Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik

Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie

Leiterin: Frau Professor Dr. C. Müller

Nachweis von EBV-Transkripten in Lymphozyten und Monozyten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Lara Netzhammer, geb. Kovačić

aus

Freiburg im Breisgau

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Frau Professor Dr. C. Müller
2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. I. Kötter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 6

1.1 Rheumatoide Arthritis 6
1.1.1 Krankheitsbild der RA 6
1.1.2. Ätiologie und Pathomechanismen 8
1.1.3 Diagnostische Methoden zur Abklärung einer RA 9
1.2 HLA-Assoziation der Rheumatoiden Arthritis 12
1.3 Funktion und Fehlfunktion der T-Lymphozyten bei der RA 13
1.4 Rheumatoide Arthritis und EBV 15
1.4.1 Epstein-Barr-Virus 16
1.4.2 EBV Infektion der Wirtszelle und Pathogenese 17
1.4.3 Penetration und Uncoating von EBV 20
1.4.4 Latente Infektion 20
1.4.5 Lytische Phase 24
1.5 Fragestellung 25

2. Material und Methoden 26

2.1 Geräte 26
2.2 Reagenzien 27
2.3 Zelllinien 29
2.4 Kloniertes EBV DNA - Fragment 29
2.5 Patienten und Kontrollen 29
2.5.1 Studienteilnehmer der Patientengruppe 30
2.5.2 Bereits vorhandene Patientenproben, die für die Untersuchungen erneut verwendet wurden 30
2.5.3 Studienteilnehmer der Kontrollgruppe 31
2.6 Antikörper 33
2.7 Zellbiologische Methoden 33

2.7.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC).... 33
2.7.2 Bestimmung der Zahl und Vitalität der Zellen 35
2.7.3 Zelltrennung mit Hilfe der MACS (Magnetic Cell Separation)-Technologie..... 35
2.7.4 RNA-Isolierung..... 41
2.7.5 RT-PCR 43
2.7.6 Durchflusszytometrie 50

3. Ergebnisse 56

3.1 Sensitivität des eingesetzten EBV DNA Nachweises..... 56
3.1.1 Etablierung der Sensitivität des EBV-DNA-Nachweises mithilfe einer Verdünnungsreihe des BamHI W Plasmids 57
3.1.2 DNA-Verdünnungsreihe der EBV-B-Zelllinie MGAR 57
3.1.3 EBV-DNA-Nachweis bei Kontrollpersonen 59
3.2 Nachweis von EBV-Transkripten..... 61
3.2.1 Etablierung der RT-PCR für verschiedene EBV-Transkripte an der B-Zelllinie MGAR..... 61
3.2.2 Testung der Sensitivität der RT-PCR-Reaktion an der B-Zelllinie Namalwa 62
3.3 Untersuchung der EBV-Infektion in Lymphozyten- und Monozytenfraktionen aus PBMC von Patienten und Kontrollpersonen..... 64
3.3.1 Zellfraktionierung der PBMC von Patienten mit Rheumatoider Arthritis und von gesunden Kontrollpersonen..... 64
3.3.2 RNA-Ausbeute bei RA-Patienten und Kontrollpersonen 68
3.4 Detektion von mRNA-Transkripten lytischer und latenter Gene in EBV-infizierten Zellen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis und Kontrollpersonen..... 69
3.4.1 Beispiele für die Detektion lytischer oder latenter Transkripte 70
3.4.2 Zusammenfassung der Detektion lytischer und latenter Transkripte 73
3.5 FACS-Analyse der separierten Zellfraktionen 79

3.5.1 Reinheit der im FACS untersuchten Zellfraktionen 79
3.5.2 Darstellung einer FACS-Analyse separierter PBMC 80

4. Diskussion 83

4.1 Epstein-Barr-Virus und Rheumatoide Arthritis 83
4.2 Sensitivität und Spezifität der erhobenen Daten 84
4.3 Detektion des BamHI W-Fragments in DNA von Patientenproben 86
4.4 Detektion von EBV-mRNA in den CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+ Fraktionen der Patienten- und Kontrollgruppe 86
4.5 Detektion lytischer und/oder latenter Transkripte in PBMC der Studienteilnehmer 87
4.6 Ausblick 88

5. Zusammenfassung 90

6. Abkürzungsverzeichnis 92

7. Literaturverzeichnis 95

8. Danksagung 101

9. Lebenslauf 102

1. Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatologie umfasst verschiedenste nicht traumatische Erkrankungen des Bewegungsapparates, zu denen neben systemischen Erkrankungen der Gefäße und des Bindegewebes, wie den Kollagenosen, vor allem entzündliche Erkrankungen der Gelenke zählen. Eine der häufigsten entzündlichen Gelenkerkrankungen ist die Rheumatoide Arthritis (syn. Chronische Polyarthritis), die durch einen chronischen, schubweisen Verlauf gekennzeichnet ist und in die Gruppe der Autoimmunerkrankungen mit genetischer Prädisposition eingeordnet wird.

1.1.1 Krankheitsbild der RA

Erste Zeichen einer RA sind die aseptische Zellproliferation der Synovia, der Gelenkschleimhaut. Diese löst Entzündungsreaktionen mit Infiltration von Lymphozyten und nachfolgender Zerstörung des Gelenkknorpels und –knochens aus.
Es werden während der meist schubweise verlaufenden Erkrankung verschiedene Stadien unterschieden. Richtungsweisend für die diagnostische Abstufung der einzelnen Erkrankungsstadien sind die Kriterien des American College of Rheumatology (1987) (1). Hierzu zählen Morgensteifigkeit für mindestens eine Stunde, Bindegewebsschwellung an wenigstens drei Gelenken, Schwellung der proximalen interphalangealen, metacarpophalangealen, oder Hand- bzw. Fußgelenke, symmetrische Schwellungen, Rheumaknoten, Nachweis des Rheumafaktors (s.u.) und radiologische Manifestationen (s.u.). Mindestens vier dieser sieben Punkte müssen zur Diagnosestellung feststellbar sein. Zwischen den einzelnen Schüben können Phasen remittierter Krankheitsaktivität liegen. Den anfänglich

auf wenige symmetrische Gelenke beschränkten Beschwerden folgt nach und nach die Ausbreitung auf das typische polyartikuläre Befallsmuster, das Fingergrund- und mittelgelenke, Handgelenke, Ellenbogen, Schultergelenke, Halswirbelsäule, Knie-, Sprung- und Zehengelenke umfasst.
Frauen sind, vermutlich hormonell bedingt, dreimal häufiger betroffen als Männer; das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt 40 Jahre. Nach zwei Jahren sind bei unbehandelten Patienten oft Schäden am Knochen nachweisbar und nach drei Jahren ist die Erkrankung bei 75% zu einer Behinderung geworden.
Bei der RA handelt es sich um eine chronisch entzündliche Systemerkrankung, die nicht nur Gelenke sondern auch weitere Organe betreffen kann (2).
Als extraartikuläre Manifestationen werden vor allem (bei bis zu 20 %) die pathognomonischen Rheumaknoten angesehen, die als derbe subkutane Knoten häufig in Gelenknähe über den Sehnen vor allem im Bereich von Ellenbogen und Achillessehne lokalisiert sind. In seltenen Fällen kann eine Amyloidose (metabolische Erkrankung, bei der es zur Ablagerung fehlgefalteter Proteine an Basalmembranen, retikulären und kollagenen Fasern kommt) mit nephrotischem Syndrom und chronischer Niereninsuffizienz auftreten, eventuell mit zusätzlicher Kardiomyopathie und gastrointestinalen Symptomen.
Radiologisch früh erkennbar ist eine für die Erkrankung typische gelenknahe Osteoporose. Weitere, seltene Manifestationen sind eine nekrotisierende Vaskulitis, eine Glomerulonephritis, und ein sogenanntes Sjörgen-Syndrom, bei dem exokrine Drüsen z.B. der Augen und des Mundes eine Sicca-Symptomatik (Trockenheit) aufgrund der sterilen und permanenten Entzündung zeigen.
Eine pathogenetisch und ätiologisch von der RA verschiedene Erkrankung ist die Juvenile rheumatoide Arthritis, mit einem Beginn im Alter von weniger als 16 Jahren und mit offenbar anderem immungenetischem Hintergrund, da der Rheumafaktor (s.u.) meist negativ ist (3).
Ein Neuauftreten der RA jenseits des 60. Lebensjahrs wird als late-onset RA bezeichnet. Sie verläuft meist in einer milderen Form. Besonders aggressiv dagegen ist der Verlauf beim Felty-Syndrom, bei dem aufgrund von starker Entzündungsaktivität der Rheumafaktor hochpositiv ist, eine Neutropenie mit

Fieber besteht und zirkulierende Immunkomplexe bei massiver Synovitis nachweisbar sind.

1.1.2. Ätiologie und Pathomechanismen

Bei der RA handelt es sich um eine Gelenkerkrankung, für die eine genetische Suszeptibilität in Assoziation zum HLA-System, aber auch zu anderen Genpolymorphismen (z.B. PTEN) beschrieben wurde (4).
Sicher ist, dass der HLA-Typ DR4 (bei 70% Phänotypenhäufigkeit aller Erkrankten vs. 15-20% in der Normalbevölkerung) das Erkrankungsrisiko erhöht. Das Auftreten bestimmter Untergruppen von DR4 oder anderer HLA-DR Allele mit dem sog. „Shared Epitope“ geht mit einem sechsfach höheren relativen Risiko einher, eine rheumatoide Arthritis zu entwickeln (5). Dabei ist Homozygotie mit entsprechend höherem RA-Risiko verbunden, als das heterozygote Vorliegen eines dieser HLA-Gene (2).
Die im Vordergrund stehende Entzündungsaktivität wird vermutlich durch ein (unbekanntes) Antigen ausgelöst, welches von Makrophagen und dendritischen Zellen aufgenommen und T-Zellen an der Oberfläche von APCs präsentiert wird. Bereits dadurch kommt es zu einer erheblichen Zytokinausschüttung, die durch die Makrophagen-ähnlichen (Typ A) und Fibroblasten-ähnlichen (Typ B) Zellen der Synovia noch verstärkt wird. Diese Zellen produzieren in großen Mengen den Tumornekrosefaktor α und Interleukin I. So ist der Beginn einer Entzündungskaskade geschaffen, die über die Aktivierung von B-Lymphozyten und folgende IgG- und IgM-Produktion, über Fibroblasten und Komplementaktivierung letztlich in eine Zerstörung von Knorpel und Knochen mündet (6) bzw. durch Immunkomplexe eine Vaskulitis hervorrufen kann. Die Degeneration wird zudem durch die Freisetzung von proteolytischen Enzymen wie den Matrix-Metallproteinasen gefördert, die bei der Zerstörung von Faser- und Gelenkknorpel mitwirken.
CD4+ Lymphozyten und B-Zellen aktivieren durch Produktion von Zytokinen wie IL-17 (7) und IL-6 (8) Osteoklasten, die Knochensubstanz abbauen.

Adhesionsmoleküle wie ICAM und VCAM-1 sind Wegbereiter für die chemotaktische Einwanderung von weiteren Entzündungszellen (9). Immunkomplexe, Verbindungen von Antigen mit einem Immunglobulin (IgG, IgA, IgM) haben unter anderem die wichtige Funktion, Virusantigene zu entfernen, und werden selbst von Phagozyten (Bindung über Fc-Teil des Immunglobulins und Fc-Rezeptor) aufgenommen und verdaut. Übersteigt jedoch, wie bei der RA vermutet, die Menge der Immunkomplexe die Aufnahmefähigkeit der Phagozyten, so kann es zu Ablagerungen an Gefäßwänden und im Gewebe kommen. Diese Ablagerungen bewirken dann möglicherweise eine Komplementaktivierung und sind somit verstärkend an der Entzündungskaskade beteiligt. Auch bei anderen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis können beim Patienten oftmals erhöhte zirkulierende Immunkomplexe im Serum nachgewiesen werden (10). Sie können systemisch zu Vaskulitiden führen, bzw. nach Phagozytose zu einer weiteren Freisetzung von Zytokinen und anderen Stoffen, die den Knorpel direkt entzündlich angreifen. Hierzu zählen beispielsweise die Stickstoffsynthetase, die Cyclooxygenase oder Proteinasen.

1.1.3 Diagnostische Methoden zur Abklärung einer RA

Für die Sicherung einer RA ist eine gute Anamnese und klinische Untersuchung hinsichtlich der ACR-Kriterien (1) bereits sehr aussagekräftig. Ein symmetrisches Verteilungsmuster, Morgensteifigkeit und die Beteiligung vieler kleinerer Gelenke lassen mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine RA schließen. Bei der Untersuchung fallen typischerweise symmetrisch entzündete, gerötete und überwärmte Gelenke auf, sowie z.T. Ergüsse und eingeschränkte Beweglichkeit. Gelenknahe Schäden der Knochensubstanz (Erosionen, osteoporotische Veränderungen) werden im Röntgenbild beurteilt (11).
An erster und aussagekräftigster Stelle steht hier das klassische Röntgen, das Hinweise für das Ausmaß der bereits stattgehabten Knochen- und Knorpeldestruktion liefert. Wichtige im Röntgenbild sichtbare „Rheuma-Zeichen“

sind die gelenknahe Osteoporose, im späteren Stadium Erosionen („Geröllzysten“) und Gelenkspaltverschmälerungen. Auch im Frühstadium, wenn die RA noch keine radiologischen Manifestationen hat, ist eine Röntgen-Aufnahme wichtig, um den Verlauf der Erkrankung nachvollziehen zu können. Eine empfindlichere Untersuchung ist die Knochenszintigraphie, bei der auch die Aktivität der Entzündung, selbst bei klinisch noch unauffälligen Gelenken, festgestellt werden kann. Außerdem lässt sich ein intra- von einem periartikulären Geschehen abgrenzen.
Die Sonographie von Gelenken kann bei der Beurteilung von Ergüssen, Zysten, und Verdickungen der Synovialis diagnostisch sinnvoll sein. Dies und die MRT-Untersuchung sind heute die sensitivsten Möglichkeiten, um frühe Entzündungsreaktionen an Gelenken nachzuweisen, bestenfalls noch bevor Zeichen der Erosion aufgetreten sind. Außerdem sollten differentialdiagnostisch vom Knochen ausgehende Prozesse oder traumatische Ursachen einer Gelenksentzündung ausgeschlossen werden (11).
Diagnostisch relevante Laboruntersuchungen sollten folgende Tests einschließen:

a) Bestimmung der BSG und des CRP, eventuell Serumeiweißelektrophorese. Bei Verdacht auf eine Immunkomplexvaskulitis kann die Analyse der Komplementfaktoren C3 und C4 hilfreich sein.

b) Auto-Antikörper: Bei etwa 70 % der RA-Patienten ist der sogenannte Rheuma-Faktor (RF) nachweisbar. Der RF ist ein Autoantikörper, meist der IgM, seltener auch der IgG oder IgA Klasse, der sich gegen den Fc-Teil körpereigener IgG-Antikörper richtet. Er gilt allerdings als ein unspezifisches Zeichen, da er auch bei verschiedenen Infektionen oder anderen Autoimmunerkrankungen zu finden ist. Der Test ist positiv ab einem Wert von > 30IU/ml und sollte auch nach Erstdiagnose als Verlaufsparameter weiterverwendet werden.
CCP-Autoantikörper: dieser AK-Test weist die höchste serologische Krankheitsspezifität von über 98% aus (Prävalenz bei Gesunden 1-3%) und

kann bereits vor klinischen Krankheitsmanifestationen den Verdacht auf eine RA erhärten. Zum Nachweis werden cyclisierte citrullinierte Proteine/Peptide eingesetzt, gegen die Autoantikörper spezifisch gerichtet sind. Bei ca. 85% der anti-CCP-positiven Patienten lässt sich auch IgM-RF nachweisen. Die zuerst in der Epidermis und in Schleimhäuten bei RA-Patienten vorkommenden, solche Antikörper bindenden Proteine wurden als Fillagrine identifiziert, die Citrullylreste tragen. Sie haben physiologisch die Funktion, Keratinfilamente miteinander zu verknüpfen.
Anti-nukleäre Antikörper (ANA): Diese sind eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern gegen Strukturen des Zellkerns und werden vor allem bei Kollagenosen gefunden. ANA gelten als positiv bei einem Titer von 1:>80.
pANCA: Ein perinukleär anfärbender, anti-neutrophiler zytoplasmatischer Antikörper (im Gegensatz zum cANCA, bei dem vorrangig das Zytoplasma anfärbbar ist), gibt einen ebenfalls unspezifischen Hinweis auf eine Autoimmunerkrankung, evtl. auf eine RA. pANCA ist meist gegen das Enzym Myeloperoxidase (MPO) gerichtet.

c) HLA-Typisierung: HLA-Klasse II-Antigene werden Zentromer-nah von allelen Genen auf dem Chromosom 6 kodiert. Sie werden vorwiegend von Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems (B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten, aktivierten T-Lymphozyten) exprimiert. Dadurch kann die Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“ erfolgen - und gegebenenfalls eine spezifische Immunreaktionen initiiert werden. Bestimmte Subtypen (s.u.) gehen mit erhöhtem Risiko für eine Rheumatoide Arthritis einher.

1.2 HLA-Assoziation der Rheumatoiden Arthritis

HLA-DRB1 – Allel 1	HLA-DRB1 – Allel 2	Schweregrad der Gelenkerkrankung	Auftreten einer Vaskulitis
DRB1*04-QKRAA	DRB1*04-QKRAA	+++	+++
DRB1*04-QKRAA	DRB1*04-QRRAA	++	+
DRB1*04-QRRAA	DRB1*04-QRRAA	++	+
DRB1*04-QKRAA	DRB1*01-QRRAA	++	-
DRB1*04-QRRAA	DRB1*01-QRRAA	++	-
DRB1*04-QKRAA	kein SE	+	+
DRB1*04-QRRAA	kein SE	+	-
DRB1*01-QRRAA	DRB1*01-QRRAA	+	-
DRB1*01-QRRAA	kein SE	+	-
kein SE	kein SE	-	-

Tab. 1.1: HLA-DR4 Genotypen und assoziierter RA-Schweregrad (12)

Die HLA-DR4-Subtypen (HLA-DRB1-Allele), die mit erhöhtem Risiko für RA einhergehen, weisen in einem bestimmten Molekülabschnitt, der DRβ1 Kette, identische Aminosäuresequenzen, das sog. „Shared Epitope“ auf (Tab. 1.1). Der molekularbiologische Nachweis eines HLA-DRB1 Allels mit „Shared Epitope“ bei Patienten mit entsprechender klinischer Symptomatik kann nicht nur zur Sicherung der klinischen Diagnose einer RA beitragen, sondern auch zur Risikobeurteilung für Schweregrad und Verlauf der Erkrankung und zur weiteren Therapieplanung dienen. So ist bekannt, dass Personen, die für SE^+ HLA-DRB1 Allele positiv sind, ein höheres Risiko besitzen, eine RA zu entwickeln, als Personen mit SE^- $DRB1^+$ Allelen. Hinzu kommt ein Gendosis-Effekt (12): Tragen beide Allele der zwei DRB1-Loci einer Person eine SE-Sequenz, insbesondere auch in Assoziation zu $DRB1^+$04 Allelen, so ist dies mit einem progressiveren und destruktiveren Krankheitsverlauf verbunden.
Als RA prädisponierende HLA-DRB1 Allele gelten insbesondere DRB1* 0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *0102, *1402 und *1001. Das bedeutet nicht

zwangsläufig einen direkten Zusammenhang zwischen SE+ HLA-DRB1 Allelen und Pathogenese der RA, der Nachweis solcher SE+ HLA-DRB1 Allele bei Patienten mit RA ist jedoch ein diagnostischer Hinweis für eine genetische Prädisposition der Erkrankung.

1.3 Funktion und Fehlfunktion der T-Lymphozyten bei der RA

T-Zellen sind wesentliche zelluläre Komponenten der spezifischen Abwehr, die nach ersten Differenzierungsschritten ausgehend von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark in den Thymus wandern, um dort zu HLA-restringierten, Fremd- aber nicht Selbstpeptide erkennenden naiven CD4+ oder CD8+ T-Zellen der Immunabwehr heranzureifen. Die Aktivierung und Induktion zu klonaler Expansion erfolgt in den sekundären lymphatischen Organen des Lymphsystems (MALT = mucosa associated lymphatic tissue, Lymphknoten, Milz, Haut-assoziiertes lymphatisches Gewebe u.a.). Hierzu müssen den naiven T-Zellen Antigene durch antigen-präsentierende Zellen (APCs) angeboten werden, und zwar in bereits prozessierter Form. Sie sind nicht in der Lage, so wie B-Zellen, Proteine in ihrer Tertiärstruktur zu erkennen. Die präsentierten Antigene kommen dabei entweder aus dem endogenen Pool (Virusproteine, Tumorantigene) oder aus dem exogenen Pool (bakterielle, parasitäre Peptide). Durch Bindung des αβ-T-Zellrezeptors an HLA-Moleküle, die solche Fremdmoleküle oder auch veränderte Proteine/Peptide aus Tumoren gebunden haben, kommt es zur Induktion von Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. IL-2R), sowie zur Synthese von Zytokinen (z.B. IL-2, die die Mitose der Zellen und so das Wachsen des T-Zellklons einleiten. Meist wird das Wachstum mehrerer Klone induziert, da ein Antigen in der Regel mehr als ein Epitop hat.
Die T-Gedächnisszellen sichern das immunologische Gedächnis in Hinblick auf eine beschleunigte Reaktion bei zukünftigen Infektionen mit dem gleichen Antigen.

Die Vielfalt der αβ-TCRs (bis zu 10^{11} unterschiedliche Bindungsstellen) wird durch die Verteilung der genetischen Information für jeden TCR auf verschieden Gene (V-, D- und J-Teilgene) erreicht. Durch zufälliges Rearrangieren dieser Teilgene für die Codierung der beiden Ketten α und β des TCR („somatische Rekombination“) kann eine weitaus höhere Anzahl von TCRs gewährleistet werden, als es die einzelnen, daran beteiligten Genloci ermöglichen würden. Nachfolgend werden die T-Zellen im Thymus an MHC-Selbst-Peptidkomplexen positiv und negativ selektiert, so dass für fast jedes denkbare Fremdantigen Rezeptoren vorhanden sind, alle autoreaktiven Zellen aber vernichtet werden. Die αβ-TCRs sind in die Zellmembran verankerte heterodimere Glykoproteine.

Aufgrund der Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle können heute T-Zellen in viele verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden. Alle αβ-TCR+ T-Zellen tragen CD3. Etwa 60 % aller T-Zellen sind CD4 positiv, ca. 40% CD8 positiv. Ein geringer Anteil von etwa 5% tragen weder CD4 noch CD8 auf ihrer Oberfläche und werden deshalb „Nullzellen“ genannt. Das Verhältnis CD4+ : CD8+ T-Zellen liegt beim Gesunden bei etwa 2:1.
Nach funktionellen Gesichtspunkten unterscheidet man T-Zellen, die die Immunantwort verstärken (T-Helferzellen, CD4+), regulatorische T-Zellen, die die Funktion anderer Immunzellen dämpfen können (syn. Suppressorzellen), (CD4+, CD25+ und CD62L+), und zytotoxische T-Zellen (CD8+), die durch direkte Bindung an das Antigen durch verschiedene Mechanismen Antigen-tragende Zellen zerstören können. Ein Teil der CD4+ Zellen spezialisiert sich zu Gedächnisszellen (oft CD45RO+), die zukünftige Immunprozesse optimieren. CD4+ T-Zellen wirken verstärkend, in dem sie die Antikörperproduktion der B-Lymphozyten fördern, aber auch die Differenzierung und Proliferation zytotoxischer CD8+ Zellen ermöglichen, sowie Monozyten/Makrophagen zur Phagozytose aktivieren. Innerhalb der T-Helfer-Zellpopulation unterscheidet man die Subtypen TH1 und TH2. TH1-Zellen sind durch ein spezifisches Muster der Zytokinproduktion gekennzeichnet: IL2, IFγ und TNFβ. Dieses Zytokinmuster vermittelt vor allem die Aktivierung von Makrophagen, CD8+ Zellen, sowie die Produktion von IgG. Außerdem sind TH1-Zellen an

allergischen Reaktionen vom verzögerten Typ (IV) beteiligt und zeigen eine Erhöhung bei den meisten Autoimmunerkrankungen. TH2-Zellen vermitteln insbesondere eine allergische IgE-Antwort (Typ I) durch das Zytokinmuster IL4, 5, 9, 10 und 13. Zu welchem Suptyp sich eine CD4+ T-Helferzelle entwickelt, hängt u.a. von genetischen Faktoren, dem Antigen und den die Immunantwort dominierenden Zytokinen ab. Es besteht eine gegenseitige Hemmung von TH1 und TH2, d.h. eine aktive TH1-Antwort lässt wenig TH2-Antwort zu und umgekehrt.

Fehlfunktion von T-Zellen bei der RA
Bei RA-Patienten wurden verschiedene Veränderungen in den peripheren T-Zellpopulationen festgestellt. So wurde bei Patienten die Dominanz von oligoklonalen CD4-positiven Zellen im Gelenkinfiltrat, eine Expansion von CD4+ CD28- Effektor-T-Zellen im Serum und im Gelenk (10), sowie die Reduktion naiver CD4+ T-Zellen als Zeichen der Veränderung von T-Zellsubpopulationen beobachtet Durch Defekte in Signaltransduktionswegen scheinen T-Zellen bei RA-Patienten eine deutlich niedrigere Stimulierbarkeit durch Antigene aufzuweisen und eine Störung in der Expression von Zytokinen (z.B. IFNγ) zu zeigen. Dazu konnte gezeigt werden, dass die Antwort auf Antigenstimulus, also die dynamische Proliferation und klonale Expansion der T-Zellen bei RA-Patienten stark eingeschränkt ist (13). Phänotypisch erscheinen die T-Zellen bei RA-Patienten vorgealtert (13,14). Bisher ist unbekannt, welche genetische Bedingung bzw. welche Umweltfaktoren in der Auslösung solcher T-Zell-Abnormalitäten eine Rolle spielen.

