

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

**Das Kaposi-Sarkom assoziierte herpesvirale Protein vIRF4 als  
Interaktionspartner des zellulären DNA-Bindeproteins CBF1  
und  
seine Rolle als transkriptioneller Regulator zellulärer Zielgene**



**Katharina Heinzelmann**

München, November 2011

**Dissertation eingereicht am 1. Juni 2011**

Erstgutachterin: Prof. Dr. Bettina Kempkes

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

**Tag der mündlichen Prüfung: 29. November 2011**

## Publikationen

Teil A der vorliegenden Dissertation wurde veröffentlicht in:

Heinzelmann K, Scholz BA, Nowak A, Fossum E, Kremmer E, Haas J, Frank R, Kempkes B. (2010). **Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Viral Interferon Regulatory Factor 4 (vIRF4/K10), a novel interaction partner of CSL/CBF1, the major downstream effector of Notch signaling.** J. Virol. 2010 Dec;84(23):12255-64.

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Epidemiologie .....	5
1.1.2 KSHV assoziierte Erkrankungen .....	6
1.1.2.1 Kaposi-Sarkom.....	6
1.1.2.2 Primäres Effusionslymphom .....	8
1.1.2.3 Multizentrische Castleman-Erkrankung .....	9
1.1.3 Das Genom des KSHV .....	10
1.1.4 Der virale Lebenszyklus von KSHV.....	11
<b>1.2 Virale Interferon regulatorische Faktoren .....</b>	<b>13</b>
1.2.1 Gemeinsame Kennzeichen .....	13
1.2.2 Der virale Interferon regulatorische Faktor 4 (vIRF4).....	14
<b>1.3 Der Notch-Signalweg .....</b>	<b>16</b>
1.3.1 Die Primärstruktur von Notch .....	17
1.3.2 Aktivierung des Notch-Signalwegs.....	18
1.3.3 Das CSL-Protein und seine Funktion im Notch-Signalweg.....	19
1.3.3.1 Das zelluläre Effektormolekül CBF1 .....	19
1.3.3.2 Die Interaktion von Notch und CBF1 und die Aktivierung von Notch-Zielgenen ....	20
<b>1.4 Modulation des Notch-Signalwegs durch virale Proteine .....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Zielsetzung.....</b>	<b>25</b>
<b>2 Material .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Hefestamm .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Bakterienstämme .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Zelllinien.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4 Oligonukleotide/Primer.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Plasmide.....</b>	<b>31</b>
<b>2.6 Antikörper .....</b>	<b>34</b>
<b>2.7 Materialien für die Kultur von Bakterien und Hefen .....</b>	<b>35</b>
<b>2.8 Materialien für die Kultur humaner Zelllinien.....</b>	<b>35</b>
<b>2.9 DNA- und Protein- Standards .....</b>	<b>36</b>
<b>2.10 Enzyme und Reaktionssysteme .....</b>	<b>36</b>
<b>2.11 Chemikalien und Reagenzien .....</b>	<b>37</b>
<b>2.12 Verbrauchsmaterial.....</b>	<b>37</b>
<b>2.13 Laborausstattung.....</b>	<b>38</b>
<b>2.14 Software und Datenbanken.....</b>	<b>39</b>
<b>3 Methoden .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Arbeiten mit Bakterien.....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien .....	40
3.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ nach der CaCl <sub>2</sub> Methode .....	40
3.1.3 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien durch Hitzeschock.....	41
3.1.4 Bestimmung der Transformationseffizienz .....	41
<b>3.2 Arbeiten mit Hefe .....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Hefetransformation mit der Licium-Acetat-Methode.....	41
3.2.2 Test auf Selbstaktivierung .....	42
<b>3.3 Arbeiten mit Säugerzellen .....</b>	<b>42</b>
3.3.1 Kultivierung von Säugerzellen .....	42
3.3.1.1 Adhärente Zelllinien .....	43
3.3.1.2 Suspensionszellen .....	43
3.3.2 Bestimmung der Zellzahl.....	43
3.3.3 Aufbewahrung von Zellen.....	43
3.3.4 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen nach der PEI-Methode .....	44
3.3.5 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit dem „FuGENE <sup>®</sup> “ Reagenz .....	44
3.3.6 Analyse von Zellen durch FACS ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> ).....	45
3.3.6.1 Propidiumiodidfärbung zur lebend/tot-Analyse von Zellen .....	45

