleitung dieses Projekts und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen für die Zusammenarbeit und die Unterstützung bei gemeinsamen Arbeiten. Allen voran möchte ich mich bei Uschi König bedanken, die "Retterin in Not" bei jeder Gemüts- und Laborschieflage.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dobner, besonders bei Peter Groitl, bedanke ich mich für den regen Gedankenaustausch und viele nützliche Ratschläge.

Den Damen des Sekretariats möchte ich für Ihre Hilfsbereitschaft und ihr freundliches Entgegenkommen danken.

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

Allen hier nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen des Instituts sei für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima gedankt.