1.4 Rheumatoide Arthritis und EBV

Besonders unter Verdacht für eine Beteiligung als Triggermechanismen stehen Infektionen mit verschiedenen Erregern. Eine Theorie legt dabei ein sog. Molekulares Mimikrie zugrunde (15), wobei Antigene bestimmter Erreger körpereigenen Strukturen sehr ähneln und so spezifische Immunzellen, die

eigentlich gegen die Erreger gerichtet sind, aktiviert werden und sich damit in ihrem Ziel „irren“ und auch körpereigene Strukturen angreifen. Auch nicht-infektiöse Stoffe, die von außen aufgenommen werden, z.B. Medikamente, könnten eine Autoreaktion gegen eigentlich zu tolerierendes eigenes Gewebe auslösen. Dieser Zusammenhang wird z.B. bei Procainamid vermutet (16), das eine ANA-bildende Autoimmunerkrankung verursachen kann.
Bei der Rheumatoiden Arthritis werden als Triggermechanismus Infektionen mit verschiedenen Mikroorgansimen diskutiert. Dazu zählen neben einigen Prokaryonten vor allem virale Erreger: EBV, CMV und Parvoviren. Da bei RA-Patienten eine erhöhte Frequenz EBV-infizierter B-Zellen im Blut beobachtet wird und Antikörper gegen EBV auch Kreuzreaktionen gegen Selbstantigene zeigen, wird seit langem ein Einfluss vom Epstein-Barr-Virus auf die Entwicklung der RA diskutiert (17). Außerdem steht das Heat-Shock-Protein (18) aus Mykobakterien unter Verdacht, für die dysregulierte Immunantwort verantwortlich sein zu können.

1.4.1 Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus ist ein doppelsträngiges DNA-Virus, das den γ-Herpesviren innerhalb der großen Familie der Herpes-Viren angehört. Herpesviren kommen mit ca. 100 verschiedenen Arten weltweit bei Mensch und Tier vor und können unterschiedliche, weitgefächerte klinische Symptome hervorrufen. Ihnen ist gemeinsam, dass sie nach der Primärinfektion, die häufig klinisch inapparent bleibt, lebenslang in ihrem Wirt persistieren. Reaktivierungen ausgelöst durch bestimmte Trigger sind immer wieder möglich. γ-Herpesviren sind zusätzlich durch eine hohe Zellspezifität im Wirt (ausschließlich B- und T-lymphotrop) und unterschiedlich lange Replikationszyklen gekennzeichnet. Sie haben eine zellzerstörende Potenz und können unter Umständen eine unkontrollierte Zellvermehrung (Onkogenese) durch Zelltransformation verursachen.

Das EBV-Virion hat eine Größe von etwa 120nm und besteht aus 162 Kapsomeren. Das Genom besteht aus 172 kb und codiert für ca. 90 Proteine. In den Industrienationen liegt die Durchseuchung bei ca. 40% bis zum 15. Lebensjahr und steigt auf 80-90% im Erwachsenenalter an. In Ländern mit niedrigem Hygienestandard liegt die Durchseuchung schon im Kleinkindalter bei praktisch 100%.
EBV ist der Erreger der Infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) und trägt zur Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen wie dem Burkitt-Lymphom, dem Nasopharynxkarzinom und anderer lymphoproliferativer Prozesse wesentlich bei. (19)

1.4.2 EBV Infektion der Wirtszelle und Pathogenese

Das Virus infiziert wahrscheinlich zunächst undifferenzierte Epithelzellen des Mund- und Rachenraums, wobei es zur Weitergabe an gewebeinfiltrierende B-Lymphozyten kommt, in die das Virus über spezifische Rezeptoren (CD21) eindringt. Diese B-Zellen werden unmittelbar nach der Infektion immortalisiert. Offenbar sind sie das Ziel für virusspezifische zytotoxische T-Zellen, so dass bei Immunkompetenz die meisten infizierten B-Lymphozyten durch T-Zellen eliminiert bzw. kontrolliert werden.

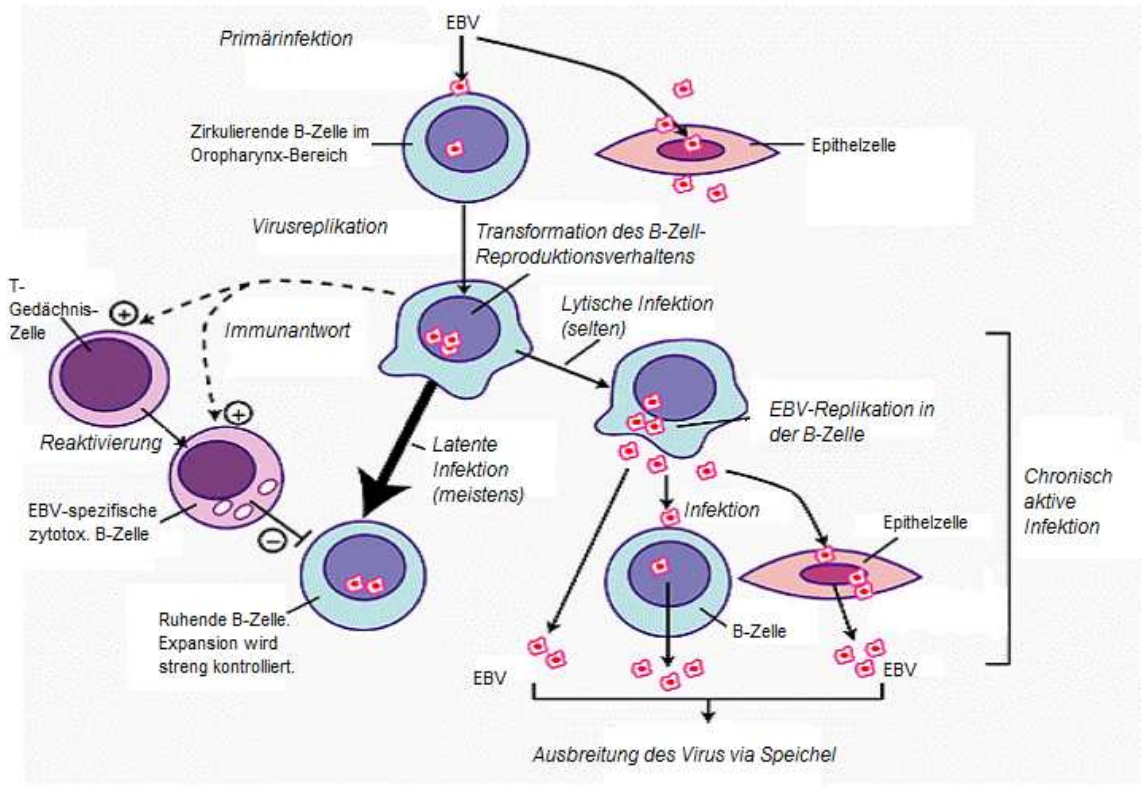


Abb. 1.1: Überblick über den Weg der EBV-Infektion bei Gesunden.
(Modifiziert nach Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press 2001)

In einigen Zellen kann das Virus allerdings latent bleiben. Die virale Genexpression beschränkt sich in diesen im Ruhezustand befindlichen Zellen dann auf die Synthese eines einzigen Proteins, LMP2, und des EBER-Transkripts (20), was dazu führt, dass die infizierte Zelle der Zerstörung durch T-Zellen entgeht. Die latent infizierten Zellen stellen das Reservoir für Reaktivierungen dar (21). Wenn sie den stimulierenden Signalen von T-Zellen z.B. in lymphatischem Gewebe ausgesetzt sind, kann das DNA-Genom dadurch wieder vermehrt werden und dann in Abhängigkeit von weiteren Signalen (Zytokinen, Interaktion mit T-Zell-Liganden) zu einem lytischen Reproduktionszyklus oder aber wieder zurück in die Latenz führen.
In vitro konnte gezeigt werden, dass auch CD4+ und CD8+ Zellen primär infizierbar sind, ebenso Monozyten (22). Die Expression eines bestimmten

Genprodukts des BZLF1-Gens schien bei diesen Untersuchungen die T-Zellproliferation und das Apoptose-Verhalten zu beeinflussen (23). Weiter wurde beobachtet, dass EBV-infizierte B-Zellen mit Epithelzellen fusionieren und so das Virus an diese weitergeben konnten. Diagnostisch ist die PCR der gebräuchlichste und aussagekräftigste Nachweis für EBV. Außerdem sind im zeitlichen Verlauf Antikörper gegen verschiedene Virusantigene nachweisbar (s. Abb. 1.2).

Antikörper gegen das Virus-Kapsid-Antigen (VCA) können lebenslang (IgG) bzw. bis zu 12 Wochen (IgM) nachgewiesen werden. Bereits wenige Tage nach Infektion werden bei 80% der Patienten Antikörper gegen EA („Early Antigen“) gebildet, jedoch nur während der akuten Erkrankung und zu Beginn der Rekonvaleszenz. Das Epstein-Barr Nuclear Antigen, EBNA, provoziert eine späte, aber ebenfalls persistierende Bildung von IgG.

Weder therapeutisch noch prophylaktisch sind momentan erfolgreiche Maßnahmen verfügbar, EBV-Infektionen zu eradizieren.

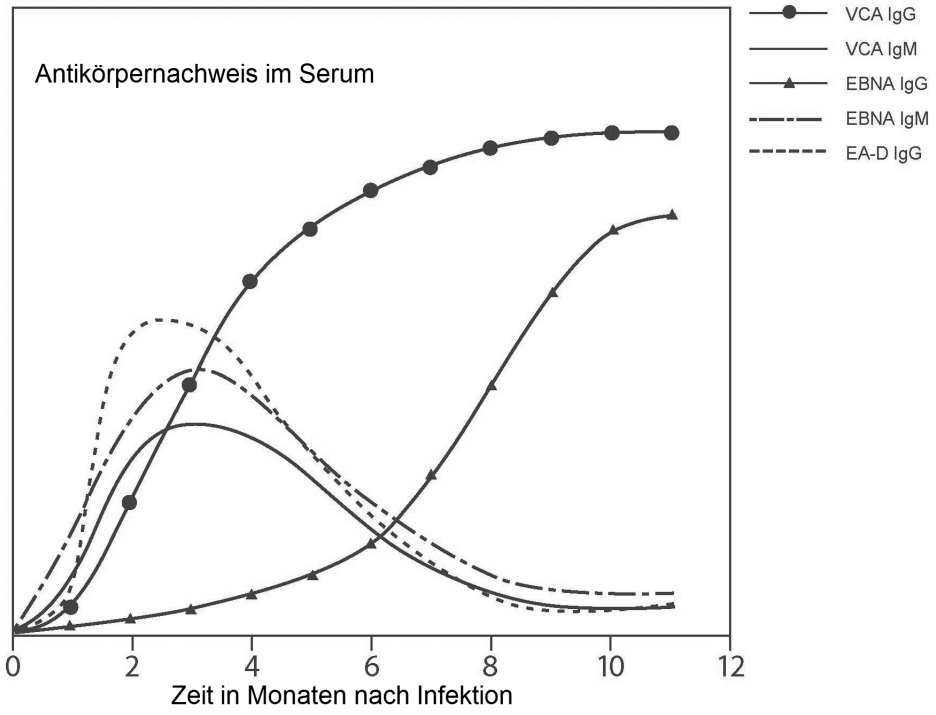


Abb. 1.2: Übersicht über die Immunantwort auf die verschiedenen EBV-Antigene. Modifiziert nach: Immunobiology, 6th edition. 2005. Garland Science.

1.4.3 Penetration und Uncoating von EBV

Das Epstein-Barr-Virus kann mit einem Glykoprotein, gp350/220, das in seiner Virushülle verankert ist, an die B-Zelle adsorbieren. Dadurch wird ein Mechanismus eingeleitet, der zur Quervernetzung von CD21-Molekülen (Komplementrezeptor für C3d) führt und dadurch die Endozytose des Virus auslöst (24).
Während der Endozytose verschmilzt die Virushülle mit der Zellmembran und eröffnet so dem Kapsid den Weg ins Zytoplasma. Diese Membranfusion wird entscheidend vom viralen Hüllprotein gp85 bestimmt (25).
Die folgenden intrazellulären Vorgänge, durch die das virale Genom in den Kern gelangt, sind noch unverstanden. Im Zellkern untergeht das Virus vielfache homologe Rekombination, und es verbleiben schließlich eine Vielzahl von DNA-Kopien extrachromosomal.
Die so infizierte Wirtszelle repliziert dann in den folgenden Zyklen das Virusgenom zusätzlich zu ihrem eigenen Genom mit und gibt es bei der Zellteilung an die entstehenden Tochterzellen weiter.

1.4.4 Latente Infektion

In den meisten Fällen verbleibt das Virus lebenslang in der für Herpes-Viren typischen latenten Infektion, ohne symptomatisch zu werden. Die Latenz geht mit der Expression von 11 verschiedenen Genen einher. Man unterscheidet die Latenzformen Lat-0, Lat-I, Lat-II und Lat-III, die sich durch die translatierten Genprodukte voneinander unterscheiden. In ruhenden Gedächnisszellen (Lat-0) wird nur EBER und LMP-2A transkribiert (Tab. 1.2), während die Latenzformen II und III in Lymphomen, dem Nasopharyngealen Karzinom, und in lymphoblastoiden B-Zelllinien vorkommen (Tab. 1.2). 6 Genprodukte der Latenz (EBNA-1, 2, 3A, 3C, 5 und LMP1) wirken immortalisierend auf B-Zellen.

Latenzform	**Genprodukte**	
Lat-0	LMP-2A, EBER1+2	Ruhende B-Zelle
Lat-1	EBNA-1, EBER1+2 BARF-0	In Biopsien von Burkitt-Lymphomen u. davon etablierte Zelllinien
Lat-2	EBNA-1, LMP-1, LMP-2A, EBER1+2, BARF-0	NPC, Hodgkin-Lymphom
Lat-3	EBNA-1-6, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBER1+2, BARF-0	Lymphoblastoide B-Zelllinien in Zellkultur und immunoblastische Lymphome

Tab. 1.2: EBV-Latenzformen, Nach Thorley-Lawson 1996.

Neben der Immortalisierung von Zellen spielen Produkte von Latenz-Genen die wichtigste Rolle zur Aufrechterhaltung einer lebenslangen Persistenz des Virus im Wirt. Zu Beginn entstehen aus einem langen, ungespleißten Transkript viele verschiedene EBNA-mRNAs. Dieser Transkriptionsvorgang wird durch zwei Promotoren gesteuert (C_p, W_p), die auf dem Fragment BamHI W und C kodiert sind. Die beiden Promotoren sind zu unterschiedlichen Zeiten der Latenz aktiv (26), was bedeuten könnte, dass die EBNA-Proteinsynthese auch noch nach der Transkription beeinflußt werden kann.

EBNA-1

Für dieses nukleäre Phospho-Protein stehen mehrere Promotoren zur Verfügung, die im BamHI-Bereich transkribiert werden (26,27). Es wird im BKRF-1 Leserahmen kodiert und von fast allen EBV-infizierten Zellen exprimiert. Funktionell ist es in erster Linie für die Aufrechterhaltung der Transkription weiterer latenter EBV-Gene verantwortlich. Indem es auch an den C-Promotor bindet, kann es transaktivierend auf die Expression von eigenen EBNA-Proteinen wirken.

In einem Mausmodell (28) konnte gezeigt werden, dass es transformierend wirkende Eigenschaften für Zellen besitzt. Außerdem ist beschrieben, dass Glycin-Alanin-Residuen von EBNA-1 Proteinen verhindern, dass es vom Proteasomenkomplex verdaut und in Assoziation zu MHC-Molekülen auf der Oberfläche der infizierten Zelle zur T-Zellerkennung präsentiert wird. (29)

EBNA-2

Das Protein ist ein Transaktivator, der die Expression verschiedener zellulärer (CD21, CD23, c-frg) (30) und viraler Genprodukte (31) (LMP-Proteine, s.u.) positiv beeinflusst. Es wird im BYRF-1 Frame kodiert und findet sich ebenfalls im Zellkern. Die Transaktivierung nachfolgender Genprodukte geschieht nicht direkt durch Bindung an entsprechende Promotoren, sondern durch Interaktion mit zellulären Faktoren wie RBP J_k, TAF40, RPA70 etc. (32). So wird durch EBNA-2 via Aktivierung von LMP-1 die Immortalisierung hauptsächlich bewirkt. Gemeinsam mit EBNA-5 bewirkt es den Übergang von der G_0 in die G_1 Phase des Zellzyklus (33). Es konnte des weiteren eine Suppression von IgM gezeigt werden.

EBNA-3-6

Die EBNA 3-6 Genprodukte werden durch mRNAs translatiert, die von der gleichen Vorläufer-RNA abstammen und durch unterschiedliches Spleißen entstanden sind. Dabei wird EBNA-3A von den Frames BLRF-1 und BERF-1 kodiert, EBNA-3B von BERF-2a und –2b und EBNA-3C von BERF-3 und –4. Die kodierenden Sequenzen von EBNA-3A, -3B und –3C liegen tandemartig auf jeweils zwei Exonabschnitten, nur durch ein kurzes Intron getrennt. Wie EBNA-2 sind sie phosphoryliert. EBNA-3A reguliert EBNA-3C, beide dienen ebenfalls dem Immortalisierungsprozess (34,35). EBNA-3C wiederum aktiviert ein anderes Latenzprotein, LMP-1 (s.u.) und das zelluläre Protein CD21. Die Stellung von EBNA-3B ist nicht klar. EBNA-5 erfüllt zusammen mit EBNA-2 (s.o.) (33) eine wichtige Aufgabe als Regulator im Wechsel von der G_0- in die G_1-Phase des Zellzyklus.

LMP-1

LMP-Proteine sind Membranproteine. LMP-1 wird von BNLF-1 kodiert und ragt mit seinem hydrophilen C-Ende ins Zellinnere. Mit mehreren hydrophoben Transmembranregionen ist es in der Zytoplasmamembran verankert und über einen kurzen N-Terminus an der Zelloberfläche detektierbar. Die

Phosphorylierung am C-Ende geschieht an Serin-Resten. Durch die Verbindung zum Zytoskelett über Vimentin kommt es an bestimmten Stellen der Zelloberfläche gehäuft vor. Molekular besteht eine Ähnlichkeit von LMP-1 zu TNF-Rezeptoren. Durch eine mutierte Variante konnte nachgewiesen werden, dass LMP-1 ebenfalls an der Immortalisierung von B-Zellen beteiligt ist, denn die LMP-1-EBV-Mutante war unfähig, Zellen zu immortalisieren. Regulatorisch verstärkend wirkt LMP-1 auf Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, LFA-1, LFA-3) auf B-Zellen (30) sowie auf das Protoonkogen bcl-2 (36) und auf eine Ca-abhängige Proteinkinase. Ebenso aktiviert es den zellulären Transkriptionsfaktor $NF_{\kappa}B$, vermutlich in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad.

LMP-2A+2B

Die Transkription dieser Proteine findet erst statt, nach dem das EBV-Genom sich von einer kettenförmigen Struktur zu einem Ring (Episom) geschlossen hat (37). LMP-2A und –2B starten von zwei unterschiedlichen Promotoren aus. Funktionell stört LMP-2A die durch den Antigenrezeptor vermittelte Aktivierung der B-Zellen, wodurch die Zellen sich nicht weiter teilen (38). So wird eine zelluläre Immunantwort inhibiert und damit die Latenz weiter stabilisiert. LMP-2B wirkt regulatorisch auf –2A und somit indirekt auf Replikationsvorgänge der Zelle.

EBER-1+2

Diese beiden viralen Transkripte (RNAs) werden als einzige zwar transkribiert, aber nicht translatiert. Die Transkripte tragen keinen Poly-A-Schwanz und keine CAP-Struktur. Sie befinden sich während der Latenz größtenteils im Kern. Es wird ein Zusammenhang mit den Genprodukten der EBNA-Familie vermutet, da die Transkripte in zeitlicher Abhängigkeit zu EBNA-1, 3, 4 und 6 nachgewiesen werden konnten. Auf molekularer Ebene wurden Sequenzähnlichkeiten mit Adenoviren (VA1 und VA2- RNA) festgestellt und deshalb eine ähnliche Funktion vermutet (39). Nach Übergang in den lytischen Zyklus werden die EBER-Transkripte herunterreguliert (40).

EBER-1+2 inhibieren die Aktivierung der DAI-Kinase, die Interferon-abhängig in der Immunantwort für die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren eIF2 und damit für die Neusynthese verschiedener IFN-abhängiger Proteine sorgt (41). Damit verhindern EBER Transkripte Interferon-induzierte Immunreaktionen.

1.4.5 Lytische Phase

Zu einem spontanen Übergang in den lytischen Zyklus und einem damit verbunden erhöhten Risiko für eine Virusreplikation und Reaktivierung einer EBV-Infektion kommt es selten und vermutlich nur unter bestimmten permissiven Bedingungen.
Äußere Faktoren wie Hitze, Strahlung und Chemikalien, sowie erworbene oder angeborene Immundefekte werden als Stressfaktoren vermutet. Letztlich ist jedoch molekularbiologisch noch nicht geklärt, wodurch der Eintritt in die Lyse ausgelöst wird. Man muss heute davon ausgehen, dass der lytische Zyklus in vivo nicht nur in differenzierten Epithelzellen stattfindet, sondern auch in B-Zellen als latent infizierten Zellen ablaufen kann.
Die lytische Replikation verläuft kaskadenartig nach einem komplexen Muster und wird in eine immediate-early-, early- und late- Phase eingeteilt. Dabei erfolgt in der immediate-early Phase die Änderung des transkribierten Genspektrums, das in der Latenz exprimiert wird, hin zur Expression einer lytischen Kaskade von Proteinen. Einige Genprodukte aus der vorangehenden Phase fungieren dabei aktivierend für die nächste Phase. Für drei Genprodukte, BZLF1, BRLF1 und BILF1 konnte eine die lytische Kaskade in Gang setzende Eigenschaft nachgewiesen werden (42). Dabei unterdrücken diese drei einerseits die Promotoren der latenten Phase (LMP-1-Promotor, C_p- und W_p-EBNA-Promotor), und initiieren andererseits die folgenden Stufen der Early-Genexpression. Diese werden nun in der zweiten Stufe der Replikation aktiviert und transkribiert. Die virale DNA-Replikation findet während der early- und der late-Phase statt und beginnt am Initiationspunkt Ori_{lyt}. Wichtig für das Umschalten von der Latenz in den lytischen Zyklus ist hierbei zunächst das

BZLF-Genprodukt Zta, das in Lymphozyten das Signal zum Beenden der Latenz gibt und die Replikationsphase beginnen lässt. Es ermöglicht die Anlagerung eines Polymerase-Helikase-Primase-Komplexes und den Beginn der normalen Polymerisierung.

1.5 Fragestellung

Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis wurde gezeigt, dass sie eine erhöhte Frequenz EBV-infizierter B-Zellen im Blut aufweisen. EBV-Antigen spezifische CD8+ Effektor-T-Zellen der RA Patienten scheinen dabei im Vergleich zu EBV-infizierten gesunden Personen eine geringere Produktion von spezifischen Zytokinen wie Interferon γ aufzuweisen. Darüber hinaus zeigen RA-Patienten noch weitere Störungen ihrer T-Zell-Differenzierung und Effektorfunktion.
Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei RA-Patienten häufiger als bei Gesunden eine erhöhte Menge an viraler DNA in Blut und Synovialgewebe nachweisbar ist (43).
In dieser Promotionsarbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob bei Patienten mit RA das Epstein-Barr Virus durch direkte Infektion von T-Zellen an Störungen von T-Zellfunktionen beteiligt sein könnte. Dazu sollte eine Gruppe von RA-Patienten untersucht und mit einer Kontrollgruppe bezüglich ihres EBV-Infektionsstatus in verschiedenen Zellpopulationen im Blut verglichen werden. Hierfür waren CD4 und CD8 positive T-Zellen über MACS-Sortierung anzureichern und mit B-Zellen und Monozyten hinsichtlich des Vorkommens von EBV zu vergleichen.
Mit Hilfe von RT-PCR Testungen sollten lytische und/oder latente Genprodukte im Blut der Studienteilnehmer festgestellt, und wenn möglich zellpopulations-spezifisch nachgewiesen werden, um weiter Aufschluss darüber zu geben, inwieweit sich RA-Patienten durch ein verändertes Synthese-Muster viraler mRNA von gesunden, latent infizierten Probanden unterscheiden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	**Bezeichnung**	**Firma, Ort**
Sterilbänke	LaminAir HBB 2448	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifugen	Beckman Coulter GS6R Centrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Eppendorf-Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5402	Eppendorf AG, Hamburg
Gelelektrophoresekammer	DNA Pocket Bloc, Biozym Diagnostik	Biozym, Hamburg
Elektrophoresegerät	Electrophoresis Power Supply ST 606T	GIBCO BRL, Eggenstein
Lichtmikroskop	Laborlux S	Ehem. Ernst Leitz GmbH, inzwischen Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
MACS-Säulen	MACS Cell Separation Columns und MiniMacs Separation Unit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
UV-Kamera (Gelanalyse) Software	Chemiluminescence Detection System DIANA III	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
Photometer und Software	Spectrophotometer ND-1000, Software “NanoDrop”	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Speedvac	Speed Vac Concentrator	Bachhofer, Reutlingen
Vortex	Vortex Mixer neoLab	Bender & Hobein AG, Zürich/CH

Magnetrührer	IKAMAG Reo	Eppendorf AG, Hamburg
Durchflusszytometer Software	BD LSR II Software „BD FACS Diva“	Becton Dickinson Biosciences GmbH, Heidelberg
PCR-Gerät	Primus authorized thermal Cycler for PCR	MWG Biotech, Ebersberg
Heizplatten	HLC HBT 2-132	HLC Biotech, Bovenden
Schüttler	-	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Waage, elektr.	Sartorius CP	Sartorius AG, Göttingen

Tab. 2.1: Bezeichnung und Herkunft der für die Versuche benutzten Geräte bzw. Programme.

2.2 Reagenzien

Soweit nicht anders im Text beschrieben, wurden Reagenzien der folgenden Hersteller verwendet:

Reagenz	**Hersteller**
PCR Kit (Reaktionspuffer, $MgCl_2$, dNTP Mix, Taq DNA Polymerase)	QIAGEN GmbH, Hilden
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA Chemie GmbH, Steinheim
Primer	Siehe Primerdesign
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
PBS Puffer (D-PBS mit $CaCl_2$ und $MgCl_2$)	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Ficoll Lymphozytenseparationsmedium	PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich
Trypanblau	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MACS-Puffer: 500ml PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA (pH 7.2)	Jeweils frisch hergestellt
BSA (Bovine serum albumin)	PAA Laboratories, Pasching, A
Microbeads: Anti-CD4, Anti-CD8, Anti-CD14, Anti-CD19	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
FACS-Antikörper (s. „Antikörper“)	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Trizol (Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNeasy Kit (Mini Spin Columns, Collection Tubes, RNAse-freie Reagenzien und Puffer)	QIAGEN GmbH, Hilden
RNAse-freies DNAse-Kit (DNAse I, RDD-Puffer, Wasser)	QIAGEN GmbH, Hilden
Lachssperma	SIGMA Chemie GmbH, Steinheim
SuperScript II First-Strand Synthese System: Oligo(dt), Random hexamers, 10X RT Buffer, MgCl2, DTT, dNTP Mix, SuperScript II RT, RnaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, E.coli Rnase H, DEPC-treated water, Control RNA, Control Primer A, Control Primer B)	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tab. 2.2: Name und Herkunft der Reagenzien

2.3 Zelllinien

MGAR: Homozygote humane EBV-transformierte B-Zelllinie vom HLA-Typ DRB1*1501
Herkunft: 10th International Histocompatibility Workshop

Namalwa: Humane EBV-infizierte Tumor-B-Zelllinie, die in Suspension wächst und von einem Burkitt-Lymphom abstammt.
Herkunft: ATCC

2.4 Kloniertes EBV DNA - Fragment

BamHI W: Kloniertes Fragment aus der EBNA2-Region von 252bp im Vektor pBR322 stand für Sensitivitätsbestimmungen der PCR bei der EBV-Detektion zur Verfügung.
Herkunft: Prof. Wolf, Max-von-Pettenkofer-Institut, München.

2.5 Patienten und Kontrollen

Für diese Studie wurden sieben Patienten mit Rheumatoider Arthritis aus der Rheuma-Ambulanz des UKT, Innere Medizin, Abt. II (Leiterin Prof. Dr. Ina Kötter) entsprechend dem Ethikvotum Nr. 13/2005V rekrutiert. Diesen Patienten wurde nach Aufklärung und schriftlicher Zustimmung im Rahmen einer Konsultation in der Rheuma-Sprechstunde 40ml Citratblut entnommen, welches anschließend innerhalb von maximal 120min ins Labor gebracht und sofort verarbeitet wurde. Auf zeitnahen Beginn der Versuche wurde streng geachtet, um Lagerungsartefakte zu vermeiden.

2.5.1 Studienteilnehmer der Patientengruppe

Nr.	Geschlecht	Geburtsdatum	Datum der Blutentnahme	Serologischer EBV-Status
P1	w	20.02.1934	10.11.2005	n.t.
P2	w	24.03.1947	13.12.2005	n.t.
P3	w	02.06.1927	16.02.2006	n.t.
P4	w	23.08.1936	04.05.2006	n.t.
P5	w	12.05.1952	10.08.2006	n.t.
P6	w	27.09.1957	17.08.2006	positiv
P7	m	02.12.1933	06.02.2007	positiv

Tab. 2.3: Liste der untersuchten RA-Patienten

2.5.2 Bereits vorhandene Patientenproben, die für die Untersuchungen erneut verwendet wurden

Für die Etablierung der Methoden (s. Ergebnisteil) wurde außerdem bei zehn Proben bereits analysierter PBMC (davon 6 RA-Patienten, 4 Kontrollpersonen) die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und zur Standardisierung der PCR eingesetzt.

Nummer (entsprechend Diplomarbeit A. Respa)	EBV-Status	DNA-Amplifikation Bam HI W	P = Patient K = Kontrolle
DE63	Positiv	+	P
DE23	Positiv	+	P
DE25	Positiv	+	P
DE41	Positiv	+	P
DE51	Positiv	-	P

DE58	Positiv	-	P
DE32	Positiv	+	K
DE35	n.t.	-	K
DE36	Positiv	-	K
DE56	n.t.	+	K

Tab. 2.4: Liste der Patienten und Kontrollpersonen, von denen vorrätige tiefgefrorene Proben vorhanden waren und untersucht wurden.

2.5.3 Studienteilnehmer der Kontrollgruppe

Insgesamt 20 weitere gesunde Personen bildeten die Kontrollgruppe für die Bestimmung der EBV mRNA-Expression. Es wurden analog der Patientengruppe ebenfalls 40ml Citratblut pro Person entsprechend dem Ethikvotum Nr. 13/2005V entnommen. Davon konnten 10 Proben aufgrund ausreichender Zellausbeute für die FACS-Analyse verwendet werden; allerdings musste in diesen Fällen auf die PCR verzichtet werden. In 10 Fällen wurde das Blut nur zur RNA-Isolierung und PCR wie unten beschrieben verwendet. Voraussetzung für die Teilnahme an der Untersuchung war, dass die Kontrollpersonen keine aktuellen oder kurz zurückliegenden Infektionen hatten, sowie keine wesentlichen Grunderkrankungen bekannt waren.

Nr.	Geschlecht	Geburtsdatum	Datum der Blutentnahme	Serologischer EBV-Status
K1	w	20.10.1958	24.08.2005	positiv
K2	m	13.05.1982	01.09.2005	n.t.
K3, K19	m	03.12.1980	15.09.2005 16.01.2007 24.01.2007	n.t.
K4	m	04.09.1981	02.11.2005	n.t.
K5	w	13.09.1980	17.01.2006	n.t.
K6	m	5.12.1985	30.01.2006	n.t.
K7	m	02.08.1982	12.04.2006	n.t.
K8	w	01.10.1980	19.04.2006	n.t.
K9	w	03.07.1981	22.05.2006	n.t.
K10	w	07.07.1980	27.05.2006	n.t.
K11	m	12.03.1980	14.08.2006	n.t.
K12	w	01.01.1978	16.08.2006	n.t.
K13	w	14.09.1981	08.11.2006	n.t.
K14	w	25.06.1979	22.11.2006	n.t.
K15	m	23.10.1980	05.12.2006	n.t.
K16	w	28.06.1984	18.12.2006	n.t.
K17	w	20.10.1958	10.01.2007	n.t.
K18	w	04.07.1981	12.01.2007	n.t.
K20	m	21.12.1973	22.01.2007	n.t.

Tab 2.5: Liste aller gesunden Kontrollpersonen, die an der Studie teilgenommen haben.

2.6 Antikörper

Für die FACS-Analyse wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper von Immunotools, Friesoythe, verwendet.

AK	Klon	Isotyp	Bindung an Zelle	Fluoreszenz-Färbung
Anti-CD4	MEM-241	IgG1	CD4-T-Zellen	PE
Anti-CD8	MEM-31	IgG2a	Zytotoxische T-Zellen	FITC
Anti-CD45	MEM-28	IgG1	CD45+ (T- und B-Zellen)	APC
Isotyp	UBE13	Mouse IgG2a	Kontroll-AK	FITC
Isotyp	PPV-06	Mouse IgG1	Kontroll-AK	PE
Isotyp	PPV-06	Mouse IgG1	Kontroll-AK	APC

Tab. 2.6: Beschreibung der Antikörper, die für die FACS-Färbung benutzt wurden.

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

Komponenten: Vollblut, antikoaguliert mit Citrat
PBS-Puffer
Ficoll-Paque (1,077 Dichte)

Prinzip:
Blutzellen wurden über einen Dichtegradienten geschichtet und in diesem Medium aufgrund ihres unterschiedlichen spezifischen Gewichts durch Zentrifugation in Erythrozyten mit Granulozyten, sowie mononukleäre Zellen (PBMC, sichtbar als „Zellring“) aufgetrennt.

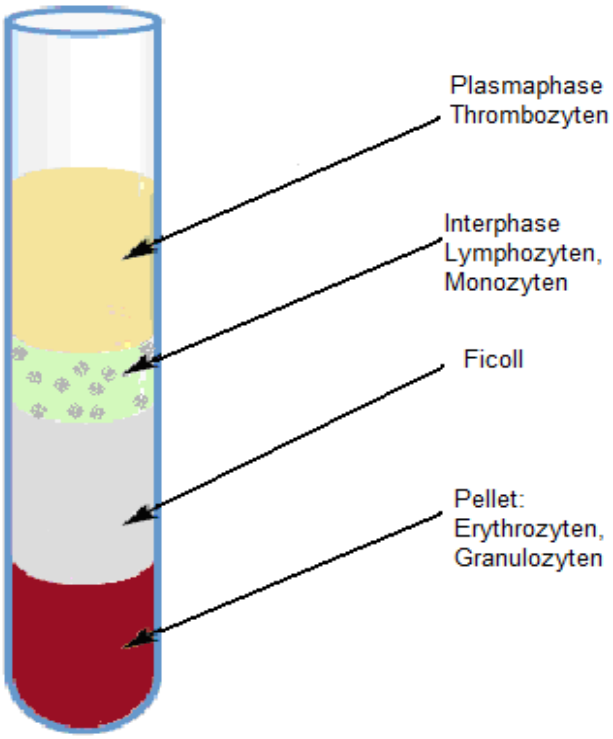


Abb. 2.1: Lymphozytenisolierung mittels Ficoll-Gradient

PBMC wurden durch vorsichtiges Abpipettieren des Rings und Verwerfen des darüberliegenden Serums mit Thrombozyten gewonnen.

Vorgehensweise:

Von 7 RA-Patienten bzw. 20 gesunden Kontrollpersonen wurden 40ml Blut in Citrat-Röhrchen abgenommen.

Das Vollblut wurde im Verhältnis 1:2 mit PBS-Puffer (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}) gemischt: und dann auf drei Falcon-Röhrchen verteilt, die mit je 15ml Ficoll-Gradient befüllt worden waren. Das verdünnte Blut wurde so über den Ficoll geschichtet, dass sich die Zellen nicht mit dem Gradienten vermischten. Nach Zentrifugation ohne Bremse bei 900g für 20min bei Raumtemperatur reicherten sich Lymphozyten und Monozyten vom Plasma getrennt als weißlicher Ring über dem Ficoll gelagert an und konnten abpipettiert werden. Die abpipettierten

Zellen wurden in einem Röhrchen vereinigt und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen (10min, 250g, ohne Bremse). Nach dem ersten Waschschritt wurde die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer (s.u.) bestimmt.

2.7.2 Bestimmung der Zahl und Vitalität der Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl aus der Zellprobe entnommen, 1:1 mit 10 µl Trypanblau verdünnt und auf die mit einem Deckglas bedeckte Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die vorhandenen Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop in 16 Feldern bei 100facher Vergrößerung ausgezählt und hinsichtlich ihrer Aufnahme von Trypanblau beurteilt. Folgendermaßen berechnete sich die Zellzahl:

$$n \times Vol. \times 2 \times 10^4 = Gesamtzellzahl$$

n= die in den 16 Feldern gezählte Zahl; Vol.= Suspensionsvolumen in ml;
2 = Verdünnungsfaktor (Anfärbung); 10^4 = Vol.-Faktor der Neubauer-Kammer

Durch Trypanblau wurden nur tote Zellen angefärbt, sodass durch die Färbung gleichzeitig die Vitalität der isolierten peripheren mononukleären Zellen bestimmt werden konnte. Üblicherweise lag sie bei den isolierten PBMC bei über 95 % lebender Zellen.

2.7.3 Zelltrennung mit Hilfe der MACS (Magnetic Cell Separation)-Technologie

Komponenten: Antikörper-tragende Microbeads
MACS-Säulen
MACS-Separator
MACS-Puffer (PBS mit 2mM EDTA und 0,5% BSA)

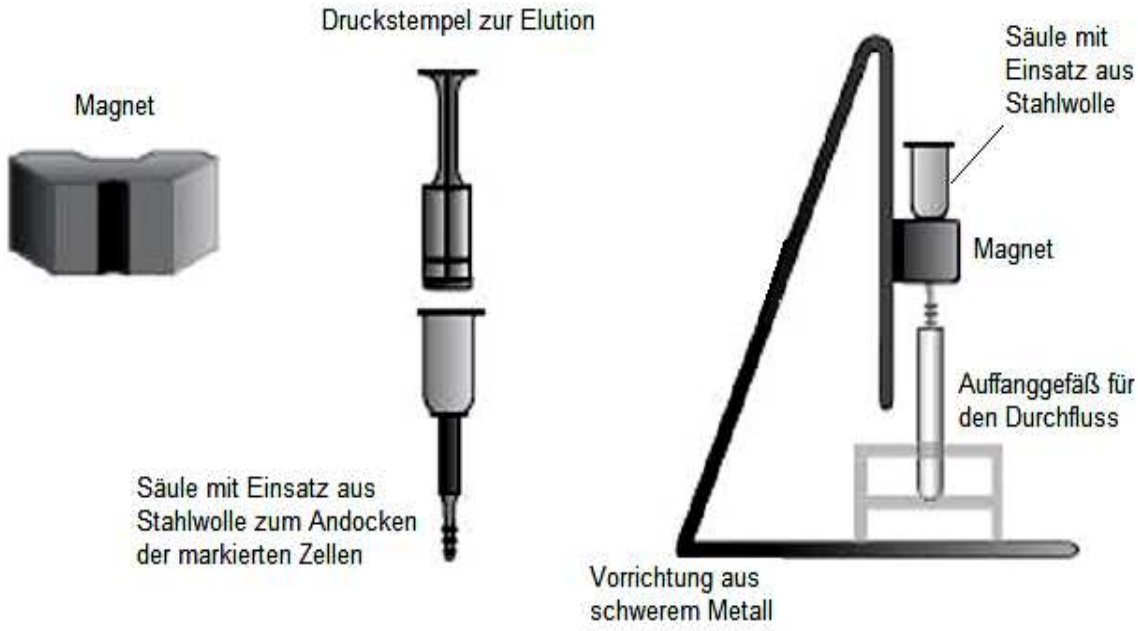


Abb. 2.2: Komponenten des MACS-Systems

Prinzip:

Das Magnetic Activated Cell Separation (MACS) Verfahren erlaubte eine positive bzw. negative Selektion von vitalen Zellen mit unterschiedlichen Oberflächenmerkmalen (CD) aus einer heterogenen isolierten PBMC-Suspension. Für die Aufreinigung von CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+ PBMC wurden Microbeads der Firma Miltenyi verwendet, die einen Eisenkern aufwiesen und an die spezielle monoklonale Antikörper gegen die entsprechenden Oberflächenantigene auf Blutzellen gekoppelt waren. Damit war es möglich, Zellen, die mit antikörper-gebundenen Mirobeads markiert worden waren, in einem Magnetfeld spezifisch festzuhalten bzw. abzutrennen und somit positiv zu selektieren.

Zunächst wurde die Zellprobe für die Isolierung einer spezifischen Population mit den entsprechenden Microbeads versetzt. Danach wurden die Zellen auf die MACS-Säule aufgetragen. Markierte Zellen blieben in der Säule hängen, während alle unmarkierten durch die Säule hindurchliefen, wenn die Säule in den MACS-Separator (Magnet) plaziert wurde. Die Säule, die mit Stahlwolle

überzogen und von einem starken Magneten umgeben war, hielt durch Magnetisierung die jeweils markierten Zellen zurück. Sofern die Zellen frei und nicht verklumpt einzeln in der Suspension vorgelegen hatten, banden sie jetzt mittels ihrer Eisen-enthaltenden Microbeads innerhalb des Magnetfelds an die Säule, während sich der Rest im Durchfluss wiederfand. Die Säule konnte dann aus dem Magnetfeld entfernt und die gebundenen Zellen durch mehrmalige Zugabe von MACS-Puffer unter vorsichtigem Druck mit einem Stempel eluiert werden. Alle Zellen im Durchfluss, die nicht markiert und negativ selektiert worden waren, konnten mit anderen antikörper-gebundenen Microbeads zur positiven Abtrennung der nächsten spezifischen Zellpopulation markiert werden, bis alle gewünschten Zelltypen getrennt vorlagen und ein letzter Durchfluss mit Resten aller Populationen übrig blieb.

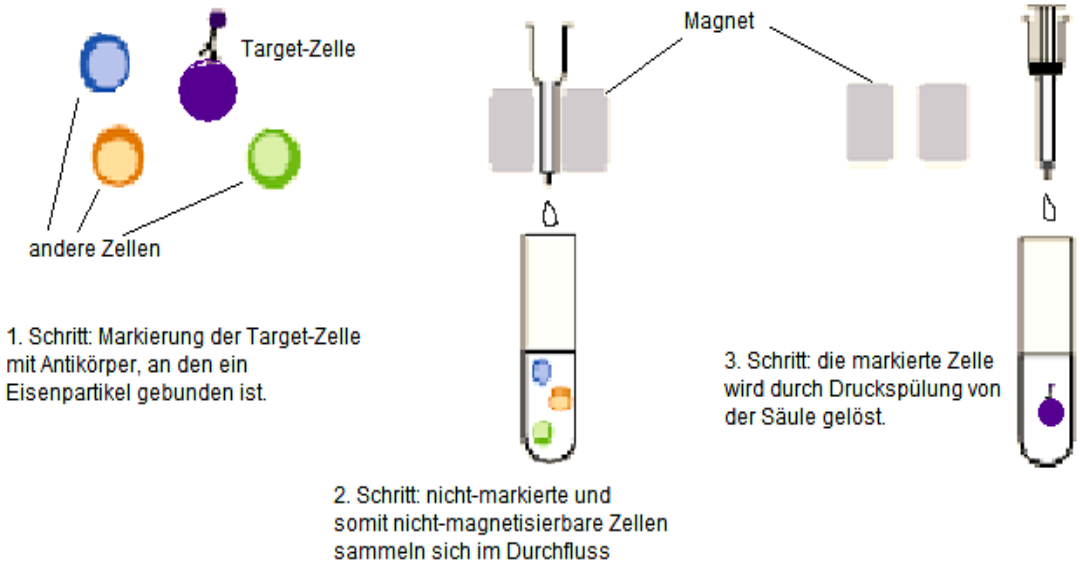


Abb. 2.3: Prinzip der positiven Selektion: die Target-Zelle wird mit einem Antikörper (Bead) markiert, der an ein eisenhaltiges-Partikel gebunden ist. Durch diese Bindung wird die markierte Zelle magnetisierbar und kann innerhalb eines Magnetfelds (mittleres Bild) an der Stahlwolle in der Säule haften.

Die MACS-Säule hatte eine Kapazität von maximal 10^7 Zellen. Bei Auftrag einer größeren Anzahl von Zellen musste mit einer geringeren Ausbeute und Reinheit der positiv selektionierten Populationen gerechnet werden, da ein Teil auch der markierten Zellen in der Säule nicht mehr festgehalten wurde und in den Durchfluss lief.
Die Zellseparation erfolgte, wenn auch laut Herstellerprotokoll nicht notwendig, unter der Sterilbank.

Vorgehen:
Die aus Blut isolierten Lymphozyten und Monozyten (PBMC) wurden nach dem zweiten Waschen in MACS-Puffer resuspendiert, nochmals gewaschen und zum Schluss in 80 µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen aufgenommen.
Anschließend wurden folgende Zellseparationen sequentiell durchgeführt:

A) CD4+ Lymphozyten

Die in entsprechender Menge MACS-Puffer (s.o.) resuspendierten PBMC wurden mit je 20 µl Anti-CD4-Microbeads pro 10^7 Zellen versetzt.
Die Inkubation erfolgte zuerst für 10 min bei 4℃ i m Kühlschrank, dann für 10 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur.
Währenddessen wurde das MACS-System durch Vorwaschen der Säule mit 500 µl MACS-Puffer vorbereitet. Die Säule konnte aufgrund ihres „Flow-stop“-Mechanismus nicht trockenlaufen. Sie wurde in der Halterung des Permanentmagneten befestigt, der seinerseits an der metallenen Halterungswand des Systems haftete. Unter der Säule befand sich ein Falcon-Röhrchen, das den Durchfluss auffangen sollte.
Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 5 ml MACS Puffer zur Entfernung der ungebundenen Microbeads gewaschen, zentrifugiert (10 min, 250g, ohne Bremse) und in 500 µl MACS Puffer erneut resuspendiert.
Die markierte Zellsuspension wurde nun vorsichtig in einzelnen Tropfen mit der Pipette auf die Säule gegeben. Danach musste die Säule mit 3 x 500 µl Puffer

zusätzlich nachgewaschen werden, sodass schließlich die ungebundenen Zellen (Zellgemisch abzüglich positiv separierter CD4 positiver Lymphozyten) in 2000 µl Durchfluss aufgefangen wurden.
Zur Elution der gebundenen Zell-Fraktion wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein weiteres Falcon-Röhrchen aufgesetzt. 500 µl Puffer wurden nun mit dem mitgelieferten Stempel vorsichtig durch die Säule gedrückt, und dieser Vorgang dreimal wiederholt. Die eluierten Zellen wurden gezählt und im Kühlschrank aufbewahrt, bis auch alle folgenden Fraktionen separiert vorlagen.

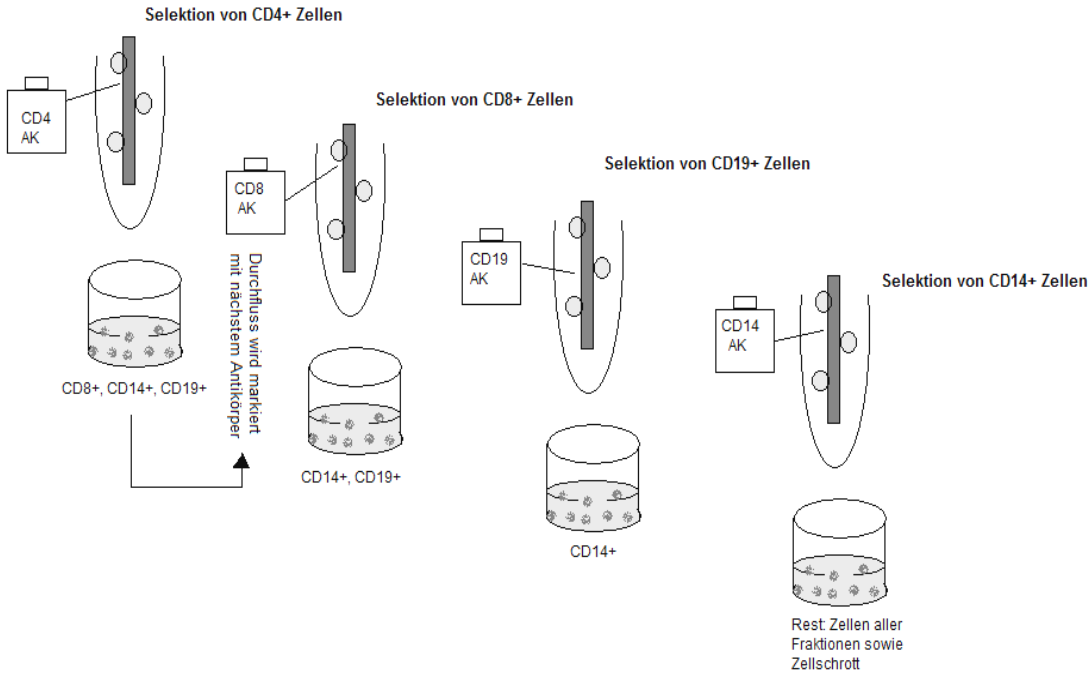
B) CD8+ Lymphozyten

Die nächste Separation CD8+ Lymphozyten wurde mit den Durchflusszellen durchgeführt. Dazu wurde in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl im ersten Durchfluss bestimmt und dementsprechend die Menge der nächsten anti-CD8-Antikörper-gebundenen Microbeads errechnet und angepasst.
Generell wurden wiederum 20 µl Microbeads pro 10^7 Zellen hinzugefügt. Die Inkubation, Waschprozeduren, Auffangen des zweiten Durchflusses und spezifische Elution der CD8 markierten Zellen erfolgte wie unter A) beschrieben.

C) Weitere Zellseparationen

Mit dem zweiten Durchfluss der anti-CD8 MACS Säule wurde eine weitere Separation durchgeführt. Dazu wurde die enthaltene Zellzahl bestimmt und die Zellen mit anti-CD19-Microbeads zur Abtrennung von B-Zellen markiert. Danach erfolgte das gleiche Procedere der Separation. Im folgenden Schritt wurde der dritte Durchfluss mit Anti-CD14-Microbeads markiert, um Monozyten-/Makrophagenpopulationen zu erhalten. Der letzte Durchfluss blieb danach unmarkiert; hier noch enthaltene Zellen wurden als Kontrolle in den weiteren Untersuchungen verwendet.

Als Resultat der Separation lagen Zellfraktionen aufgetrennt nach Expression von CD4, CD8, CD14 und CD19 sowie ein letzter, gemischter Durchfluss vor. Für die weitere Analytik wurden die Zellen abzentrifugiert, in Eppendorf-Cups überführt und bei –70℃ tiefgefroren. Sie standen j etzt zur RNA-Isolierung zur Verfügung. Im Falle ausreichender Zellzahlen wurden Zellen direkt zur FACS-Analyse und Kontrolle der Reinheit verwendet. In einigen Fällen wurden die Zellen nach dem FACS Staining über Nacht in Formalin fixiert bei 4℃ aufbewahrt, was nicht zu wesentlichen Qualitätseinbußen der Fluoreszenzmarkierung führte. Es wurde hierzu eine 2%ige Formalinlösung verwendet, d.h. zu 196µl Waschpuffer wurden 4µl Formalin pro Probe zugegeben und kurz gevortext. Nach 30min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Formalin durch zweimaliges Waschen wieder entfernt und das Pellet in 200µl FACS-Puffer resuspendiert.



.

Abb. 2.4: In den Versuchen wurde die dargestellte Reihenfolge der Selektion gewählt. Die isolierten Zellen wurden zuerst mit Anti-CD4- Beads markiert, so dass CD8+, CD14+ und CD19+ Zellen den Durchfluss bildeten. Dieser wurde mit Anti-CD8-Beads markiert, der nächste Durchfluss mit Anti-CD19-Beads usw. Im letzten Durchfluss, der theoretisch keine Zellen enthalten sollte, befanden sich geringe Mengen aller vier Fraktionen sowie Zellschrott.

2.7.4 RNA-Isolierung

Komponenten:

Trizol, Chloroform, Ethanol 70 %

Rneasy Kit (Quiagen®) mit: RNEasy Columns
RW1 Waschpuffer
RPE Puffer
DEPC-Wasser
DNAse-Puffer und DNAse I

Tris-EDTA und Lachssperma zur photometrischen Messung

Prinzip:

Die Gewinnung von RNA aus den isolierten Zellproben geschah im Two-Step-Verfahren, bei dem in einem ersten Schritt mit Trizol alle nicht-nukleinsäurehaltigen Anteile der Zellen aufgeschlossen wurden. DNA und RNA blieben dabei integral erhalten. In einem zweiten Schritt wurde die Auftrennung in eine obere wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthielt und eine untere Phase aus Zellschrott erreicht. Die weitere Aufreinigung von RNA aus der oberen Phase geschah durch Zugabe von Ethanol, der die DNA präzipitierte. Mithilfe der im Kit enthaltenen Reagenzien konnte dann die RNA an die Säulen gebunden und daraufhin eluiert werden. Photometrisch wurden zum Schluss Ertrag und Reinheit festgestellt.

Vorgehensweise:

Für die RNA-Isolierung wurden MACS-separierte Zellen verwendet, entweder direkt im Anschluss an die Separation oder nachdem sie sofort nach Separation bei –70℃ gelagert worden waren.

Zur Vorbereitung wurden die Zellen (pro Probe bis zu 10 x 10^6 Zellen) kurz in flüssigem Stickstoff gefrostet, um die Zellmembran aufzubrechen, dann mit 1 ml Trizol pro Probe vermischt, auf Raumtemperatur gebracht und gevortext, bis sie vollständig gelöst waren. Nach weiteren 5 min auf dem Schüttler wurde den Proben je 200 µl Chloroform zugegeben und erneut geschüttelt. Daraufhin

wurden die Proben zentrifugiert (4℃, 15min, mit 10 000g), so dass Trizol und Zellschrott die unteren Phasen bildeten, und die wässrige Phase, die die RNA/DNA enthielt, oben abpipettiert werden konnte.
Mit dieser Lösung wurde dann gemäß Hersteller-Protokoll, wie im Folgenden beschrieben, verfahren. Hierfür wurden Rneasy-Säulchen, die im unteren Teil eine Silica-Membran besitzen, eingesetzt.

Zur DNA/RNA enthaltenden wässrigen Phase wurde 1 x Vol. Ethanol zum Ausfällen der DNA mit der Pipette vorsichtig zugemischt und das Gemisch auf das Säulchen gegeben. Dabei durften nur jeweils maximal 700 µl aufgetragen werden, so dass meist in zwei Schritten aufgetragen werden musste. Nach 15-sekündigem Zentrifugieren bei 14000g („short spin“) wurde das Eluat verworfen und das Säulchen in dasselbe Cup wieder eingesetzt (bzw. an dieser Stelle mit dem restlichen Ethanolgemisch gleichermaßen behandelt).
Danach wurden die Proben mit 350 µl RW1 Puffer versetzt und 1 min bei 14000g zentrifugiert.
Um möglichst reine RNA zu erhalten und in der PCR keine falschen Amplifikate zu produzieren, wurde danach DNA, die noch auf der Säule gebunden war, mit DNAse verdaut. Dazu wurden in 70 µl Puffer 10 µl DNAse I vorsichtig eingemischt und auf die Säulchen gegeben. Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde wieder, s. o., mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen.
Es folgten zwei Wasch- und Trocknungsschritte mit Zugabe von 500 µl RPE Puffer und anschließender Zentrifugation für 15 sec bei 14000g.
Danach sollte nur noch die RNA in bestmöglicher Reinform an die Säule gebunden sein. Mit 40 µl RNAse-freiem Wasser wurde durch Inkubation der Proben (5 min bei Raumtemperatur) und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 14000g die RNA von der Säule gewaschen. Dieser Elutionsschritt wurde, ohne Inkubation, einmal wiederholt, sodass schließlich die gewonnene RNA in 80 µl Wasser gelöst war.
Menge und Reinheit der RNA wurden am Photometer bei einer Absorption von 260nm gemessen. Die isolierte RNA wurde hierzu mit Tris-EDTA im Verhältnis 1:20 verdünnt und die Messung mit einer Positiv-Probe (Lachssperma),

ebenfalls in einer Verdünnung von 1:20, kontrolliert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei –70℃ eingefroren.

2.7.5 RT-PCR

2.7.5.1 Herstellen von cDNA

Die Herstellung von cDNA wurde mithilfe des Superscript II First-Strand Synthesis System (Invitrogen®) Kits durchgeführt.

Kit-Komponenten:
- dNTP-Mix
- Oligo(dt)
- DEPC-H_20 (RNAse-frei)
- RT X Puffer
- $MgCl_2$
- 0,1 mM DTT
- RNase OUT Rekombinant Rnase Inhibitor
- Superscript II Reverse Transkriptase
- RNase H

Eingesetzte RNA: bis zu 5µg

Prinzip:

Die zuvor isolierte RNA-Stränge diente bei der Umschreibung in cDNA und nach Zugabe von entsprechenden Nukleotiden (dNTP-Mix) als Template für das Enzym Reverse Transkriptase (RT). Diese reverse Transkription hemmte eine RNA-zerstörende Wirkung von möglicherweise enthaltenen RNAsen. Durch Verwendung von Oligo(dt) als spezifische Primer mit Hybridisierung von 3'-Poly-A-Schwänzen sollte eine höhere und spezifischere Ausbeute von mRNA, und weniger tRNA und rRNA, erreicht werden.

Vor Durchführung spezifischer PCR-Reaktionen wurde ein Rnase H-Verdau durchgeführt, um RNA-Templates in der zu cDNA umgesetzten Probe restlos zu entfernen.

Vorgehensweise:
Die zuvor gewonnene RNA wurde gegebenenfalls portioniert, so dass eine Menge von max. 5µg für die Umschreibung in cDNA zur Verfügung stand. Diese Probe wurde dann in der Vakuum-Zentrifuge auf ein Volumen von max. 8µl eingeengt und mit 1µl dNTPs (10mM) und 1µl Oligo(dt) (0,5 µg/µl) versetzt. Gegebenenfalls wurde mit DEPC auf 10 µl Gesamtvolumen eingestellt. Die Proben wurden für 5min bei 65℃ inkubiert und dann mit einem Mix aus 2µl RT X Puffer, 4µl 25mM $MgCl_2$, 2µl 0,1 mM DTT und 1µl RNaseOUT vorsichtig vermischt. Nach 2min Inkubation bei 42℃ wurde in j ede Probe 1 µl Superscript Reverse Transkriptase gegeben und eine Inkubation bei 42℃ für 50min durchgeführt. Die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde dann durch Erhitzen auf 70℃ während 15min gestoppt, anschließend die P roben auf Eis gelegt. Zur vollständigen Zerstörung der Template-RNA wurde 1 µl Rnase H jeder Probe zugegeben und bei 37℃ 20min lang inkubiert.
Das gewonnen cDNA-Produkt wurde daraufhin entweder sofort für die PCR-Reaktion mit EBV-spezifischen Primern eingesetzt oder bei –20℃ gelagert.

2.7.5.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis spezifischer Transkripte von EBV-Genen

Für den weiteren Nachweis der EBV-Gen Transkription wurden die in cDNA umgeschriebenen mRNA Proben in spezifischen Polymerase-Ketten-Reaktionen eingesetzt.

Prinzip:
Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine von K. Mullins 1984 entwickelte Methode zur Amplifizierung von DNA in Temperaturzyklen mithilfe eines

spezifischen Primer-Paares und der zugegebenen Taq Polymerase. Während des zyklischen Ablaufs werden die Proben im PCR-Gerät nacheinander auf zwei verschiedene Temperaturen erhitzt. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang bei einer hohen Denaturierungstemperatur aufgetrennt. Danach lagern sich die Primer bei einer niedrigeren Annealingtemperatur an komplementäre Sequenzen des Sense- bzw. Antisense-Strangs an, und die Polymerase synthetisiert entlang der Matrizenstränge jeweils einen neuen Strang, der neue Doppelstrang wird wieder getrennt usw. So kann mit jedem PCR-Zyklus eine exponentiell wachsende Zahl von Amplifikaten erzeugt werden.

Der Reaktionsansatz enthielt die aus zuvor isolierter RNA durch Umschreibung gewonnene cDNA, einen Reaktionspuffer, der den pH-Wert konstant hielt, sowie alle vier Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) in desoxygenierter Triphosphatform im Überschuß. Bei der eingesetzten Polymerase aus dem Bakterium Thermophilus aquaticus (Taq) handelte es sich um die sog. Gold-Taq-Polymerase, mit der ein “Hot Start” der PCR erreicht wird und unspezifische frühzeitige Anlagerungen der Primer nicht zu unspezifischen Amplifikaten führen. Vor Beginn der PCR ist die Gold-Taq-Polymerase durch Antikörper noch inhibiert, deren Blockade bei der ersten hohen Temperatur aufgehoben wird. Mg^{2+}-Ionen werden der Polymerase als Cofaktor zugegeben. Die beiden „forward“ und „reverse“ Primer sollten optimal eine Länge von ca. 15-30 Basen aufweisen und dem Polymerase-Enzym als Startstelle für die Synthese des neuen Komplementärstrangs in 3’5’-Richtung dienen.

Vorgehensweise:

Der Reaktionsansatz („Mastermix“) einer PCR wurde jedes Mal frisch hergestellt. Er musste folgende Komponenten enthalten:

10 x PCR Reaktionspuffer	5µl
$MgCl_2$	6,5µl
dNTP (25mM)	0,2µl
Gold Taq Polymerase (5U/µl)	0,2µl
Primer forward (10pmol/µl)	2µl
Primer reverse (10pmol/µl)	2µl
H_2O	29,6µl
DMSO (5%)	2,5µl
Eingesetze DNA (250-300ng)	2µl
	50µl

Der Mastermix für β-Actin unterschied sich in der Zusammensetzung:

10 x PCR Reaktionspuffer	5µl
dNTP (25mM)	0,4µl
Gold Taq Polymerase (5U/µl)	0,25µl
Primer forward (10pmol/µl)	1,5µl
Primer reverse (10pmol/µl)	1,5µl
H_2O	36,85µl
DMSO (5%)	2,5µl
Eingesetze DNA (250-300n	2µl
	50µl

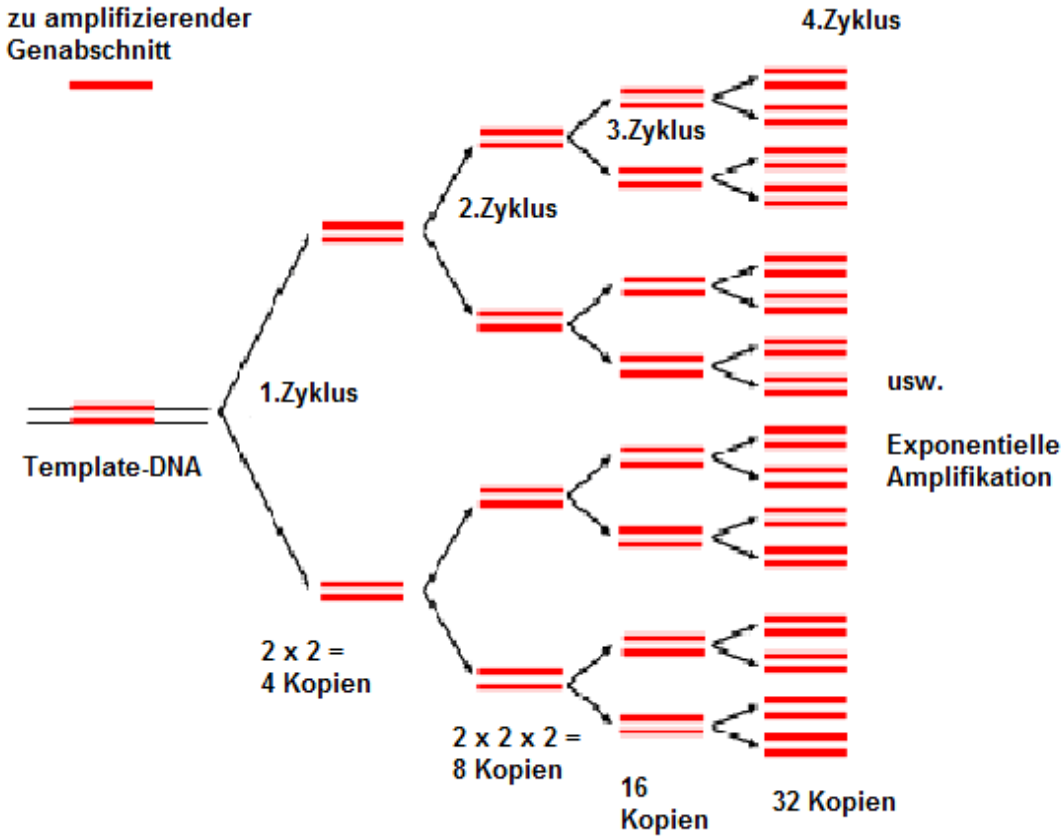


Abb. 2.5: Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird ein ausgewählter Genabschnitt exponentiell vervielfältigt in dem spezifische Primer an der Template-DNA binden und durch DNA-Polymerase ein neuer Strang gebildet wird. Dieser Doppelstrang wird wieder gespalten und dient erneut als Template. Abhängig von der Zahl der PCR-Zyklen entstehen so Kopien des Genabschnitts in hoher Zahl.

Das in dieser Arbeit für den Nachweis von EBV-Genen verwendete PCR-Protokoll war in früheren Arbeiten wie folgt optimiert worden:

Denaturierung („Hot Start“)	95℃	7min
		} 26 Zyklen
Denaturierung	95℃	45sec
Annealing	68℃	45sec

Der PCR-Zyklus begann mit der Denaturierung der doppelsträngigen cDNA. Dabei werden die Proben initial 7min lang bei 95℃ erhitzt („melting“) – aus dem Doppelstrang wurden zwei Einzelstränge. Es folgten 26 Zyklen aus 45 sec Denaturierung bei 95℃, 45sec Primeranlagerung („an nealing“) bei 68℃ – bei diesem Schritt wurde die Temperatur in jedem Zyklus um 0,2℃ erniedrigt → letzter Zykus mit 63℃ – und ein Extensionsschritt für je 30sec bei 72℃, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Nach 26 derartigen Zyklen folgten weitere 20 Zyklen mit leicht veränderten Zeit-/Temperaturwerten: Denaturierung bei 95℃ für 15 sec, Annealing bei 62℃ für 45 sec, dabei Temperatursenkung um 0,1℃ je Zyklus und die Extension des Komplement ärstrangs bei 72℃ für 30 sec.
Zum Schluss fand ein Extensionsschritt von 5min bei 72℃ statt. Die Proben wurden daraufhin bei 8℃ gekühlt.

Primer:

Herkunft und Sequenz der Primer, die zum Nachweis von Transkripten der EBV-Gene EBNA1, EBNA2, EBER1, BZLF1, BMLF1, BamHI W, LMP, sowie von β-Actin verwendet wurden, sind in der folgenden Tabelle beschrieben. Für die Gene BZLF1, LMP1 und β-Actin wurden die Primer Intron-überspannend gewählt, so dass sich an der Länge des Produktes unterscheiden ließ, ob die Amplifikate aus viraler DNA oder mRNA generiert wurden.

Gen	**5' – 3'**	**Position**	**bp**	**T (℃)**	**Herkunft**
Bam HI W P1	GAA TAA GCC CCC AGA CAG GG	977-996	252	56	Prof. Dr. Wolf, Max-von-Pettenkofer-Institut
P2 (unspliced)	AGG GCT AGG GAG AGG TAG AA	1210-1229		54	
BZLF-1 P1	GAC CTC ACG GTA GTG CZG CA	102423-102442	297 (172)	56	Edinger et al. 1999 J.Immuno.162: 3694-3701
P2 (spliced)	TTC CAC AGC CTG CAC CAG TG	102700-102719		56	
BMLF-1 P1	TAG TCT CGC GTG TTA GGA AGG	83098-83118	172	54	Edinger et al. 1999 J.Immuno.162: 3694-3701
P2 (unspliced)	TGG CCA TGC TAG AAG AGA CC	83250-83269		54	
EBNA1 P1	AGG TAC AGG ACC TGG AAA TG	107967-107986	236	52	Edinger et al. 1999 J.Immuno.162: 3694-3701
P2 (unspliced)	TCC CTT TGC AGC CAA TGC AA	108183-108202		52	
EBNA2 P1	ACC ACG GTC CCC GAC TGT AT	49328-49347	198	56	Respa A., 2005 Diplomarbeit im Fach Biologie
P2 (unspliced)	CGG CTC TGG CCT TGA GTC TT	49506-49525		56	
EBER1 P3	AGG ACC TAC GCT GCC CTA GA	6629- 6648	167	56	Edinger et al. 1999 J.Immuno.162: 3694-3701
P4 (unspliced)	AAA ACA TGC GGA CCA CAA GC	6776- 6795		54	
LMP1 P3	CAA GTA AGC ACC CGA AGA TG	169042-169061	194 (117)	52	Respa A., 2005 Diplomarbeit im Fach Biologie
P4 (spliced)	TGG AGC CCT TTG TAT ACT CC	169216-169235		52	
β-Actin P1	TCAGAAGGATTC CTATGTGGGC	1368- 1389	757 (317)	55	Haris DE et al. 1992 Gene.112(2) : 265-266
P2 (spliced)	CCATCACGATGC CAGTGGTA	2105- 2125		54	

Tab. 2.7: Beschreibung der Primerpaare, die in den PCRs zum Einsatz kamen.

2.7.6 Durchflusszytometrie

Um die Reinheit der separierten Zellfraktionen zu testen, wurde eine FACS-Analyse mit dem Gerät BD LSR II der Firma BD Biosciences durchgeführt. Dieses Gerät war mit vier Lasern zur Fluoreszenzanregung bestückt (Feststoff-Laser mit 355nm, Dioden-Laser mit 405nm, Feststoff-Laser mit 488nm und Helium-Neon-Laser mit 633nm). In der Arbeit wurden die Standard-Fluorochrome FITC, PE und APC eingesetzt. Als zu markierende Oberflächenantigene wurden entsprechend der zu analysierenden Zellfraktionen die Oberflächenantigene CD4, CD8 und CD45 überprüft. Die Auswertung fand mithilfe der Software „BD FACS Diva“ statt.

2.7.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Das FACS-Gerät ist ein optisches System, das die Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Streu- oder Fluoreszenzlicht nach Anregung mit einem oder mehreren Lasern ermöglicht. Eine Suspension von Zellen wird dabei durch einen Hüllstrom beschleunigt und in einer Sequenz von Einzelzellen (quasi im „Gänsemarsch“) am Laserstrahl vorbeigeführt. Gemessen wird am gemeinsamen Fokus des Probenstroms und des Laserstrahls – wobei einerseits physikalische Eigenschaften der Zelle bestimmt werden (Größe, Granularität, Quantität), andererseits bereits molekulare Eigenschaften wie die Menge gebundener, mit Fluorochrom markierter Antikörper und der DNA-Gehalt einer Zelle bestimmt werden können. Das Signal für den Messapparat ist dabei die Fluoreszenz, zu der die Zelle angeregt wird. Zellen, sowie jegliche andere in der Probe enthaltene Partikel haben bereits unmarkiert eine Eigenfluoreszenz, die im sog. Forward Scatter und im sog. Side Scatter (s.u.) erfasst wird. Zur speziellen Analyse wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt, deren spezifisches Signal vom FACS-Gerät gleichzeitig registriert wurde.

Der rechtwinklig zum Probenfluss angeordnete Laserstrahl misst die Zahl der „Ereignisse“, wobei die Zellsuspension mit einer einstellbaren Geschwindigkeit zwischen 200 bis 2000 Ereignissen/min (und zum Teil noch höher) vorbeiströmt. In dem Moment, in dem eine Zelle den Messpunkt passiert, wird die Lichtstreuung in einem engen Winkel zum Laserstrahl als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und in einem Winkel von 90° als Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) erfasst. Ersteres ist im Wesentlichen ein Maß für die Größe der Zellen. Das SSC ist vor allem durch intrazelluläre Strukturen, die eine komplexe Mehrfachstreuung verursachen, bedingt. Somit ermöglicht es Aussagen über die Granularität der Zelle. Durch FACS- Antikörper, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind und die Zellen spezifisch markieren, können spektral unterschiedliche Lichtemissionen registriert werden. So kann eine exakte Identifikation und quantitative Bestimmung der markierten Zellfraktion erfolgen. Durch den sog. Threshold wird ein Parameter während der Messung eingesetzt, der bei der Unterscheidung zwischen echten „Ereignissen“, also Zellen, und nicht näher definierbaren Partikeln, die ein ständiges Hintergrundrauschen verursachen würden, unterscheidet.

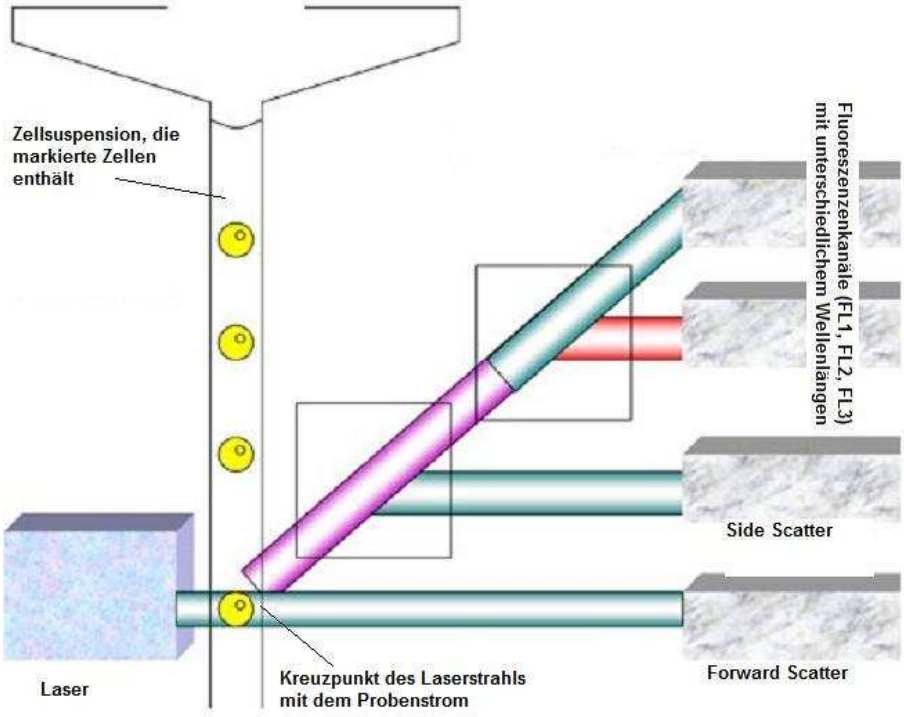


Abb. 2.6 : Durchflusszytometrie – Aufbau des optischen Systems.

Die Differenzierung der Zellen am FACS erfolgt aufgrund spezifischer Oberflächenmerkmale, an die Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper gebunden wurden. Zur Bestimmung der Zellart werden die oben genannten Antikörper verwendet. Die in der Durchflusszytometrie verwendeten „Farben" der Antikörper sind Fluorochrome, die einen spezifischen Teil der Lichtenergie des Lasers absorbieren und Licht einer höheren Wellenlänge emittieren.

2.7.6.2 Vorgehensweise

Die Zellen lagen eingefroren mit DMSO bei –80℃ in Cryo-Röhrchen vor. Sie wurden im Wasserbad aufgetaut, in je 10 ml kaltem RPMI (mit 10% FCS) in Falcon-Tubes aufgenommen, 10min bei 250g zentrifugiert, resuspendiert in PBS und anschließend gezählt. Während des gesamten Stainings wurde die Zentrifuge auf 4℃ gekühlt. Es folgten zwei weitere Waschgänge mit FACS-Waschpuffer (PBS mit BSA 0,1% und Na-Acetat 0,0025%); dieser wurde auch für alle folgenden Waschungen verwendet. Daraufhin erfolgte die Inkubation während 15min auf Eis mit Polyglobin, das in der Menge von 40µl pro 1 Mio Zellen pro ml Puffer zugegeben wurde. Das Polyglobin wurde wiederum in zwei Waschschritten ausgewaschen und die Zell-Pellets nach Resuspension auf die Konzentration von $1x10^6$ Zellen/ml Puffer eingestellt. Für die zu analysierenden Zellfraktionen wurden je 200.000 Zellen in die einzelnen Wells pipettiert. Zudem wurde für jeden direkt markierten spezifischen Antikörper eine Ig-Isotypkontrolle mit entsprechendem Fluorochrom durchgeführt. Für die Kompensation wurde außerdem von jeder Fraktion eine unmarkierte Probe benötigt; um die Überlappungsbereiche der Emissionsspektren zu berechnen, wurden spezielle Beads („CompBeads", BD) verwendet (s. 7.6.4), die mit den in der Messung benutzten Fluorochromkonjugaten als Einzelfärbung markiert wurden.

Folgende Markierungen wurden durchgeführt:

CD4+-Fraktion mit PE-AntiCD4-AK
CD4+-Fraktion dreifach* (PE, FITC, APC)
CD8+-Fraktion mit FITC-AntiCD8-AK
CD8+-Fraktion dreifach* (PE, FITC, APC)
Beide Fraktionen (CD4+, CD8+) mit APC-AntiCD45-AK
* nur bei ausreichender Zellzahl

Isotypkontrollen:
CD4+-Fraktion mit IsoPE-AK
CD8+-Fraktion mit IsoFITC-AK
CD4+ und/oder CD8+Fraktion mit IsoAPC-AK*
* nur bei ausreichender Zellzahl

Kompensation:
CompBeads (Anti-Maus-Igκ) mit PE-Konjugat (Anti-CD4)
CompBeads (Anti-Maus-Igκ) mit FITC-Konjugat (Anti-CD8)
CompBeads (Anti-Maus-Igκ) mit APC-Konjugat (Anti-CD45)
Je Fraktion eine ungefärbte Probe

Die direkt markierten Antikörper wurden nach Empfehlung des Herstellers unverdünnt in der Menge von 10µl pro 200.000 Zellen auf die Wells pipettiert und auf Eis im Dunkeln für 15 min inkubiert.
In drei Waschschritten mit FACS-Puffer und nachfolgender Zentrifugation (5min, 250g) wurden die Antikörper wieder ausgewaschen und die Zellpellets in 200µl pro Well resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Röhrchen übertragen und am FACS vermessen.
Wenn die FACS-Analyse nicht sofort im Anschluss an die Markierung erfolgte, wurden die Zellen nach dem letzten Waschschritt mit Formalin fixiert (s. 7.3) und bei 4℃ maximal 24h gelagert.
Als Negativkontrollen für unspezifische Bindung wurden Mausantikörper eingesetzt, die in ihrer Ig-Subklasse und dem gebundenen Fluorochrom den

verwendeten monoklonalen fluoreszenzgefärbten Antikörpern gegen definierte Oberflächenantigene (z.B. CD4) auf humanen Zellen entsprachen.
Als Positivkontrollen dienten die Einfachfärbungen der einzelnen Fraktionen (z.B. CD4+-Fraktion mit PE-AntiCD4-AK).
Für die genaue Beschreibung der verwendeten Fluorochromkonjugationen siehe auch 2.6.

2.7.6.4 Messung und Datenauswertung

Kompensation:
Da sich die einzelnen Fluoreszenzen in ihren Emissionsspektren überlappen, musste der Fehler („Mischsignale“) vorher korrigiert werden, so dass für jeden eingesetzten Farbstoff nur in einem definierten Lichtwellenbereich ein Signal registriert wurde. Für die Durchführung der Kompensation am FACS-Gerät, im Vorfeld jeder Analyse, wurden Beads (Anti-Maus-Igκ „CompBeads“, BD) benutzt, die mit dem entsprechenden fluorochromkonjugierten Antikörper (PE, FITC, APC) einfach gefärbt worden waren. Außerdem wurden ungefärbte Zellen der einzelnen Fraktionen benötigt. Mit diesen Proben errechnete die Software den Überlappungsbereich der Lichtemissionen, die von den verwendeten Fluorochromen ausgingen. Die Einstellungen für die Messungen wurden dadurch automatisch so vorgenommen, dass der durch Überlappung entstehende Fehler in der Analyse „herausgerechnet“ wurde. Für jede Messung wurde erneut kompensiert.

Datenanalyse:
Die gemessenen Daten wurden mit der Software „BD FACS Diva“ ausgewertet. Zur Verfügung standen im Wesentlichen zwei Arten von Darstellungsdiagrammen: das Histogramm, bei dem eindimensional auf der x-Achse die Intensität des gemessenen Signals, auf der y-Achse die Anzahl Zellen, bei denen diese Fluoreszenz gemessen wurde, dargestellt war. Beim typischerweise und in dieser Arbeit verwendeten Dot Plot wurden als

Messparameter auf der x- und auf der y-Achse jeweils eine Fluoreszenz aufgetragen. Jede analysierte Zelle stellte sich dann je nach ihren Fluoreszenzeigenschaften als einzelner „Dot“ dar, der durch einen spezifischen x- und y-Wert definiert war.
Um von allen primär in einem Plot angezeigten Ereignissen, d.h. unter anderem Zellschrott und nicht-zelluläre Partikel, die zu analysierenden Zellen hervorzuheben, konnte ein Gate gesetzt werden. Durch das Gate wurden alle außerhalb liegenden Dots aus der weiteren Analyse ausgeschlossenen.
Dies wurde z.T. bei der Analyse von unseparierten PBMC (im Fall ausreichender Gesamtzellzahl wurde zur Orientierung eine unseparierte Probe analysiert) und von Durchfluss eingesetzt, um die Quantität der einzelnen Populationen genauer beurteilen zu können. Die separierten Fraktionen wurden ohne Gate betrachtet, da die FACS-Analyse u.a. darauf abzielte, Verunreinigungen durch andere Zellfraktionen zu erkennen.

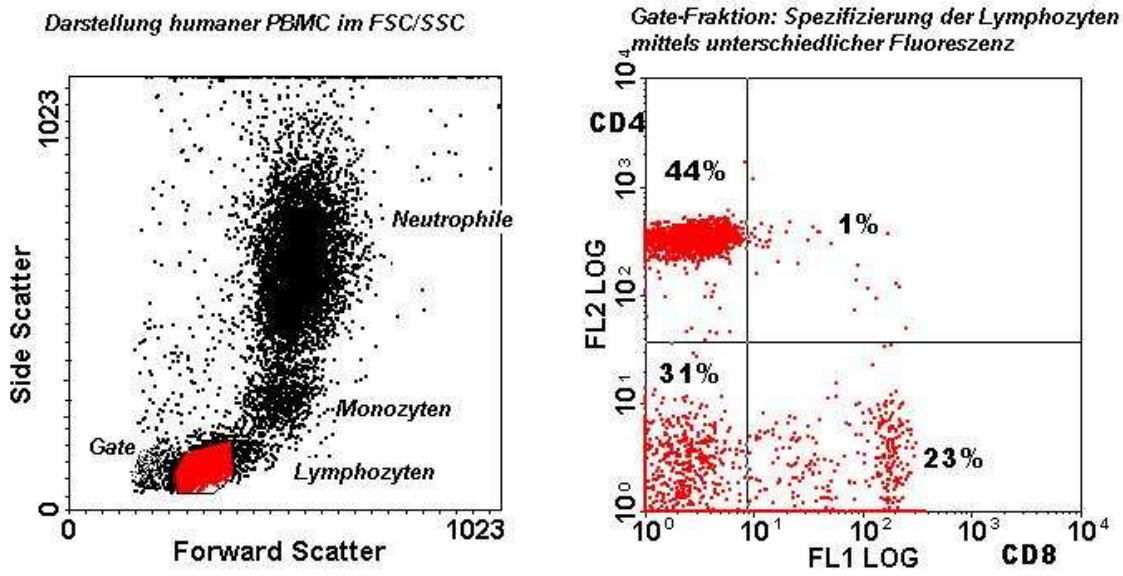


Abb. 2.7: Beispiel von Dot Plots. Ohne Gate stellen sich humane Leukozyten in der hier gezeigten charakteristischen Verteilung im FSC und SSC dar (links). Rechts die selektive Betrachtung einer „gegateten“ Fraktion innerhalb der Lymphozyten-Population und Darstellung der CD4+ und CD8+ T-Zellen im Dot-Plot mit FL1 als fluoreszierenden Zellen der CD8-FITC Markierung auf der X-Achse und FL2 als fluoreszierenden Zellen der CD4-PE Markierung auf der Y-Achse.

3. Ergebnisse

Das Ziel der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen war es, zu überprüfen, welche Zellen im Blut von Patienten mit Rheumatoider Arthritis im Vergleich zu einer Gruppe gesunder Kontrollpersonen mit EBV infiziert sein können. Diesen Untersuchungen lag die Hypothese zugrunde, dass bei EBV-seropositiven Patienten außer B-Lymphozyten auch andere Blutzellen, insbesondere T-Zellen infiziert sein können, und dass damit das Virus vielleicht für Veränderungen in der T-Zell-Population verantwortlich wäre. Hierzu wurden die beschriebenen T-Zellen (CD4+, CD8+), B-Zellen (CD19+) und Monozyten (CD14+) mithilfe der MACS-Methode separiert und mittels RT-PCR bzw. PCR auf Vorkommen von EBV-Transkripten und EBV-DNA getestet. Im Vorfeld wurde durch Verdünnungsreihen von Plasmid und zellulärer mRNA/DNA aus infizierten B-Zelllinien die Sensitivität der verwendeten RT-PCR- und PCR-Verfahren für die Detektion von Virustranskripten bzw. -genen bestimmt.

3.1 Sensitivität des eingesetzten EBV DNA Nachweises

Um zu bestimmen, welche Viruskopienzahl annähernd vorliegen musste, um mit den eingesetzten PCR-Verfahren auf DNA-Ebene in PBMC eine EBV-Infektion nachzuweisen, wurde das Epstein-Barr-Virusfragment BamHI W kloniert in den Vektor pBR322 verwendet. Das aus dem Vektor isolierte Insert wurde verdünnt und als Template für die Amplifikation eines 252bp langen Fragments zwischen Position 977 und 1229 mit spezifischen Primern (s. Material und Methoden) eingesetzt.

3.1.1 Etablierung der Sensitivität des EBV-DNA-Nachweises mithilfe einer Verdünnungsreihe des BamHI W Plasmids

Das isolierte klonierte BamHI W Insert von EBV lag in einer Konzentration von 500pg/µl vor. Es wurde eine in Zehnerpotenzen aufsteigende Verdünnungsreihe des Inserts von 1000pg bis 0,1fg hergestellt und in der o.g. spezifischen PCR-Reaktion getestet. Als Leerwert wurde der PCR-Mastermix und das entsprechende Primerpaar für das BamHI W-Fragment, jedoch nicht das Insert eingesetzt. Das Amplifikat hatte wie erwartet eine Länge von 252 Basenpaaren und konnte anhand des Längestandards pUC Mix Marker 8 spezifisch nach Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese und Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht detektiert werden.
Diese PCR-Reaktion mit den beschriebenen Verdünnungsstufen wurde mehrmals wiederholt mit dem Ergebnis, dass 1fg regelmäßig nachgewiesen werden konnte, und in einem Fall auch 0,1fg als höchste Verdünnungsstufe ein sicher positives Signal ergab (s. Abb. 3.1 A). Die nächste Verdünnungsstufe von 0,01fg erbrachte auf keinem Gel mehr ein Signal. Somit war die PCR-Nachweisgrenze für das BamHI W-Fragment 0,1fg.

3.1.2 DNA-Verdünnungsreihe der EBV-B-Zelllinie MGAR

Um die Sensitivität der PCR auch in einem zellulären System zu testen, in dem jede Zelle mit dem EBV-Virus infiziert war, wurde zudem eine DNA-Verdünnungsreihe der B-Zelllinie MGAR hergestellt (Abb. 3.1 B).
Aus 10^6 MGAR-Zellen waren 17,2 µg DNA in einer Konzentration von 86pg/µl isoliert worden. In einer aufsteigenden Verdünnungsreihe von 86pg/µl bis zu 0,0086pg/µl DNA konnte ein sicheres Signal bis zur Verdünnungsstufe von 0,086fg/µl in einem Probevolumen von 10µl erzielt werden, sodass damit EBV-DNA in einer Gesamtmenge von minimal 0,86fg nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse entsprachen etwa der zuvor in der Diplomarbeit von A. Respa

ermittelten Nachweisgrenze von 1fg des BamHI W-Fragments, was nach früheren Berechnungen ca. 50 Viruskopien entspricht (12*)

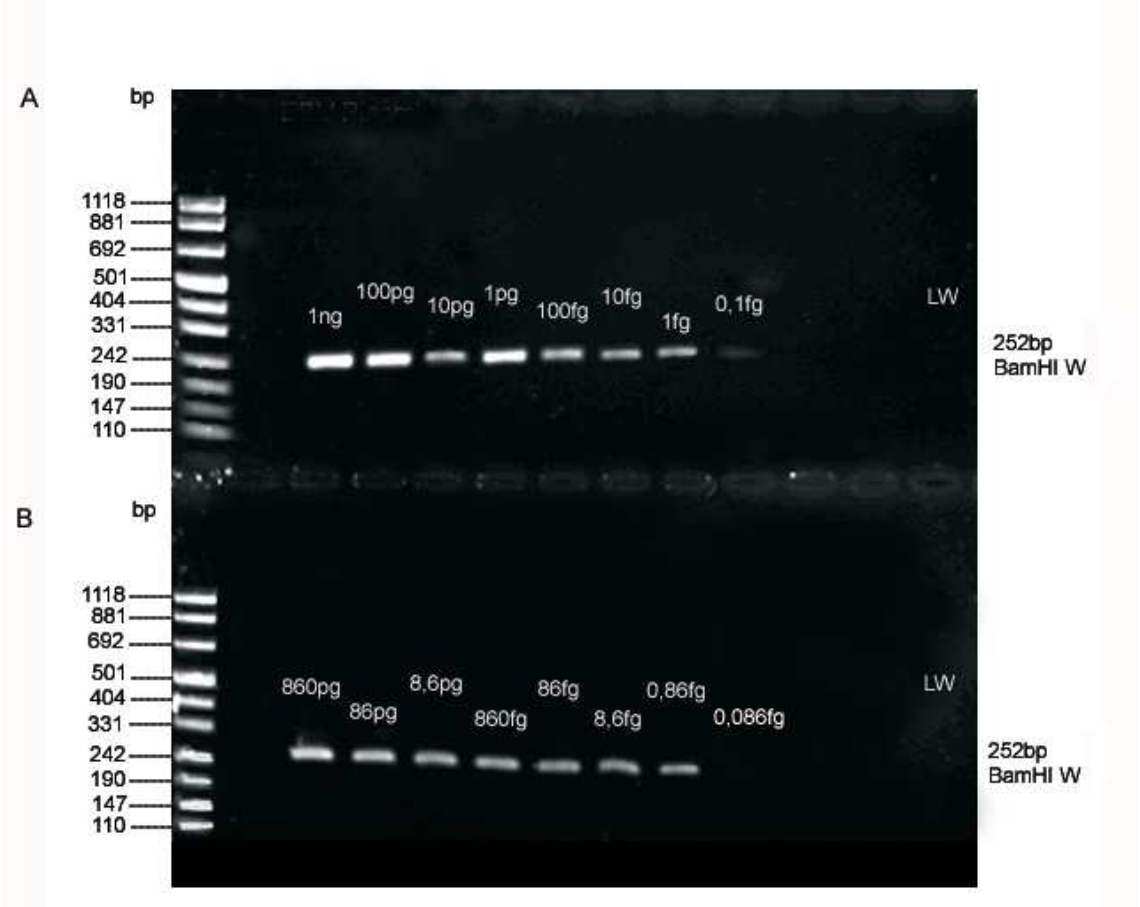


Abb. 3.1: Gelelektrophorese der spezifischen BamHI W- PCR-Verfahren, die zum Nachweis von EBV-DNA durchgeführt worden waren.
A: Verdünnungsreihe des BamHI W Fragments
B: Verdünnungsreihe von DNA der Zelllinie MGAR.
Marker: pUC Mix 8. Amplifikat: BamHI W-Fragment (252bp). Leerwert (LW): Mastermix mit den spezifischen Primern.

3.1.3 EBV-DNA-Nachweis bei Kontrollpersonen

Um die Reproduzierbarkeit des EBV-Nachweises in Blutzellen zu überprüfen, wurden DNA-Proben von sechs Patienten und vier Kontrollpersonen mithilfe der BamHI W PCR erneut getestet. Die Proben waren bereits in der Diplomarbeit von A. Respa untersucht worden.
In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse dieser Studie im Vergleich zu den bekannten Daten aus der o.g. Arbeit und, sofern bekannt, in Korrelation zum serologischen EBV-Status gezeigt.

RA-Patienten	**BamHI W Amplifikation**	**BamHI W-Amplifikation bei A. Respa**	**EBV-Status (Serologie)**
(1) DE63	-	-	positiv
(2) DE51	-	-	positiv
(3) DE58	-	-	positiv
(4) DE23	+	+	positiv
(5) DE25	+	+	positiv
(6) DE41	+	+	positiv
Kontrollpersonen	**BamHI W Amplifikation**	**BamHI W-Amplifikation bei A. Respa**	**EBV-Status (Serologie)**
(7) DE35	-	-	n.t.
(8) DE36	- (?)	-	positiv
(9) DE32	+	+	positiv
(10) DE56	+	+	n.t.

Tab. 3.1: Ergebnisse der BamHI W-Reamplifikation von DNA-Proben der getesteten Patienten und Kontrollpersonen. Vergleich mit zuvor erhobenen PCR-Resultaten in der Diplomarbeit von A.Respa und Korrelation zum serologischen EBV-Status.
- kein Amplifikat in der Gelelektrophorese nachweisbar,
+ Amplifikat in der Gelelektrophorese nachweisbar.

Mit Ausnahme von Probe Nr. 8 DE36 wurde übereinstimmend mit den PCRs in der genannten Diplomarbeit das BamHI W-Fragment nachgewiesen (Probe Nr. 4, 5, 6, 9, 10) bzw. nicht nachgewiesen (1, 2, 3, 7). Bei Probe Nr. 8 war das Signal in der Testung als schwach positive Bande zu erkennen, im Vgl. zum

negativen Resultat bei A. Respa (s. Abb. 3.5). Als Positivkontrolle wurde DNA der B-Zelllinie MGAR eingesetzt; als Negativkontrolle wurden Leerwerte mitgeführt, die den Mastermix mit Primern für BamHI W, aber keine DNA enthielten.

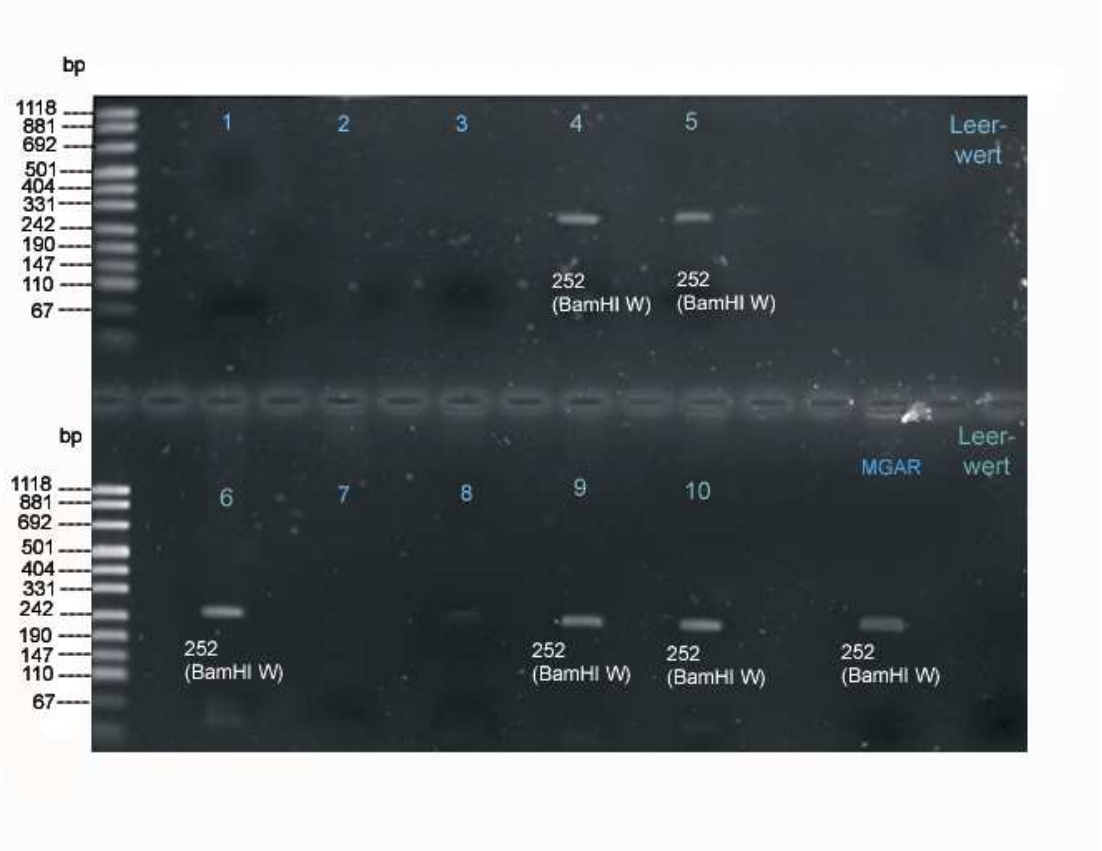


Abb. 3.2: Gelelektrophorese der BamHI W PCR-Amplifikate ausgewählter Patienten und Kontrollpersonen. Probennummern 1-10 entsprechen den oben aufgelisteten Patienten- und Kontrollproben. Die Proben 1,2,3,7 ergaben das erwartete negative Signal wie in der Diplomarbeit von A.Respa, die Proben 4,5,6,9 und 10 das erwartete positive Signal. Probe 8 zeigte ein schwach positives Signal (im Unterschied zu keinem nachweisbaren Amplifikat bei A. Respa). Zusätzlich wurden PCR-Amplifikate der B-Zelllinie MGAR als Positivkontrolle und Leerwerte (Mastermix und spezifische Primer) als Negativkontrolle mitgeführt.

3.2 Nachweis von EBV-Transkripten

Um Unterschiede in der Latenz/Persistenz von EBV in Blutzellen von Gesunden und RA-Patienten zu erfassen, wurde das Vorkommen spezifischer mRNA in RT-PCR-Analysen von Transkripten der Gene BZLF1, BMLF1, EBNA2 bzw. für EBER1 getestet.

3.2.1 Etablierung der RT-PCR für verschiedene EBV-Transkripte an der B-Zelllinie MGAR

Um die Funktion der PCR-Reaktionen für verschiedene mRNA-Transkripte des Epstein-Barr-Virus zu etablieren, wurden die Primer für die Amplifikate von BZLF1, BMLF1, EBNA1, EBNA2, EBER1 und LMP1 zunächst an DNA-Proben der B-Zelllinie MGAR getestet. Mit Ausnahme der Primerpaare LMP1, BZLF1 und β-Actin wurden ungeschnittene PCR-Produkte erwartet, danach sollten die PCR-Reaktionen bei Verwendung von DNA der EBV-infizierten B-Zelllinie Amplifikate ergeben, wie sie auch in RT-.PCR Reaktionen erwartet werden konnten.
Die einzelnen PCR-Ansätze enthielten 172ng DNA. Für jeden Ansatz wurde ein Leerwert (Mastermix und Primer) mitgeführt, um evtl. Verunreinigungen zu erkennen. Die PCR-Produkte von BMLF1, EBNA1, EBNA2 und EBER1 hatten die erwartete Länge. Das LMP1-Amplifikat hatte ebenfalls wie erwartet die Länge des ungesplicten Produkts. Im PCR-Ansatz für BZLF1 ließ sich allerdings ein nicht erwartetes Amplifikat der Länge des gesplicten Produkts (172bp) (Abb. 3.3) nachweisen. Da bisher keine RNA-Isolierungen und Umschreibungen in cDNA stattgefunden hatten, musste in diesem Fall von einer Primerverwechslung bzw. zweimaligen Zugabe des Primers ausgegangen werden. Aufgrund begrenzter isolierter DNA-Menge konnte die PCR für BZLF-Transkripte nicht wiederholt werden.

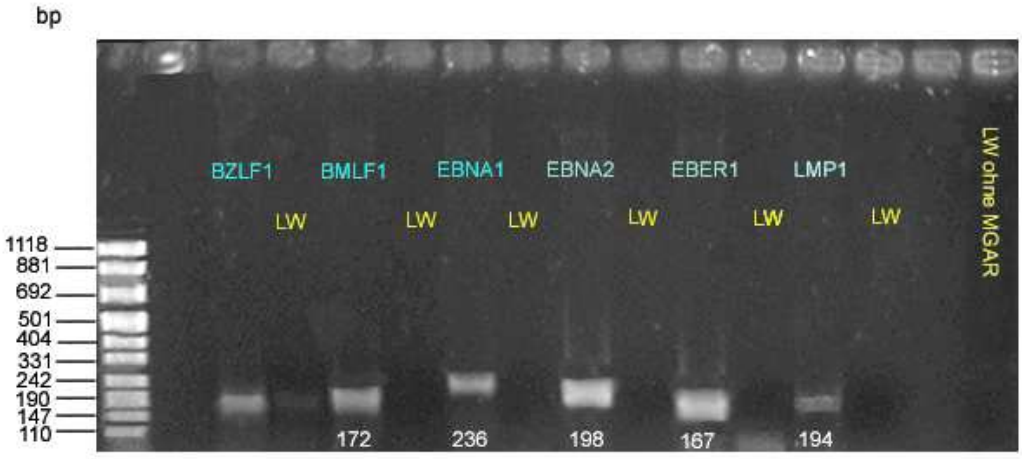


Abb. 3.3: Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate zum Nachweis von EBV-DNA. Theoretische Länge der einzelnen Fragmente: BZLF1 297bp, BMLF1 172bp, EBNA1 236bp, EBNA2 198bp, EBER1 167bp, LMP1 194bp. Leerwert: Mastermix und Primer. Signal des BZLF1-Ansatz sprach für Amplifikation eines unspezifischen Fragments mit einer Größe < 297bp, bzw. für eine Verwechslung der zugegebenen Primer.

3.2.2 Testung der Sensitivität der RT-PCR-Reaktion an der B-Zelllinie Namalwa

Um eine ausreichend sensitive Detektion von EBV-Transkripten zu prüfen, wurde mRNA aus der EBV-B-Zelllinie Namalwa isoliert. In dieser Zelllinie sollte im Unterschied zur EBV-B-Zelllinie MGAR nach früheren publizierten Untersuchungen das Epstein-Barr-Virus nur in einer Kopienzahl von 1-2 Viren pro Zelle vorliegen. Auch bei Verwendung von 300ng mRNA pro Ansatz ließen sich nicht für alle getesteten Transkripte positive Signale erzielen (Abb. 3.4). Für EBNA2, EBER1 und das BamHI W-Fragment, sowie β-Actin ließen sich Amplifikate detektieren. Zum Einsatz kamen, nach RNA-Isolierung und Umschreibung, Namalwa-cDNA aus je 300ng mRNA.
Es wurde dabei darauf geachtet, dass alle isolierten RNA-Proben einer ausreichenden DNAse-Behandlung zur Entfernung von Rest-DNA unterzogen wurden, um kontaminierende DNA-Amplifikation mit den Primern für BMLF1, EBNA1, EBNA2 und BamHI W auszuschließen. Die alleinige Detektion eines

Signals bei 317bp in der β-Actin-Amplifikation deutete darauf hin, dass nur entsprechende mRNA-Transkripte nachgewiesen worden waren und keine kontaminierende DNA vorhanden war.

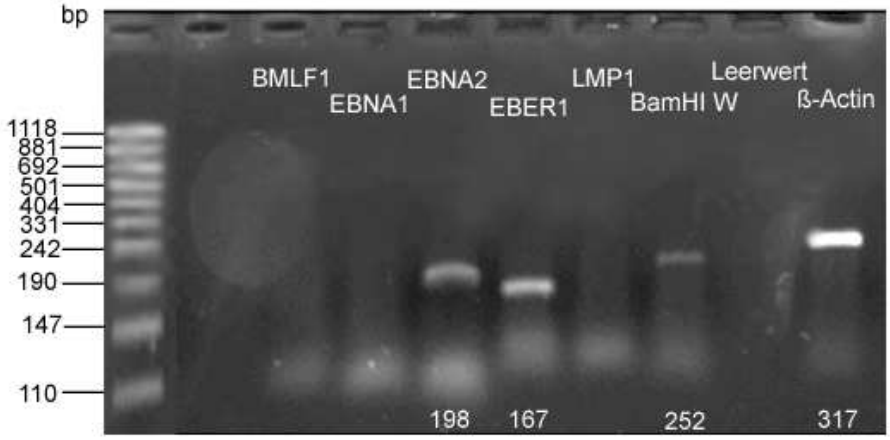


Abb. 3.4: RT-PCR-Analyse der EBV-B-Zelllinie Namalwa: Agarose-Gelelektrophorese der spezifischen cDNA-Amplifikate für mRNA-Transkripte von BMLF1 (172bp), EBNA1 (236bp), EBNA2 (198 bp), EBER1 (167bp), LMP1 (117bp), sowie des BamHW I-Fragments (252bp) und β-Actin (317bp). Für EBNA2 und EBER1, das BamHI W-Fragment, sowie für β-Actin entspricht das positive Signal der erwarteten Länge.

Bei Wiederholung dieses Versuches mit einer neuen mRNA-Isolierung aus der B-Zelllinie Namalwa konnten für alle getesteten Transkripte bis auf EBNA2- und LMP1-Transkript positive Signale erzielt werden (s. Abb. 3.5). Damit ließ sich nur die Amplifikation von EBER1- und β-Actin-Transkripten sicher reproduzieren. Allerdings zeigten sich in der EBER1-Amplifikation neben dem spezifischen erwarteten Amplifikat (167bp) weitere unspezifische Produkte. Die Inkongruenz in den anderen Transkriptionsnachweisen konnte in unterschiedlicher Umschreibung von mRNA in cDNA, oder in der Isolierung von mRNA begründet sein. Theoretisch war auch eine kulturbedingte Veränderung innerhalb der Zelllinie Namalwa denkbar.

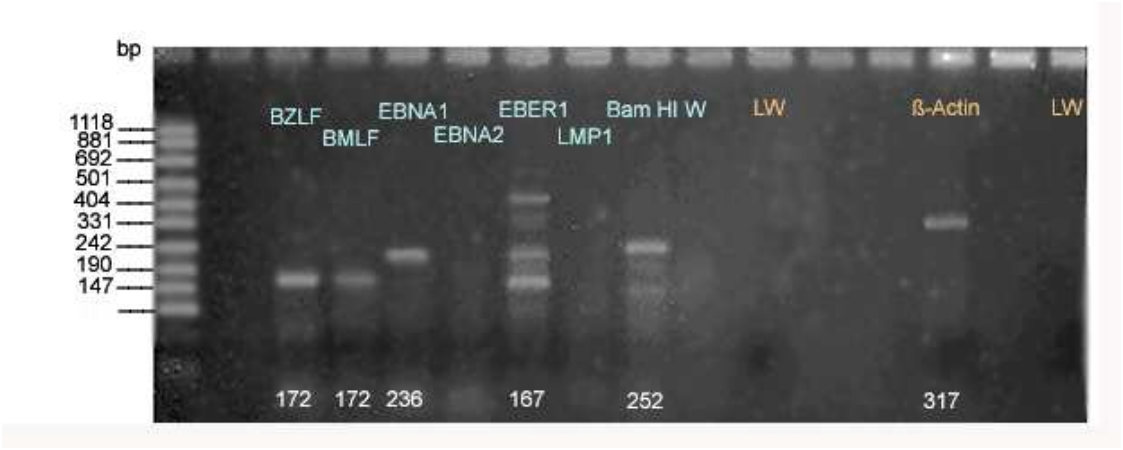


Abb. 3.5: RT-PCR-Analyse der EBV-B-Zelllinie Namalwa: Agarose-Gelelektrophorese der spezifischen cDNA-Amplifikate für mRNA-Transkripte von BZLF1 (172bp), BMLF1 (172bp), EBNA1 (236bp), EBNA2 (198 bp), EBER1 (167bp), LMP1 (117bp), sowie des BamHW I-Fragments (252bp) und β-Actin (317bp). Die Amplifikate der Transkripte von BZLF1, BMLF1, EBNA1, EBER1, und des BamHI W-Fragments entsprachen der erwarteten Länge. Im Ansatz von EBNA2 und LMP1 konnte kein Signal erzielt werden.

3.3 Untersuchung der EBV-Infektion in Lymphozyten- und Monozytenfraktionen aus PBMC von Patienten und Kontrollpersonen

3.3.1 Zellfraktionierung der PBMC von Patienten mit Rheumatoider Arthritis und von gesunden Kontrollpersonen

Bei den Probanden (7 RA-Patienten und 20 Kontrollpersonen, s. Material und Methoden) wurden aus je 40ml Vollblut PBMC isoliert und durch positive sequentielle MACS-Separation in CD4+, CD8+, CD19+ und CD14+ Zellfraktionen aufgetrennt. Zur Kontrolle der Effizienz dieser Arbeitsschritte wurde die Gesamtzellzahl, die Zellzahl der einzelnen Fraktionen, des Durchflusses und des Zellverlustes bestimmt. Die Gesamtzellzahl der aus 40ml Vollblut gewonnenen PBMC variierte, ebenso wie die Zellzahlen der einzelnen, daraufhin separierten Zellfraktionen. In einigen Fällen (s. Tab. 3.2 und 3.3) war eine Minderung der Zellzahlen festzustellen, die der Separationssequenz entsprach, d.h. die als dritte (CD19+) und als vierte (CD14+) abgetrennte

Fraktion enthielt weniger Zellen als physiologisch anzunehmen war. Dies konnte allerdings nicht konsequent bei allen Proben beobachtet werden, so dass der relativen Verteilung der Zellzahlen wahrscheinlich sowohl eine physiologische Normvariabilität, als auch durch das MACS-Verfahren verursachter Zellverlust bzw. –destruktion zugrunde lagen. Versuchsweise wurde das MACS-Separationsprotokoll bei folgenden Proben geändert: bei P5 wurden die PBMC mittels AutoMACS-Verfahren nicht-sequentiell aufgetrennt, d.h. isolierte PBMC wurden auf vier Röhrchen gleichermaßen verteilt und aus jedem dieser vier Röhrchen wurde eine Fraktion gewonnen. Dies kam jedoch aufgrund noch höherer Zellverluste nicht weiter zum Einsatz. Bei P7 standen nur 30ml Vollblut zur Verfügung; hier wurden die isolierten PBMC nach Zählung auf zwei Röhrchen gleichermaßen verteilt und die CD14+ und CD19+ Fraktion abgetrennt, so dass der Durchfluss die T-Zellfraktionen (CD4+ und CD8+ ungetrennt) als negativ selektierte Fraktionen enthalten sollte. Aus der einen Durchflussfraktion wurden dann CD4+ Zellen separiert, aus der anderen die CD8+ Zellen, wobei dieses Verfahren jedoch ebenfalls hohe Zellverluste zur Folge hatte. In gleicher Weise war in der Kontrollgruppe mit K20 verfahren worden.

RA-Patienten	Gesamt-Zellzahl $x10^6$	Zellzahl CD4+ $x10^6$	Zellzahl CD8+ $x10^6$	Zellzahl CD14+ $x10^6$	Zellzahl CD19+ $x10^6$	Zellzahl Durchfluss $x10^6$	Zellzahl Verlust $x10^6$
P1	36,4	8,16 (22%)	2,24 (6%)	4,72 (13%)	1,32 (4%)	13,68 (38%)	6,28 (17%)
P2	66,8	22,12 (33%)	4,0 (6%)	19,0 (28%)	3,8 (6%)	22,2 (33%)	
P3	31,6	6,24 (20%)	2,36 (7%)	5,28 (17%)	0,84 (3%)	13,8 (44%)	3,08 (10%)
P4	52,8	14,2 (27%)	5,68 (11%)	13,4 (25%)	3,88 (7%)	17,8 (33%)	
P5*	28,2	0,39 (1%)	0,24 (1%)	0,32 (1%)	0,16 (0,5%)	4,77 (17%)	22,32 (80%)
P6	23,2	5,1 (22%)	1,6 (7%)	6,4 (28%)	1,0 (4%)	6,7 (29%)	2,4 (10%)
P7	15,4	1,24 (8%)	0,2 (1%)	n.t.	n.t.	n.t.	
Durch-schnitt	36,3	9,5	2,7	9,8	2,2	14,8	2,4

Tab. 3.2: MACS-Separation von PBMC: Gesamtzellzahl und Zellzahl in den CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+ Fraktionen nach der MACS-Separation, ausgehend von je 40ml Vollblut (P1-6) bzw. 30ml Vollblut (P7). P5 wurde mit AutoMACS separiert; die Zellzahlen der einzelnen Fraktionen von P5 flossen nicht in die Berechnung der Durchschnittswerte mit ein.

Kontroll-personen	**Gesamt-**Zellzahl **x10^6**	**Zellzahl CD4+ x10^6**	**Zellzahl CD8+ x10^6**	**Zellzahl CD14+ x10^6**	**Zellzahl CD19+ x10^6**	**Zellzahl Durchfluss x10^6**	**Verlust x10^6**
K1	50,8	8,0 (16%)	13,18 (27%)	4,0 (8%)	10,38 (20%)	n.t.	n.t.
K2	56,4	4,88 (9%)	6,36 (11%)	5,36 (10%)	2,72 (5%)	26,0 (47%)	11,08 (20%)
K3	40,4	8,36 (21%)	2,4 (6%)	2,58 (6%)	0,72 (1,8%)	9,2 (23%)	17,4 (43%)
K4	34,8	8,8 (26%)	0,88 (3%)	1,52 (4%)	0,9 (3%)	n.t.	n.t.
K5	38,0	10,8 (28%)	8,56 (22%)	5,88 (15%)	5,52 (14%)	8,36 (22%)	-
K6	24,4	6,36 (26%)	2,6 (11%)	2,28 (9%)	1,16 (5%)	6,28 (26%)	5,72 (23%)
K7	56,4	13,52 (24%)	11,72 (21%)	9,49 (17%)	8,08 (15%)	10,0 (18%)	3,59 (6%)
K8	27,6	5,68 (20%)	5,24 (19%)	5,44 (29%)	1,44 (5%)	14,88 (54%)	-
K9	43,2	22,88 (52%)	3,68 (8%)	3,24 (7%)	3,04 (7%)	7,0 (16%)	3,36 (8%)
K10	36,4	8,56 (23%)	4,5 (12%)	6,6 (18%)	1,52 (4%)	7,68 (21%)	7,54 (20%)
K11	57,6	12,24 (21%)	7,7 (13%)	4,5 (8%)	3,8 (6%)	11,36 (19%)	18,0 (30%
K12	50,0	12,44 (25%)	3,2 (6%)	4,0 (8%)	0,92 (2%)	8,24 (16%)	21,2 (42%)
K13	55,6	15,32 (28%)	6,68 (12%)	9,1 (17%)	1,2 (2%)	16,8 (30%)	6,5 (12%)
K14	44,0	16,72 (38%)	7,16 (16%)	17,24 (40%)			2,88 (7%)
K20*	22,8	11,1 (48%)		n.t.	n.t.	3,16 (14%)	8,64 (37%)
Durch-schnitt	43,9	11	6	4,9	3,2	11,4	8,1

Tab. 3.3: MACS-Separation von PBMC: Gesamtzellzahl und Zellzahl in den CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+ Fraktionen nach der MACS-Separation. Die PBMC wurden aus je 40ml Vollblut isoliert, mit Ausnahme von K20 (20ml Vollblut; nicht in der Durchschnittsberechnung) und anschließend mittels MACS aufgetrennt. Prozentangaben entsprechen Gesamtzellzahl (=100%).

3.3.2 RNA-Ausbeute bei RA-Patienten und Kontrollpersonen

Im nächsten Schritt wurde aus den separierten CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+ -Zellfraktionen RNA isoliert und photometrisch vermessen. Tabelle 3.4 zeigt die absoluten Mengen der isolierten RNA aus den in Tab. 3.2 dargestellten Zellzahlen der einzelnen Fraktionen. Die RNA-Menge korrelierte erwartungsgemäß in etwa mit der Anzahl der Zellen, die für die Isolierung zur Verfügung gestanden hatte. So wurde aus der zuerst separierten CD4+Fraktion häufig mehr RNA isoliert als aus den anderen Zellfraktionen.

RA-Patienten	RNA aus CD4+ Fraktion (µg)	RNA aus CD8+ Fraktion (µg)	RNA aus CD14+ Fraktion (µg)	RNA aus CD19+ Fraktion (µg)	RNA aus Durchfluss (µg)
P1	3,22	1,61	0,46	1,15	1,15
P2	14,22	0,9	13,77	0,27	6,75
P3	3,04	1,44	1,92	0,64	9.92
P4	8,46	1,26	16,74	1,62	7,56
P6	0,87	0,63	0,85	0,5	
P7	0,44	0,23	n.t.	n.t.	
Durch-schnitt	5,04	1,01	6,75	0,84	6,35

Tab. 3.4: Menge der isolierten RNA aus den mittels MACS separierten Zellfraktionen der RA-Patienten.

Kontroll-person	RNA aus CD4+ Fraktion (µg)	RNA aus CD8+ Fraktion (µg)	RNA aus CD14+ Fraktion (µg)	RNA aus CD19+ Fraktion (µg)	RNA aus Durchfluss (µg)
K1	2,4	3,2	10,8	1,6	n.t.
K3	7,2	7,44	0,0	0,0	n.t.
K4	2,55	1,8	1,2	0,75	4,35
K6	4,64	1,44	2,4	0,96	4,64
K7	9,8	5,6	4,2	2,8	2,8
K8	2,1	3,0	3,75	0,9	0,9
K9	21,6	5,44	3,04	16,64	2,88
K10	7,2	0,32	2,08	0,0	12,16
K11	2,73	1,94	0,74	2,2	n.t.
K12	2,7	1,0	1,54	1,0	n.t.
Durch-schnitt	6,29	3,12	2,98	2,69	4,62

Tab. 3.5: Menge der isolierten RNA aus den zuvor mittels MACS separierten Zellfraktionen der gesunden Kontrollpersonen.

3.4 Detektion von mRNA-Transkripten lytischer und latenter Gene in EBV-infizierten Zellen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis und Kontrollpersonen

Um auf RNA-Ebene zu überprüfen, ob und bei welchen Patienten bzw. Kontrollpersonen Zellen mit EBV infiziert waren, wurde aus den isolierten CD4+ bzw. CD8+, und CD14+ bzw. CD19+ Zellfraktionen mRNA isoliert und RT-PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern für Transkripte lytischer und latenter Gene durchgeführt. Außerdem wurde, soweit möglich, auch die aus Durchflusszellen isolierte RNA als Kontrollwert für eine vorliegende EBV-Infektion in gleicher Weise untersucht. Hierzu wurde die isolierte RNA (s.Tab. 3.4, 3.5) in cDNA

umgeschrieben und pro PCR-Ansatz wenn möglich 300ng (mind. 200ng) eingesetzt. Obwohl bei allen RNA-Isolierungen ein DNAse-Verdau mit 10µl DNAse I durchgeführt worden war, konnten Proben noch Reste von DNA enthalten; somit war auch eine unerwünschte DNA-Amplifikation nicht in jedem Fall auszuschließen. Da sich Amplifikate von mRNA und DNA im Fall von BZLF1, LMP1 und β-Actin anhand ihrer Länge (s. Material und Methoden) in der Gelelektrophorese unterscheiden ließen, konnte hier z.T. auf Verunreinigungen durch DNA rückgeschlossen werden. Der Nachweis von Transkripten des konstitutiv exprimierten β-Actin diente als Positivkontrolle und als Kontrolle der DNA-Kontamination. Der Leerwert (Negativkontrolle) enthielt Mastermix und Primer, jedoch keine cDNA.

3.4.1 Beispiele für die Detektion lytischer oder latenter Transkripte

In der folgenden Abbildung sollen beispielhaft die RT-PCR Ergebnisse der Zellfraktionen einer Patientenprobe gezeigt werden. Die Amplifikation des β-Actin-Transkripts zeigte in der CD4+ Zellfraktion eine leichte DNA-Verunreinigung der cDNA-Probe, sodass auch noch geringfügig ungesplicte DNA detektiert wurde. In PCR-Ansätzen mit dem EBER1-Primerpaar zeigten sich in der CD14+ und CD19+ Fraktion Signale, die nicht der Länge des erwarteten Amplifikats entsprachen und damit als unspezifische Signale gewertet werden mussten. Wegen der DNA-Kontamination waren die Amplifikate von EBNA2 und BZLF1 in der CD4+ Zellfraktion nicht sicher als Transkripte bewertbar. Ebenso war der Nachweis von EBNA2 ohne EBER1-Transkript in der CD8+ Fraktion kein sicherer Hinweis für eine EBV-Infektion. Der Nachweis von BZLF1 ohne spezifische EBER1-Transkripte in den CD19+ und CD14+ Fraktionen konnte ebenfalls nur bedingt als Hinweis für eine EBV-Infektion gewertet werden.

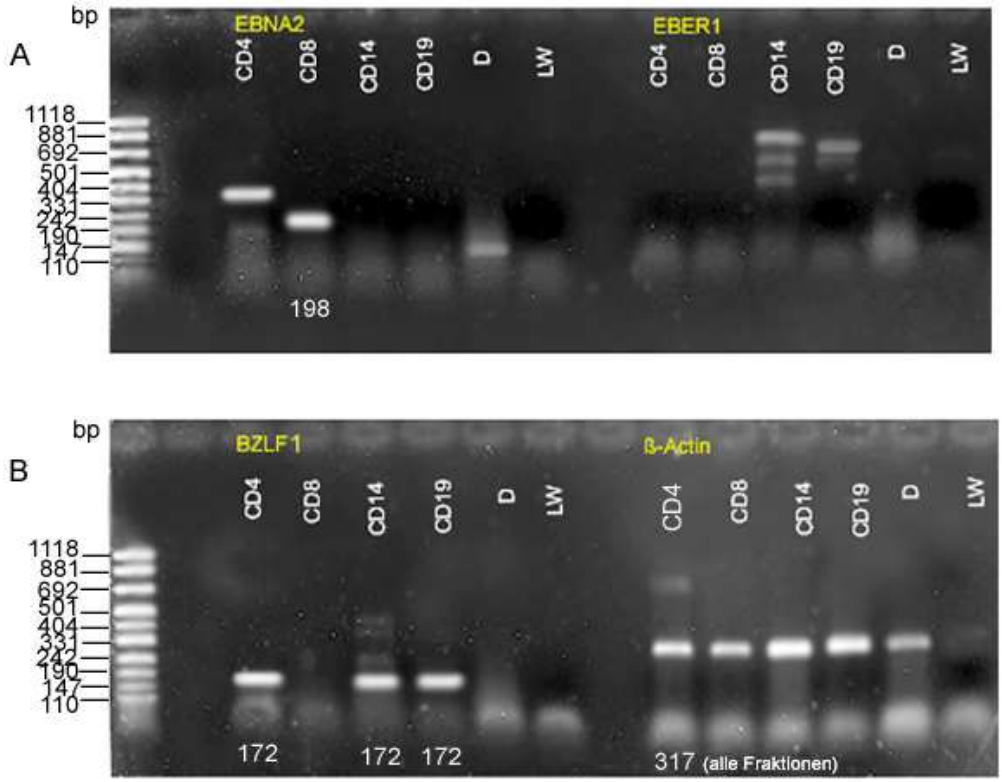


Abb. 3.6: RT-PCR Analyse der MACS-separierten Zellfraktionen CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+ des RA-Patienten P4. D: Durchflusszellen.
A) EBNA2 (198bp) in CD8+ positiv; in CD4+ entspricht die Länge des Produkts nicht EBNA2. EBER1 (167bp) negativ.
B) BZLF1 (172bp) in CD4+, CD14+, CD19+ positiv. β-Actin (317bp) in allen Fraktionen als Amplifikat des gesplicten Transkripts positiv. Die CD4+ Fraktion enthielt auch das DNA-Amplifikat von β-Actin. Leerwerte (LW) zeigten keine Verunreinigung.

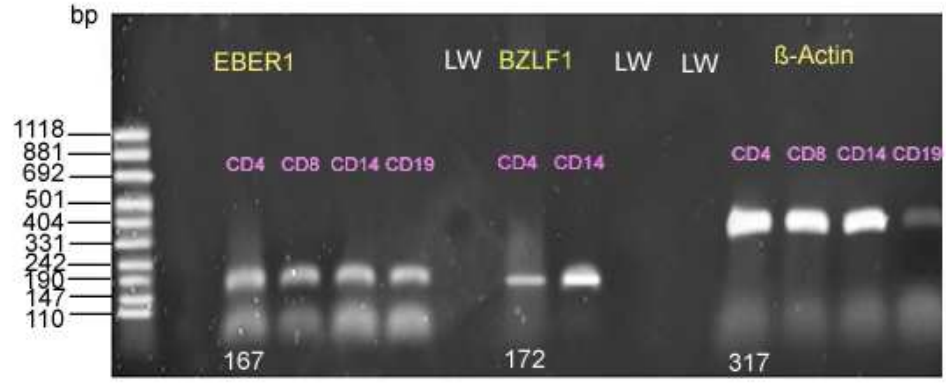


Abb. 3.7: RT-PCR Analyse der MACS-separierten Zellfraktionen CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+ des RA-Patienten P6. EBER1 (167bp) in allen Fraktionen positiv. BZLF1 (172bp) in CD4+ und CD14+ positiv, β-Actin (317bp) in allen Fraktionen positiv, Leerwerte bei EBER1- und BZLF1-Amplifikation negativ. Aufgrund geringer RNA-Ausbeute wurden nicht alle Transkripte untersucht. Leerwerte zeigten keine Verunreinigung.

In den Zellfraktionen der Patientenprobe P6 wurden aufgrund geringerer RNA-Ausbeute nur Transkripte von EBER1 und von BZLF1 amplifiziert. Spezifische EBER1-Transkripte konnten in allen Ansätzen detektiert werden. Der alleinige Nachweis eines Amplifikats für das gesplicte β-Actin-Transkript zeigte keine DNA-Verunreinigung der isolierten RNA-Probe an. Damit konnten auch die BZLF1-Amplifikate in den mRNA-Proben der CD4+ Zellfraktionen als Hinweis für eine aktive EBV-Infektion gewertet werden. Der serologische EBV-Status war zuvor, wie in Material und Methoden beschrieben, beim Patienten mit der Probenummer P6 positiv gewesen.

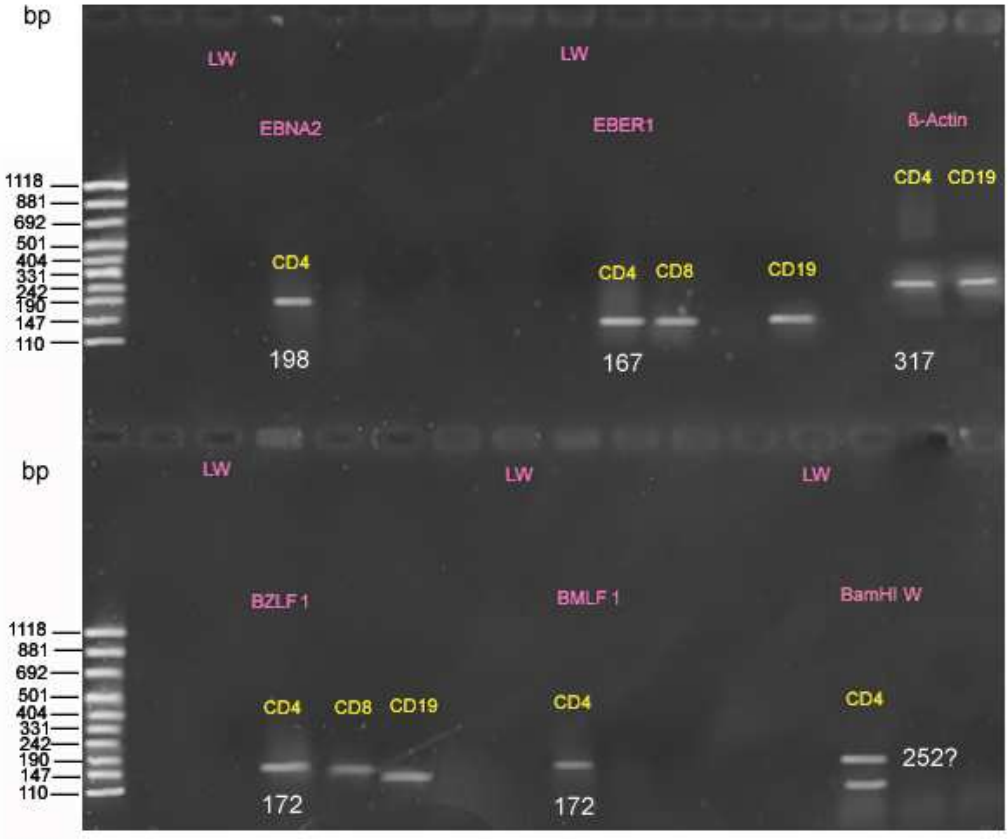


Abb. 3.8: Kontrollperson K11. EBNA2 (198bp) in der CD4+ Fraktion, EBER1 (167bp) in CD4+, CD8+ und CD19+ Fraktion, sowie BZLF1 (172bp) in CD4+, CD8+ und CD19+ Fraktion, BMLF1 in CD4+ Zellen positiv. BamHI W Ansatz fraglich verunreinigt. Leerwerte negativ. β-Actin-Transkript in CD4+ und CD19+-Fraktion nachweisbar.

Bei der Kontrollperson K11 wurden EBNA2- und EBER1-Transkripte (Abb. 3.8) in allen vier Zellfraktionen (CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+) getestet; aufgrund geringer cDNA-Mengen wurden BZLF1- und BMLF1-, sowie BamHI W - Transkripte nur in den CD4+, CD8+ und CD19+ Zellfraktionen getestet. Transkripte für β-Actin wurden nur in der CD4+ und der CD19+ Zellfraktion untersucht.
In der CD4+ Fraktion wurde das Transkript von EBNA2, EBER1, BZLF1 und BMLF1 nachgewiesen. Spezifische Transkripte von EBER1 und BZLF1 konnten außerdem sowohl in der CD8+, als auch in der CD19+ Fraktion detektiert werden. Im Ansatz, der das BamHI W-Primerpaar und cDNA der CD4+ Zellfraktion enthielt, wurde neben dem spezifischen Amplifikat ein weiteres Amplifikat detektiert, das aus der versehentlichen zusätzlichen Zugabe von Primern für BMLF1 resultierte.

3.4.2 Zusammenfassung der Detektion lytischer und latenter Transkripte

In den folgenden Tabellen wird, in T-Zellfraktionen und B-Zellfraktion/Monozytenfraktion unterteilt, für die Patienten- und für die Kontrollgruppe gezeigt, welche Transkripte von EBV-Genen detektiert werden konnten. Die Detektionsanalyse wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, an den separierten CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+ Zellfraktionen durchgeführt. Wegen der geringen Zellausbeute in den einzelnen Fraktionen konnte nur in Vergleichsuntersuchungen an weiteren Kontrollen die Reinheit der separierten Zellfraktionen durch Immunfluoreszenzanalyse am FACS-Gerät überprüft werden. Wegen der folglich geringen mRNA-Mengen konnte außerdem die RT-PCR Analyse an den spezifischen Isolaten für die Detektion der verschiedenen Transkripte meistens nicht wiederholt werden. Aufgrund eines positiven spezifischen Signals in der β-Actin-Amplifikation konnte bei den beiden Patienten P4 und P6 von einem sicheren Funktionieren der Assays ausgegangen werden, da hier in allen vier getesteten Zellfraktionen

das entsprechende Transkript nachgewiesen wurde. Bei zwei weiteren Patienten wurde nur in jeweils einer T-Zellfraktion (P1 in CD8+, P3 in CD4+), sowie bei P3 zusätzlich in der CD14+ und CD19+ Fraktion das β-Actin-Transkript detektiert; dies konnte in evtl. zu geringen cDNA-Mengen in den betroffenen Zellfraktionen begründet sein. Die Aussagekraft der PCR-Testungen bei P1 und P3 war daher eingeschränkt. Bei P4 wurde außerdem in der Positivkontrolle mittels β-Actin zusätzlich zum spezifischen Signal bei 317bp ein weiteres unspezifisches Signal detektiert (s. Abb. 3.6), was auf eine Verunreinigung der Probe hindeutete.

Als sicherstes reproduzierbares Zeichen einer EBV-Infektion hatte sich in dieser Arbeit die Detektion von EBER1-Transkripten erwiesen; diese wurden bei vier Patienten detektiert: bei P1 in allen vier Zellfraktionen, bei P3 in der CD4+ und CD14+ Fraktion, bei P6 ebenfalls in allen vier Zellfraktionen und bei P7 in der CD4+ und CD8+ Zellfraktion. Jedoch konnte einzig bei P6 auch in allen Zellfraktionen (CD4+, CD8+, CD14+, CD19+) ein sicherer β-Actin-Nachweis erbracht werden. Bei folgenden Patienten wurden zusätzlich zu EBER1-Transkripten noch weitere Transkripte detektiert: EBNA2 wurde bei P4 in der CD8+ Fraktion und bei P2 in der CD14+ Fraktion nachgewiesen. Das Transkript des lytischen Gens BZLF1 wurde insgesamt bei drei Patienten vorgefunden: bei P4 und P6 in den CD4+ und CD14+ Zellfraktionen, sowie bei P4 zusätzlich in der CD19+ Zellfraktion. Bei P4 konnte jedoch kein EBER1-Transkript detektiert werden. Bei P2 – hier allerdings bei negativem β-Actin-Nachweis- wurde das BZLF1-Transkript in der CD14+ Zellfraktion amplifiziert.

Der Nachweis von BMLF1-Transkripten blieb bei allen getesteten Patienten negativ.

RA-Pat.	Serolog. EBV-Status	Detektion EBNA2		Detektion EBER1		Detektion BZLF1		Detektion BMLF1		Positiv-Kontrolle β-Actin	
Zellfraktion		**CD4**	**CD8**	**CD4**	**CD8**	**CD4**	**CD8**	**CD4**	**CD8**	**CD4**	**CD8**
P1	n.t.	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
P2	n.t.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P3	n.t.	-	n.t.	+	-	-	-	-	-	+	-
P4	n.t.	-	+	-	-	+	-	-	-	+*	+
P6	+	n.t.	n.t.	+	+	+	n.t.	n.t.	n.t.	+	+
P7	+	n.t.	n.t.	+	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

Tab. 3.6a: Detektion lytischer und/oder latenter Transkripte in den CD4+ bzw. CD8+ Zellfraktionen der Patientengruppe.
*: Bei P4 zeigte sich in der β-Actin-Amplifikation zusätzlich zum erwarteten positiven Signal ein unspezifisches Transkript.

RA-Pat.	Serolog. EBV-Status	Detektion EBNA2		Detektion EBER1		Detektion BZLF1		Detektion BMLF1		Positiv-Kontrolle β-Actin	
Zellfraktion		**CD14**	**CD19**	**CD14**	**CD19**	**CD14**	**CD19**	**CD14**	**CD19**	**CD14**	**CD19**
P1	n.t.	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
P2	n.t.	+	n.t.	-	n.t.	+	n.t.	-	n.t.	-	-
P3	n.t.	-	n.t.	+	n.t.	-	n.t.	-	n.t.	+	+
P4	n.t.	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
P6	+	n.t.	n.t.	+	+	+	n.t.	n.t.	n.t.	+	+
P7	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

Tab. 3.6b: Detektion lytischer und/oder latenter Transkripte in den CD14+ bzw. CD19+ Zellfraktionen der Patientengruppe.

Aus der Gruppe der Kontrollpersonen konnten 9 Proben (K3, K4, K6-K12) für die PCR-Analysen zur Detektion von EBV-Transkripten eingesetzt werden. Anhand der β-Actin-Positivkontrolle konnte eine EBV-Infektion bei fünf Personen (K3, K9-K12) als sicher angenommen werden. Bei den anderen Kontrollpersonen war die β-Actin-Amplifikation aufgrund geringer cDNA-Mengen nicht mitgetestet worden (K4 und K6), bzw. negativ ausgefallen (K7 und K8).

Von den untersuchten wurden am häufigsten EBER1-Transkripte nachgewiesen– fünf mal in der CD4+ Fraktion (K4, K7, K8, K11, K12), dreimal davon zusätzlich in der CD8+ Fraktion (K8, K11, K12); viermal konnten sie in B-Zellfraktionen nachgewiesen werden (K7, K8, K11, K12) und bei zwei Proben zusätzlich in Monozyten (K8, K12). EBNA2-Transkripte hingegen konnten nur einmal (K11) in der CD4+ T-Zellfraktion nachgewiesen werden. Bei einer weiteren Kontrollperson, K4, war auch das (nicht durchgängig untersuchte) EBNA1-Transkript in der CD8+ Fraktion positiv getestet worden.

Die lytischen Transkripte von BZLF1 und BMLF1 wurden ebenfalls detektiert: das BZLF1-Transkript bei drei Proben in der CD4+ Zellfraktionen (K6, K11, K12) und bei einer Probe, K11, zusätzlich in der CD8+ und der CD19+ Fraktion; in den Monozytenfraktionen blieb es bei allen getesteten Proben negativ. Bei K9 wurde das BZLF1-Transkript isoliert und bei β-Actin-Amplifikation in der CD8+ Zellfraktion detektiert. BMLF1-Transkripte ließen sich bei einer Kontrollperson, KK3, in beiden T-Zellfraktionen nachweisen, bei einer weiteren Kontrollperson, K11, in der CD4+ Fraktion. In den Fraktionen der B-Zellen und Monozyten fanden sich keine Transkripte.

Bei Betrachtung der untersuchten Kontrollpersonen K3, K4 und K6-K12 konnte somit festgestellt werden, dass bei den Personen K9 und K6 BZLF1 als lytisches Transkript isoliert detektiert wurde, ohne dass begleitend Transkripte der Latenz nachweisbar waren; hier konnte nicht geklärt werden, ob es sich um eine Kontamination der betroffenen Zellfraktionen CD4+ und CD8+ handelte, oder ob die Amplifikation von Transkripten anderer, latenter Gene aus technischen Gründen nicht gelungen war. Nachweis der Transkription latenter

Gene konnte in fünf Fällen (K4, K7, K8, K11, K12) erbracht werden, bei allen waren auch T-Zellfraktionen beteiligt.
Insgesamt wurde beobachtet, dass bei vier von sechs Patienten und bei fünf von neun Kontrollpersonen die CD4+ und/oder CD8+ Zellfraktionen EBER1-Transkripte enthielten.

Kontr.-Pers.	**Detektion EBNA2**		**Detektion EBER1**		**Detektion BZLF1**		**Detektion BMLF1**		**Positiv-Kontrolle β-Actin**	
Zell-fraktion	**CD4**	**CD8**	**CD4**	**CD8**	**CD4**	**CD8**	**CD4**	**CD8**	**CD4**	**CD8**
K3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	n.t.
K4	-	- EBNA1+	+	-	-	n.t.	-	-	n.t.	n.t.
K6	-	-	-	-	+	-	-	-	n.t.	n.t.
K7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
K8	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
K9	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
K10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
K11	+	-	+	+	+	+	+	-	+	n.t.
K12	-	-	+	+	+	-	-	n.t.	+	+

Tab. 3.7a: Detektion lytischer und/oder latenter Transkripte in den CD4+ und CD8+ Zellfraktionen der Kontrollgruppe.

Kontr.-Pers.	**Detektion EBNA2**		**Detektion EBER1**		**Detektion BZLF1**		**Detektion BMLF1**		**Positiv-Kontrolle β-Actin**	
Zell-fraktion	**CD14**	**CD19**	**CD14**	**CD19**	**CD14**	**CD19**	**CD14**	**CD19**	**CD14**	**CD19**
K3	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
K4	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
K6	-	n.t.	-	n.t.	-	n.t.	-	n.t.	n.t.	n.t.
K7	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
K8	-	-	+	+	-	n.t.	-	n.t.	-	-
K9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
K10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
K11	-	-	-	+	-	+	n.t.	n.t.	n.t.	+
K12	-	-	+	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+	+

Tab. 3.7b: Detektion lytischer und/oder latenter Transkripte in den CD14+ und CD19+ Zellfraktionen der Kontrollgruppe.

3.5 FACS-Analyse der separierten Zellfraktionen

Um die Reinheit der mit dem MiniMACS-System durchgeführten Zellseparation der PBMC zu überprüfen, wurden die Zellfraktionen von fünf Probanden (K1-K3, K19, K20) durchflusszytometrisch untersucht.
Bedingt durch die Methode der Zellseparation konnte keine 100%ige Reinheit der Zellfraktionen erzielt werden. Dies stellte während der Arbeit an den Proben ein Problem dar, welches trotz methodischer Optimierung an verschiedenen Punkten des Protokolls nicht vollständig gelöst werden konnte.

3.5.1 Reinheit der im FACS untersuchten Zellfraktionen

Wie in „Material und Methoden“ beschrieben, wurden zuerst die CD4+ Zellen abgetrennt. Diese wiesen auch bei der FACS-Analyse eine hohe Reinheit (von minimal 85,3% bis zu max. 93,8%) auf. Im nächsten Schritt wurde die CD8+ Fraktion separiert; auch hier konnten noch eine gute Reinheit und ausreichend hohe Zellzahlen erzielt werden. Für die CD8+ Zellen wurde eine Reinheit von minimal 81,6% bis zu max. 94% erreicht. In den Proben, die CD19+ Zellen beinhalten sollten, konnten mittels FACS nur bis zu 78,5% CD19+ Zellen festgestellt werden. Die wesentlichen verunreinigenden Zellen waren Monozyten und CD8+-Lymphozyten. Bei den CD14+ Zellen zeigte sich in einer FACS-Analyse eine Reinheit von nur 64,2%. Um die Effizienz der verschiedenen Zellseparationen besser beurteilen zu können, wurde bei jeder Probe auch der Durchfluss mituntersucht, indem sich Zellschrott und erwartungsgemäß Zellen aller vier separierten Fraktionen finden ließen.
Diese Verunreinigungen machten die Beurteilungen der PCR-Reaktionen problematisch und mussten bei der Bewertung der Nachweise von Transkripten in den einzelnen Zellfraktionen berücksichtigt werden; da jedoch die für diese Arbeit wesentlichen Zellfraktionen CD4+ und CD8+ noch gute Reinheiten aufwiesen, wurde das Separationsverfahren nicht weiter modifziert.

Kontrollperson	**FACS-Analytik der**			
	CD4+ Zellfraktion	**CD8+- Zellfraktion**	**CD14+- Zellfranktion**	**CD19+- Zellfraktion**
K1	CD4+: 85,3%	CD8+: 94%	n.t.	CD19+: 78,5%
	CD8+:1,3%	n.t.	n.t.	CD4+: 12% CD8+: 10% CD14+:3%
K2	CD4+: 93,8%	n.t.	n.t.	n.t.
K3	CD4+: 92,52%	CD8+: 81,57%	CD14+: 64,2%	CD19+: 55%
	CD8+:6% CD14+:2%	CD4+:8% CD14+:14%	CD8+:3,6%	CD4+:6,75% CD8+:13,3% CD14+:27%
K19	Analyse unseparierter Lymphozyten:			
	CD4+: 30,7%	CD8+: 10,3%	n.t.	n.t.
K20*	CD4+: 15% Nicht anfärbbar/Schrott: 84%	n.t.	n.t.	n.t.

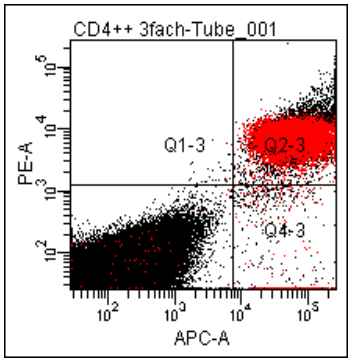
Tab. 3.8: FACS-Analyse der separierten CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+ Zellfraktionen. Verunreinigungen anderer Fraktionen durch CD19+ Zellen, sowie die Reinheit der CD19+ Zellfraktion an sich waren nur indirekt zu erkennen, da wegen fehlender Antikörper für unterschiedliche Bindungsepitope hier keine Direktmarkierung nach spez. Separation erfolgen konnte. Die Werte der CD19+ Fraktion entsprechen damit dem errechneten Anteil an Zellen, die nicht als CD4+, CD8+ oder CD14+ identifiziert werden konnten.

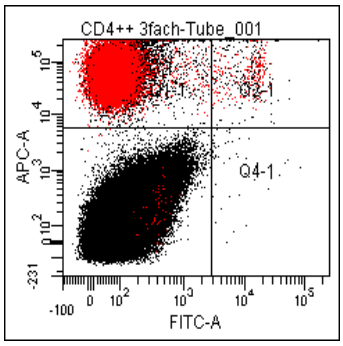
3.5.2 Darstellung einer FACS-Analyse separierter PBMC

Anhand der folgenden Abbildungen soll eine FACS-Analyse von separierten PBMC exemplarisch gezeigt werden. Hier war, um bessere Reinheiten zu erreichen, der Ablauf der MACS-Separation modifiziert worden: die erstmals positiv selektierte Fraktion von CD4+ Zellen wurde erneut über eine CD4+ MACS-Säule gegeben. So reduzierte sich zwar die Ausbeute an CD4+Zellen; durch die zweite Selektion innerhalb der bereits abgetrennten Fraktion kam es aber auch zu weniger Verunreinigungen mit anderen Zellen. In der FACS-Analyse (s. Abb. 3.9) zeigte sich jedoch, bedingt durch die aufwendigere Behandlung, eine abnehmende Vitalität und damit Reduktion der separierten vitalen CD4+ T-Zellen.

Population	Anteil
Q1	14,7%
Q2	0,1%
Q3	84,9%
Q4	0,3%
Q1-1	15,2%
Q2-1	0,4%
Q3-1	84,4%
Q4-1	0%
Q1-3	0%
Q2-3	14,9%
Q3-3	84,5%
Q4-3	0,6%

Tab. 3.9: Statistische Auswertung der Dot-Plot-Analyse in Abb. 3.9.





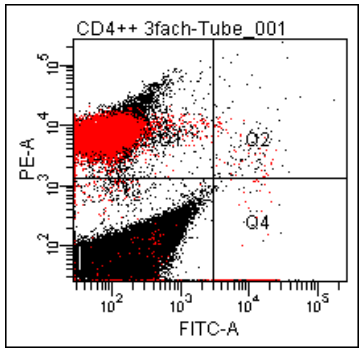
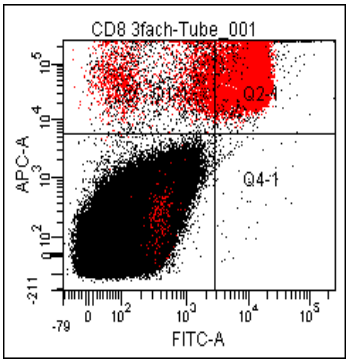
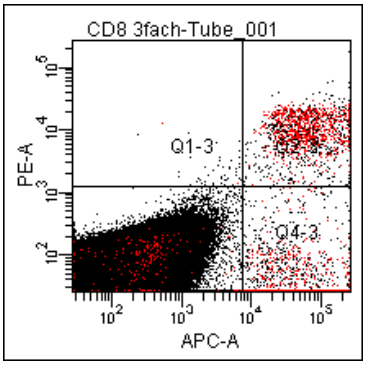


Abb. 3.9: FACS-Analyse der CD4+ T-Zellfraktion der Kontrollperson K20 nach zweifacher Fraktionierung mit einer CD4 MACS-Säule. Fluoreszenz-Markierungen: CD4+ PE, CD45+ APC, CD8+ FITC.

Population	Anteil
Q1	0,3%
Q2	0,1%
Q3	95,9%
Q4	3,7%
Q1-1	1,1%
Q2-1	3,8%
Q3-1	95,1%
Q4-1	0%
Q1-3	0%
Q2-3	0,4%
Q3-3	95,1%
Q4-3	4,5%

Tab. 3.10: Statistische Auswertung der Dot-Plot-Analyse in Abb. 3.10.





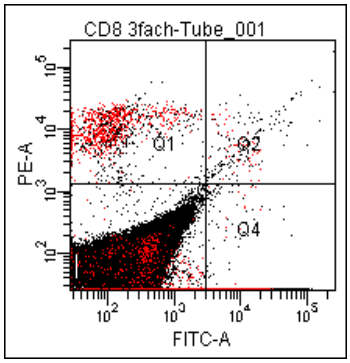


Abb. 3.10 FACS-Analyse der CD8+ T-Zellfraktion der Kontrollperson K20 Fluoreszenz-Markierungen: CD4+ PE, CD45+ APC, CD8+ FITC.

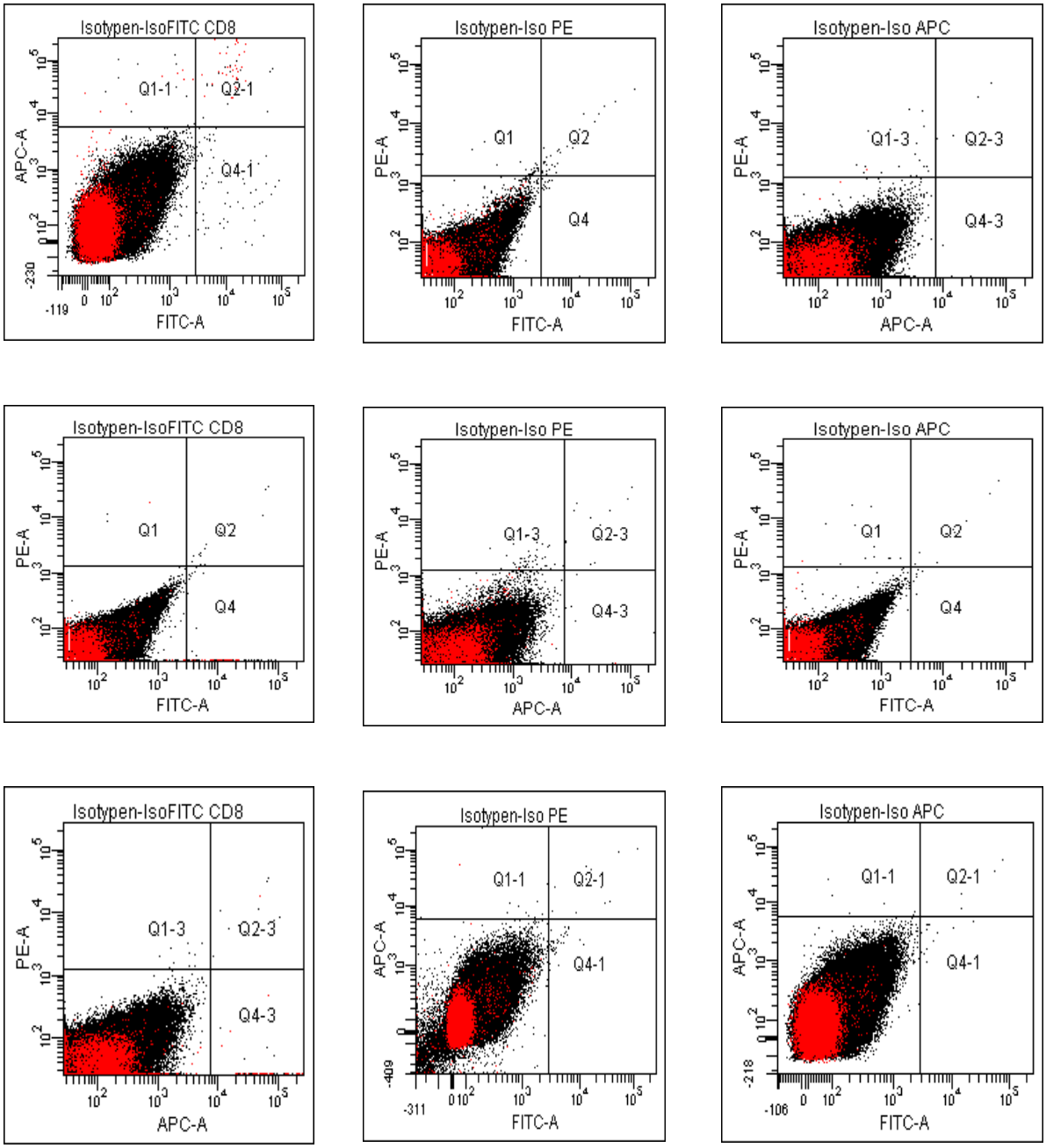


Abb. 3.11:Isotypenkontrolle für die Fluoreszenzen APC, PE und FITC. Fluoreszenz-Markierungen: CD4+ PE, CD45+ APC, CD8+ FITC.

4. Diskussion

4.1 Epstein-Barr-Virus und Rheumatoide Arthritis

Das Epstein-Barr-Virus, ein doppelsträngiges DNA-Virus aus der Gruppe der γ-Herpesviren, wurde 1964 von Michael Epstein und Yvonne Barr in B-Lymphozyten eines afrikanischen Patienten mit Burkitt-Lymphom entdeckt. Die Übertragung geschieht durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion, selten durch Transplantationen oder Bluttransfusionen. Neben der klassischen EBV-Erkrankung, der Infektiösen Mononukleose, wird dieses Virus mit der Entstehung bestimmter B- Zell- und T- Zell-, bzw. NK-Zell-Lymphome in Verbindung gebracht (44). Hierzu zählen das Burkitt-Lymphom, das Hodgkin-Lymphom, das periphere T-Zell-Lymphom, das Nasopharyngeale Karzinom sowie anderen seltenen Erkrankungen. Das Virus wird deswegen häufig als „erstes humanes Tumorvirus“ bezeichnet (44). In jüngerer Zeit wurde es auch als Auslöser oder Verursacher autoimmuner Erkrankungen, wie des Systemischen Lupus Erythematodes, der Multiplen Sklerose, und insbesondere der Rheumatoiden Arthritis (45), diskutiert. In einer Untersuchung zur Pathogenese des Sjögren-Syndroms (Konjunktivitis sicca mit/ohne Xerostomie zusammen mit Kollagenose) zeigte sich, dass eine Gruppe von Patienten mit Sjögren-Syndrom *und* RA im Unterschied zu einer Patientengruppe mit Sjögren-Syndrom *ohne* RA Antikörper hatten, die mit Test-Antigenen aus EBV-transformierten B-Zellen Präzipitate bildeten (44). Dies war einer der ersten Hinweise auf eine mögliche Assoziation der Rheumatoiden Arthritis mit dem Epstein Barr Virus. In mehreren Untersuchungen der Gelenkflüssigkeit von RA-Patienten fanden sich ebenfalls die von Alspaugh und Tan (46) identifizierten und benannten, gegen RANA („rheumatoid arthritis nuclear antigen“) gerichteten Antikörper in EBV-transformierten B-Zellen (47). EBV-DNA konnte in Gelenkpunktaten von RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zwar in mehreren Studien erhöht nachgewiesen werden, ein Zusammenhang zwischen einer spezifischen antiviralen Immunantwort und

einer Autoreaktion ließ sich jedoch bei RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden nicht feststellen.
Ob es dafür einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen EBV und RA gibt, bleibt weiterhin zu klären. Eine Assoziation der RA zu bestimmten, in der Einleitung beschriebenen HLA-Allelen und damit eine genetische Prädisposition hingegen ist gesichert.
Die meisten Autoren gehen davon aus, dass die für Herpesviren typische lebenslange Persistenz im Fall von EBV ausschließlich B-Zellen betrifft. Neben diverser anderer Beschreibungen, die diese Annahme in Frage stellen und – zumindest bei Immunsupprimierten – auch in T-Zellen Virus-DNA nachweisen konnten (48), ist hier auf die Arbeit von A. Respa (49) zu verweisen, die methodisch und thematisch in direktem Bezug zur vorliegenden Dissertation steht. Dort wurde beobachtet, dass sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe T-Zellen und Monozyten möglicherweise infiziert waren. In den hier beschriebenen Untersuchungen wurden ebenfalls in angereicherten T-Zellen und Monozyten EBV-Transkripte detektiert. Dies kann aufgrund der z.T. problematischen Reinheit der untersuchten Zellfraktionen nicht als sicherer Befund für eine T-Zell- oder Monozytenspezifität der Infektion gelten, entspricht aber den Ergebnissen der vorhergehenden Versuche (49) und unterstützt die Hypothese, dass T-Zellen durch eine EBV Infektion direkt beeinflusst werden könnten. Ähnliche Beobachtungen anderer Autoren, die eine Infizierbarkeit aller immunologisch wichtigen Zellklassen feststellten, scheinen diese Vermutung zu erhärten (50, 51, 52).

4.2 Sensitivität und Spezifität der erhobenen Daten

In dieser Arbeit wurde mit klassischen Methoden der molekularen Biologie gearbeitet. Um eine bestmögliche Qualität der Arbeitsschritte zu etablieren, wurden die Methoden mehrfach auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse getestet. Von der zur Gendetektion eingesetzten PCR wurde eine bestmögliche Sensitivität und Spezifität verlangt. Um die Kontaminationsgefahr, die bei Viren

mit hoher Durchseuchungsrate, wie es bei EBV der Fall ist, besteht, zu minimieren, wurde auf steriles Arbeiten und das Mitführen von Leerwerten geachtet. War eines der für die PCR verwendeten Reagenzien, d.h. der Komponenten des Mastermix, fraglich kontaminiert, wurde es verworfen und die Probe als nicht verwertbar angesehen. In der Durchflusszytometrie zeigte sich, dass die Zellfraktionen unterschiedliche Reinheitsgrade aufwiesen. In einem Fall entsprach dies dem Verlauf der Zellseparation (MACS): primär separierte Zellen, die meistens die CD4+-Fraktionen betrafen, wiesen eine geringere Verunreinigung auf als Fraktionen, die am Schluss markiert und sortiert wurden. Auch zeigte sich ein zahlenmäßiger Verlust im Verlauf der Separation, der die einzelnen Fraktionen wahrscheinlich in unterschiedlichem Ausmaß betraf, so dass das Zahlenverhältnis der einzelnen Fraktionen innerhalb einer Vollblutprobe wohl nicht immer der Konstellation in vivo entsprach. Die Behandlung mit den MACS-Beads und die notwendigen Waschschritte führten im Versuchsverlauf auch zu Qualitätseinbußen im Sinne einer Zunahme toter Zellen und damit zu Auswirkungen auf die Anreicherung der Zellen. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass trotz weitestgehender Optimierung der Methode – die Proben wurden umgehend unter sterilen Bedingungen und ständiger Kühlung aller Reagenzien und Gerätschaften verarbeitet - die Markierung und Auftrennung, die Waschschritte, das Zentrifugieren und der Druck, der bei der Elution ausgeübt werden musste, die Vitalität der Zellen insbesondere nach mehreren Durchgängen beeinträchtigte.
Da jedoch nach Etablierung der FACS-Färbungen vor allem für die CD4+ und CD8+ T-Zellen zufriedenstellende Reinheiten erreicht wurden, kann aufgrund der Ergebnisse weiter erhärtet werden, dass das Epstein-Barr-Virus auch T-Zellen infizieren kann.
Beim Bewerten der Ergebnisse spielte auch die Fallzahl eine Rolle. In dieser Arbeit ist sowohl die Kontroll- als auch die Patientengruppe nicht groß genug, um einer Statistik zu genügen. Dennoch können weiterführende Beobachtungen im Verhalten und der Genexpression des Epstein-Barr-Virus in PBMC gemacht werden.

4.3 Detektion des BamHI W-Fragments in DNA von Patientenproben

Bei einigen Patienten (s. 2.5.1, 3.1.3) war vom Labor der Rheumaambulanz am Universitätsklinikum Tübingen routinemäßig neben der HLA-Typisierung der EBV-Status bestimmt worden. In dieser Arbeit zeigten sich zwar alle untersuchten Proben in mindestens einer Fraktion für PCR-amplifizierte DNA- bzw. RNA-Abschnitte positiv; eine sichere Aussage kann jedoch aufgrund fehlender Untersuchungen bei seronegativen Patienten nicht getroffen werden.

4.4 Detektion von EBV-mRNA in den CD4+, CD8+, CD14+ und CD19+ Fraktionen der Patienten- und Kontrollgruppe

In der Patientengruppe waren überraschenderweise fünf der sechs analysierten Probanden (83%) in den angereicherten spezifischen T-Zell-Fraktionen für lytische und/oder latente Transkripte des Epstein-Barr-Virus positiv. Nur bei einem Patienten waren alle Fraktionen negativ für EBV-Transkripte getestet worden. Bei den Patienten mit positiven Proben waren z.T. nicht alle vier separierten Zellfraktionen untersucht worden. Damit blieb offen, inwieweit ein Vorkommen von EBV in T-Zellen in Assoziation zur Infektion in B-Zellen gegeben war. Neben der Schwierigkeit, reine spezifische Zellfraktionen über das MACS-Separationsverfahren zu erhalten, musste davon ausgegangen werden, dass in der CD4+ Zellfraktion neben CD4- unspezifisch kontaminierenden Zellen auch CD4+ unreife Monozyten enthalten sein konnten, die die Interpretation der CD4+ T-Zellen relativieren konnten.
Auch in der Kontrollgruppe zeigte sich, dass bei allen neun untersuchten Probanden (100%) T-Zellen EBV-positiv waren: in sieben Fällen (78%) ließen sich sowohl in der CD4+, als auch in der CD8+ Fraktion Transkripte nachweisen, in zwei Fällen (22%) waren sie nur in der CD4+ Fraktion zu detektieren.

Bei fünf von sechs Patienten (83%) ließen sich Transkripte in Monozyten nachweisen. Bei drei dieser Nachweise (50%) handelte es sich um EBER1-Transkripte als Hinweis auf eine Infektion der Zelle. Bei zwei (33%) Patienten zeigten sich nur BZLF1- bzw. EBNA2-Transkripte.
Vorkommen und Fähigkeit zur Replikation von EBV in Monozyten waren elektronenmikroskopisch von Savard et. al. (53) gezeigt worden. In diesen Untersuchungen waren 20% der Monozyten mit dem Epstein-Barr-Virus infiziert. Die zu erwartende Infektion von CD19+ B-Zellen, d.h. positiver Nachweis von EBER1-Transkripten, konnte nur bei zwei Probanden (33%) in der Patientengruppe erbracht werden.
In der Kontrollgruppe von 9 Personen enthielten Monozyten in vier Fällen (44%) EBV-Transkripte, hiervon nur in 2 Fällen (22%) EBER1-Transkripte.
In der B-Zell-Fraktion wurde in sechs Fällen (67%) EBV-Transkripte nachgewiesen, davon in 4 Fällen (44%) EBER1-Transkripte.
In dieser Arbeit schien EBV in Monozyten (positives EBER1-Transkript) häufiger (50%) in der Patientengruppe als in der Kontrollgruppe (22%) nachweisbar zu sein. Umgekehrt häufig schien die Infektion der B-Zellfraktion zu sein: 44% in der Kontrollgruppe und 33% in der Patientengruppe. Diese Werte müssen jedoch ebenfalls vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Datenqualität betrachtet werden.

4.5 Detektion lytischer und/oder latenter Transkripte in PBMC der Studienteilnehmer

Wie in der Einleitung beschrieben, sollten die detektierten Transkripte einen Hinweis auf die Infektionsphase ergeben, in denen das Virus in den jeweiligen positiven Zellfraktionen vorlag. EBNA1, EBER1 und LMP1 sind die für die verschiedenen Latenzformen spezifisch, während BZLF- und BMLF-Transkripte nur während der lytischen Phase nachweisbar sind.
In der Patientengruppe wurde beobachtet, dass EBNA2-Transkripte bei zwei Patienten (33%) vorkamen, einmal in der CD8+ T-Zellfraktion, und einmal in der

Monozytenfraktion. Transkripte von EBER1 konnten bei vier von sechs Patienten (67%) detektiert werden; bei zwei Patienten in allen vier Zellfraktionen, bei einem Patienten in der CD4+ und CD14+ Fraktion, und bei einem weiteren in der CD4+und CD8+ Fraktion. Lytische Transkripte wurden nur von BZLF, und zwar insgesamt bei drei Patienten (50%) vorgefunden. Bei allen war die Monozytenfraktion positiv, bei einem zusätzlich die CD4+ Fraktion, und bei einem die CD4+ und die CD19+ Fraktion.
In der Gruppe der Kontrollpersonen wurden Transkripte von EBNA1/2 zweimal (22%), in der CD4+ (EBNA2) bzw. in der CD8+-Fraktion (EBNA1), nachgewiesen. EBER-Transkripte wurden bei fünf der neun Kontrollen (56%) gefunden, davon zweimal in allen vier analysierten Zellfraktionen; in allen fünf positiven Personen waren auch CD4+ Zellen betroffen.
Transkripte der Lyse (BZLF1, BMLF1) wurden insgesamt bei fünf Personen (56%) festgestellt: von BZLF bei vier Personen in einer oder beiden T-Zellfraktionen, einmal zusätzlich in der CD19+ Fraktion. Das BMLF-Transkript war bei zwei Personen (22%) positiv – einmal in beiden T-Zellfraktionen, einmal nur in der CD4+ Fraktion.
Nach diesen Befunden scheinen vor allem gesunde Personen lytisch infizierte Zellen in allen untersuchten Zellfraktionen aufweisen zu können.

4.6 Ausblick

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wäre es denkbar, dass EBV in einem bisher nicht beschriebenen Umfang neben B-Zellen auch andere Zellpopulationen in PBMC infizieren kann. Die genauen pathogenetischen Mechanismen, hierfür evtl. notwendigen Rezeptoren, sowie die notwendigen permissiven Umstände für eine Infektion von T-Zellen oder Monozyten sind jedoch bisher nicht bekannt. In der oben zitierten Arbeit von Savard et. al. (53) wird eine Penetration des Virus in Monozyten durch Adsorption an einen noch unbekannten Faktor diskutiert.

Die bisher gemachten Beobachtungen der karzinogenen Potenz des EBV sind ebenfalls noch nicht im Einzelnen verstanden. In welchem Differenzierungsstadium der Zelle eine EBV-Infektion möglicherweise die Mutation zur Tumorzelle auslösen kann, und durch welche Mechanismen Kontrolle über die Zellproliferation ausgeschaltet wird, bleibt zu erforschen.
Bei der Rheumatoiden Arthritis führt das Epstein Barr Virus zu einer Störung der Antigenpräsentation, des Apoptoseverhaltens und der Zytokinexpression in infizierten Zellen (54). Jedoch scheint die Proliferationskapazität der CD4+ Zellen bei der RA stark verringert, der hierdurch erhöhte Anteil seneszenter T-Zellen zeigt sich Apoptose-resistent. Diese Modulation des T-Zell-Repertoires war und ist wiederholt Thema von Forschungsarbeiten.

Als Fortsetzung dieser Arbeit und der Diplomarbeit von A. Respa (49) wäre es interessant und notwendig, Zellen mit spezifisch gegen EBV Proteine gerichteten, fluoreszenzmarkierten Antikörpern am FACS zu untersuchen und somit die Infektion verschiedener Zellpopulationen zu bestätigen. Darüber hinaus bedarf es weiterer Analysen und Verbesserungen der Zellsortierung, evtl. auch über FACS-Sortierung, um diese Beobachtungen in ihren Aussagen auch für die Rheumatoide Arthritis zu erhärten.

5. Zusammenfassung

Für die EBV-Infektion wird seit längerem eine pathogenetische Bedeutung in der Rheumatoiden Arthritis (RA) bei genetisch prädisponierten Personen diskutiert. Mehrfach beschrieben ist bei RA-Patienten eine erhöhte Viruslast von EBV und einigen anderen Viren in Blutzellen, sowie antivirale T-Zellreaktionen, die mit synovialen Antigenen kreuzreagieren.
In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich RA-Patienten und gesunde Kontrollpersonen bezüglich ihres EBV-Infektionsstatus in Blutzellen unterscheiden.
Hierfür wurden von einer Patientengruppe und einer Kontrollgruppe PBMC mittels eines Lymphozytenseparationsverfahrens (MACS) in T-Zellen (CD4+ und CD8+), B-Zellen (CD19+) und Monozyten (CD14+) aufgetrennt. Aus den verschiedenen Zellfraktionen wurde nach Testung ihrer Reinheit RNA isoliert und mit Hilfe von PCR Analysen auf Vorkommen lytischer und latenter Transkripte von EBV vergleichend bei Gesunden und RA-Patienten überprüft. Als am besten reproduzierbar und damit als sicherstes Zeichen für eine EBV-Infektion hatte sich der Nachweis des EBER1-Transkripts gezeigt, so dass den Aussagen über den Infektionsstatus einer Zellpopulation der positive oder negative Nachweis eines EBER1-Transkripts zugrunde liegt.
Insgesamt wurde beobachtet, dass bei vier von sechs Patienten und bei fünf von neun Kontrollpersonen die CD4+ oder CD8+ Zellfraktion EBER1-Transkripte enthielt. Der Nachweis des BMLF1-Transkripts blieb bei allen gestesten Patienten negativ; in der Kontrollgruppe konnte BMLF1 einmal in beiden T-Zellfraktionen, einmal in der CD4+ Fraktion detektiert werden. EBNA2 als Transkript des Latenzstadiums wurde in der Patientengruppe bei zwei von sechs Personen, in der Kontrollgruppe bei einer von neun Person nachgewiesen.
Methodisch kritisch zu bewerten bleibt die Reinheit der einzelnen Zellfraktionen. In der FACS-Analyse zeigten sich Reinheiten von 81-94% bei den CD4+ und CD8+ Zellfraktionen, von ca. 78% bei den CD19+ B-Zellen und nur von ca. 64% bei den Monozyten.

Die Ergebnisse beziehen sich auf eine kleine Patienten- und Kontrollgruppe und bedürfen einer Erhärtung bzw. Bestätigung durch eine wesentlich höhere Fallzahl. Insgesamt stehen sie jedoch in einer Reihe von Berichten über die mögliche Rolle der EBV-Infektion bei der Rheumatoiden Arthritis und über eventuelle Einflüsse auf immunologische Reaktionen, die diese Erkrankung kennzeichnen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
BSA	„bovine serum albumin“ (Albumin aus Rinderserum)
Ca^{2+}	Calcium
$CaCl_2$	Calciumchlorid
℃	Grad Celsius
CD	„cluster of differentiation“ (Oberflächenantigen)
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Zytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSA	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2’-Desoxyribonukleosid-5’-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
et al.	„et alii“ („und andere“)
FACS	„fluorescence activated cell sorting”
FCS	„fetal calf serum“ (fetales Kälberserum)
Fg	Femtogramm
FITC	Fluoreszeinsothiocyanat
FL	Fluoreszenzlicht
FSC	„forward scatter“ (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
g	Schwerebeschleunigung
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IFNγ	Interferon gamma

IL	Interleukin
K (K1, 2 usw.)	Kontrollperson
kb	Kilobasenpaare (1kb = 1000bp)
l	Liter
M	Molar
MACS	“magnetic activated cell separation”
Mg^{2+}	Magnesium
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minuten
Mio	Millionen
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
n.t.	“not tested”
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
P (P1, 2 usw.)	Patient
PBMC	“peripheral blood mononuclear cells”
PBS	“phosphate buffered saline”
PCR	“polymerase chain reaction”
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat

SSC	„side scatter“ (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
Taq	DNA-Polymerase aus dem Bakterium Thermophilus aquaticus
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt

7. Literaturverzeichnis

1. Arnett Frank C, Edworthy Steven M, Bloch Daniel A, McShane Dennis J, Fries James F, Cooper Norman S, Healey Louis A, Kaplan Stephen R, Liang Matthew H, Luthra Harvinder S, Medsger Thomas A Jr, Mitchell Donald M, Neustadt David H, Pinals Robert S, Schaller Jane G, Sharp John T, Wilder Ronald L, Hunder Gene G.1988. The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 31: 315-324.

2. Weyand Cornelia M, Xie Congping, Goronzy Jörg J.1992. Homozygosity for the HLA-DRB1 Allele Selects for Extraarticular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. *J Clin Invest.* 89: 2033-2039.

3. Cassidy JT, Levinson JE, Bass JC, Baum J, Brewer EJ Jr, Fink CW, Hanson V, Jacobs JC, Masi AT, Schaller JG, Fries JF, McShane D, Young D. 1986. A Study of Classification Criteria for Diagnosis of Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 29: 274-281.

4. Pap Thomas, Franz Juliane K, Hummel Klaus M, Jeisy Elvira, Gay Renate, Gay Steffen. 1999. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis Res.* 2:59-64

5. Varadé J, Loza-Santamaria E, Fernández-Arquero M, Lamas JR, de Los Angeles Figueredo M, Javer JA, de la Concha EG, Rodriguez L, Urcelay E, Fernández-Gutiérrez B, Martinez-Doncel A. 2009. Shared epitope and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies: relationship with age at onset and duration of disease in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 36(5):1085-6.

6. Weissmann Gerald. 2006. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Bull Hosp Jt Dis.* 64: 12-15.

7. Kim Kyoung-Woon, Cho Mi-La, Park Mi-Kyung, Yoon Chong-Hyeon, Park Sung-Hwan, Lee Sang-Heon, Kim Ho-Youn. 2004. Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor κB-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 7: R139-148.

8. De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, Vivarelli M, Muratori F, Berni S, Ballanti P, Ferrari S, Teti A. 2006. Impaired skeletal develpement in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum.* 54:3551-63

9. Okameto H, Hoshi D, Kiire A, Yamanaka H, Kamatani N. 2008. Molecular targets of rheumatoid arthritis. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 7(1):53-66.

10. Seemayer CA, Distler O, Kuchen S, Muller-Ladner U, Michel BA, Neidhart M, Gay R, Gay S. 2001. Rheumatoid arthritis: new developments in the pathogenesis with special reference to synovial fibroblasts. *Z Rheumatol.* 60 (5): 309-318.

11. Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. Basislehrbuch Innere Medizin. 3. Auflage.2004 *Urban & Fischer Verlag,* München/Jena.

12. Wagner U. et al. 1997. HLA Markers and Prediction of Clinical Course and Outcome in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*. 40(2): 341-51.

13. Klatt Tatjana, Ouyang Qin, Flad Thomas, Kötter Ina, Bühring Hans-Jörg, Kalbacher Hubert, Pawelec Graham, Müller Claudia A. Expansion of Peripheral CD8+ CD28- T Cells in Response to Epstein-Barr Virus in Patients with Rheumatoid Arthritis. 2005. *J Rheumatol.* 32: 239-251.

14. Weyand CM, Goronzy JJ. 2002. Premature immunosenecence in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 29:1141-6.

15. Albani S, Carson DA. 1996. A Multistep Molecular Mimicry Hypothesis for the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunol Today.* 17: 466-470

16. Young Raymond, Powers Daniel, Johnson Kent, Amento Edward, Car Dianne, Laing Timothy, Yang Jun, Chang Sandra, Hemati Nahid, Richardson Bruce. 1996. Mechanisms of Drug-induced Lupus II. T Cells Overexpressing Lymphocyte Function-accociated Antigen 1 Become Autoreactive and Cause a Lupuslike Disease in Syngeneic Mice. *J. Clin Invest.* 97: 2866-2871.

17. Costenbader Karen H, Karlson Elizabeth W. 2006. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: is there a link? *Arthritis Res Ther.* 8: 204

18. Kotsiopriftis Maria, Tanner Jerome E., Alfieri Caroline. 2005. Heat Shock Protein 90 Expression in Epstein-Barr Virus-Infected B Cells promotes γδ T-Cell Proliferation in Vitro. *J Virol*. 79: 7255-7261.

19. Louis CU, Straathof K, Bollard CM, Gerken C, Huls MH, Gresik MV, Wu MF, Weiss HL, Gee AP, Brenner MK, Rooney CM, Heslen HE, Gottschalk S. 2009. Enhancing the in vivo expansion of adoptively transferred EBV-specific CTL with lymphodepleting CD45 monoclonal antibodies in NPC patients. *Blood*. 113(11): 2442-50.

20. Arrand JR, Rymo L. 1982. Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J Virol.* 41: 376-389.

21. Miyashita Emily M., Yang Bin, Babcock Gregory J, Thorley-Lawson David A. 1997. Identification of the Site of Epstein-Barr Virus Persistence In Vivo as a Resting B Cell. *J Virol.* 71: 4882-4891.

22. Savard M, Belanger C, Tardif M, Gourde P, Flamand L, Gosselin J. 2000. Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol.* 74:2612-2619.

23. Dreyfus DH, Nagasawa M, Kelleher CA, Gelfand EW. 2000. Stable expression of Epstein-Barr virus BZLF-1-encoded ZEBRA protein activates p53-dependent transcription in human Jurkat T-lymphoblastoid cells. *Blood.* 96: 625-634.

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

25. Tanner J, Whang Y, Sample J, Sears A, Kieff E. 1988. Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J Virol*. 62: 4452-4464.

26. Woisetschlaeger Maximilian, Yandava Chandra N, Furmanski Lisa A, Strominger Jack L, Speck Samuel H. 1990. Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *PNAS*. 87: 1725-1729.

27. Sadler Robert H, Raab-Traub Nancy. 1995. The Epsein-Barr Virus 3.5-Kilobase Latent Membrane Protein 1 mRNA Initiates from a TATA-Less Promoter within the First Terminal Repeat. *J. Virol*. 69: 4577-4581.

28. Wilson JB, Bell JL, Levine AJ. 1996. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J*. 15: 3117-3126.

29. Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, Imreh S, Steigerwald-Mullen PM, Klein G, Kurilla MG, Masucci MG. 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature.* 375: 685-688.

30. Knutson JC. 1990. The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J Virol.* 64:2530-6.

31. Fahraeus R, Jansson A, Ricksten A, Sjoblom A, Rymo L. 1990. Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 activates the viral latent membrane protein promoter by modulating the activity of a negative regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 7390-7394.

32. Henkel T, Ling PD, Hayward SD, Peterson MG. 1994. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science.* 265: 92-95

33. Sinclair Alison J, Palmero Ignacia, Peters Gordon, Farrell Paul J. 1994. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G_0 to G_1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J*. 13: 3321-3328.

34. Tomkinson B, Robertson E, 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

35. Chen Adrienne, Zhao Bo, Kieff Elliott, Aster Jon C, Wang Fred. EBNA-3B- and EBNA-3C-Regulated Cellular Genes in Epstein-Barr Virus-Immortilized Lymphoblastoid Cell Lines. 2006. *J. Virol.* 80: 10139-10150.

36. Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickinson A. 1991. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell.* 65: 1107-1115.

37. Laux Gerhard, Perricaudet Michel, Farrell Paul J. 1988. A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularizytion of the linear viral genome. *EMBO J.* 7: 769-774.

38. Fruehling S, Lee SK, Herrold R, Frech B, Laux G, Kremmer E, Grasser FA, Longnecker R.1996. Identification of latent membrane protein 2A (LMP2A) domains essential for the LMP2A dominant-negative effect on B-lymphocytes surface immunoglobulin signal transduction. *J Virol.* 70: 6216-6226.

39. Bhat RA, Thimmappaya B. 1983. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus can functionally substitute for the virus-associated RNAs in the lytic growth of adenovirus 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80: 4789-4793.

40. Greiffenegger Norbert, Jäger Michael, Kunz-Schughart Leoni A, Wolf Hans, Schwarzmann Fritz. 1998. Epstein-Barr Virus Small RNA (EBER) Genes: Differential Regulation during Lytic Viral Replication. *J Virol.* 72: 9323-9328.

41. Sharp TV, Schwemmle M, Jeffrey I, Laing K, Mellor H, Proud CG, Hilse K, Clemens MJ. 1993. Comparative analysis of the regulation of the

interferon –inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Res.* 21: 4483-4490.

42. Kenney S, Holley-Guthrie E, Mar EC, Smith M. 1989. The Epstein-Barr virus BMLF1 promoter contains an enhancer element that is responsive to the BZLF1 and BRLF1 transactivators. *J Virol.* 63: 3878-3883.

43. Blaschke S, Schwarz G, Meneke D, Binder L, Müller G, Reuss-Bart M. 2000. Epstein-Barr virus infection in peripheral blood mononuclear cells, synovial fluid cells, and synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 27(4):866-73.

44. Carbone A, Gloghini A, Dotti G. 2008. EBV-Associated Lymphoproliferative Disorders: Classification and Treatment. *Oncologist* 13:577-585.

45. Balandraud N, Roudier J, Roudier C. 2004. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 3(5):362-7.

46. Alspaugh MA, Tan EM. 1975. Antibodies to Cellular Antigens in Sjogren's Syndrome. *J Clin Invest.* 55:1067-73.

47. Mehrhaein Y, Lennerz C, Ehlhardt S, Remberger K, Ojak A, Zang KD. 2004. Latent Epstein–Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-in situ hybridization. *Mod Pathol.* 17:781-9.

48. Tokuhira M, Iizuka A, Watanabe R, Sekiguchi N, Sato N, Chien CK, Sekiguchi Y, Nemoto T, Hanzawa K, Tamaru J, Itoyama S, Suzuki H, Takeuchi T, Mori S, Kizaki M. 2008. Severe degenerative change of multiple organs mediated by chronic active Epstein-Barr virus infection with infected T-cell expansion. *Int J Hematol.* 87(5): 520-6.

49. Respa A. 2005. EBV und Rheumatoide Arthritis. Diplomarbeit im Fach Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

50. Tugizov S, Herrera R, Veluppillai P, Greenspan J, Greenspan D, Palefsky JM. 2007. Epstein-Barr Virus (EBV)-Infected Monocytes Facilitate Dissemination of EBV within the Oral Mucosal Epithelium. *J Virol.* 81(11):5484-96.

51. Walling DM, Ray A, Nichols JE, Flaitz CM,3 Nichols CM. 2007. Epstein-Barr Virus Infection of Langerhans Cell Precursors as a Mechanism of Oral Epithelial Entry, Persistence, and Reactivation. *J Virol.* 81(13):7249-68

52.. Isobe Y, Sugimoto K, Yang L, Tamayose K, Egashira M, Kaneko T, Takada K, Oshimi K. 2004. Epstein-Barr Virus Infection of Human Natural Killer Cell Lines and Peripheral Blood Natural Killer Cells. *Cancer Res*. 64:2167-74.

53. Savard M, Belanger C, Tardif M, Gourde P, Flamand L, Gosselin J. 2000. Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol.* 74:2612-9

54. Ohga S, Nomura A, Takada H, Hara T. 2002. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit Rev Oncol Hematol.* 44:203-15.

8. Danksagung

Für die gute Betreuung bei der vorliegenden Dissertation sowohl während der Zeit im Labor, als auch beim Schreiben möchte ich Frau Prof. Claudia Müller meinen herzlichen Dank aussprechen. Für mich als damalige Studentin der Medizin war das experimentelle Arbeiten im Labor zu Beginn eine völlig neue Erfahrung, in die ich mich langsam eingefunden habe. Deshalb war ich Frau Prof. Müller, und Frau Steiert, MTA, für ihre Hilfestellung und kompetente Beratung bei Problemen während der Versuche sehr dankbar. Beim schriftlichen Verfassen der Arbeit hatte ich mit Frau Prof. Müller eine Betreuerin, bei der ich immer mit der raschen Beantwortung meiner Fragen und Besprechen der Manuskripte rechnen konnte.

In vielerlei Hinsicht haben mich bei der Entstehung der Promotion und während meines Medizinstudiums in Tübingen meine Eltern Angelika und Franjo Kovačić unterstützt. Sie haben mir Studium und Promotion nicht nur ermöglicht, sondern mich immer wieder ermutigt und mir schon lange vorher die nötigen persönlichen Grundlagen für meinen Berufswunsch – meinen Wunschberuf - vermittelt. Ihnen gilt dafür mein besonderer Dank.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle auch allen Patienten und allen Kontrollpersonen danken, die sich ohne Gegenleistung bereiterklärt haben, für diese Arbeit eine Blutprobe abzugeben.

Ein großes „Danke“ meinem damaligen Freund und jetzigen Mann Nicolai, der mir moralisch und fachlich zur Seite stand, so dass ich die Energien, die eine wissenschaftliche Arbeit parallel zum Studium erfordert, aufbringen konnte und der mir bei Steinen auf dem Weg immer geholfen hat, diese zu beseitigen.

9. Lebenslauf

Personalien	Lara Netzhammer, geb. Kovačić geboren am 29. Juni 1982 in Freiburg im Breisgau
Schule	
1988-1992	Grundschule in Radolfzell
1992-2001	Friedrich-Hecker-Gymnasium in Radolfzell
2001	Abitur
Freiwilliger Sozialer Dienst	
07/01-02/02	Heim für Obdachlose und Bedürftige „Santa Ana y San Joaquin“ in Santo Domingo de los Colorados, Ecuador.
Medizinstudium	
04/02	Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
03/04	Physikum (= Ärztliche Vorprüfung)
04/04-02/07	Klinischer Studienabschnitt
02/07-02/08	Praktisches Jahr:
1. Tertial	Wahlfach Allgemeinmedizin; Lehrpraxis in Hirrlingen
2. Tertial	Unterassistentin in der Inneren Medizin am Bürgerspital Solothurn, Schweiz
3. Tertial	Viszeral- und Unfallchirurgie am Marienhospital in Stuttgart
16.05.2008	Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen) an der Universität Tübingen
Promotionsarbeit	Experimentelle Forschungsarbeit in der Sektion Immunologie und Transplantationshämatologie unter Anleitung von Frau Prof. Dr. C. Müller.
Berufliche Laufbahn	
seit 09/08	Assistenzärztin für Innere Medizin am St. Josefskrankenhaus in Potsdam