3.3.6.2	Nachweis des NGFR.....	45
<b>3.4</b>	<b>Arbeiten mit RNA .....</b>	<b>46</b>
3.4.1	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen .....	46
3.4.2	Markierung nascenter RNA und RNA-Präparation .....	46
3.4.3	Anreicherung nascenter, 4sU-markierter RNA.....	47
3.4.4	Agarose-Gelelektrophorese von RNA.....	47
3.4.5	DNase Verdau von RNA .....	48
3.4.6	Reverse Transkription in cDNA .....	48
3.4.7	Genexpressionsanalyse unter Verwendung von GeneChip Gene 1.0 ST Arrays .....	48
<b>3.5</b>	<b>Arbeiten mit DNA .....</b>	<b>50</b>
3.5.1	Schnelle Plasmidisolierung .....	50
3.5.2	Präparative Plasmidisolierung.....	50
3.5.3	Fällung von Nukleinsäuren.....	50
3.5.4	Spektrometrische Bestimmung des Nukleinsäuregehalts.....	50
3.5.5	Restriktionsverdau von DNA .....	51
3.5.6	Klenow-Nukleotidergänzung .....	51
3.5.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	51
3.5.8	Konventionelle PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> ).....	52
3.5.9	Herstellung kurzer doppelsträngiger DNA aus synthetischen Oligonukleotiden.....	53
3.5.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	54
3.5.11	Zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese .....	54
3.5.12	Klonierung von Plasmidvektoren.....	55
3.5.12.1	Konventionelle Klonierung.....	55
3.5.12.2	Das Gateway®-Klonierungssystem: BP- und LR-Reaktion.....	56
3.5.13	Sequenzierung von DNA.....	57
3.5.14	Quantifizierung von cDNA durch <i>Real-time</i> PCR.....	57
<b>3.6</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>59</b>
3.6.1	Expression und Reinigung von Fusionsproteinen .....	59
3.6.2	Herstellung von Zelllysaten .....	60
3.6.3	Zellfraktionierung .....	60
3.6.4	Koimmunpräzipitationen.....	61
3.6.4.1	Koimmunpräzipitation nach Transfektion von HEK293-Zellen .....	61
3.6.4.2	Koimmunpräzipitation nach endogener Proteinexpression .....	61
3.6.5	Konzentrationsbestimmung nach Bradford .....	61
3.6.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	62
3.6.7	Coomassie-Färbung zur Detektion von Proteinen im SDS-Gel .....	62
3.6.8	Westernblot .....	63
3.6.9	Quantifizierung von Proteinmengen mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems „FusionFX7“ von Peqlab .....	63
3.6.10	Radioaktive <i>in vitro</i> Translation .....	64
3.6.11	Radioaktive Detektion eines Peptidblots .....	64
<b>3.7</b>	<b>Konfokalmikroskopie.....</b>	<b>64</b>
3.7.1	Immunfluoreszenzfärbung.....	64
3.7.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie .....	65
3.7.3	Elektronische Bildbearbeitung.....	65
<b>3.8</b>	<b>Bioinformatische Methoden.....</b>	<b>66</b>
3.8.1	Clusteranalyse.....	66
3.8.2	Bioinformatische Promotoranalyse.....	66
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>67</b>
<b>A)</b>	<b>Charakterisierung der vIRF4/CBF1-Interaktion.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Biochemische Bestätigung der Interaktion von endogen exprimiertem vIRF4 und CBF1 in humanen Zelllinien .....</b>	<b>67</b>
4.1.1	Herstellung eines vIRF4-spezifischen Antikörpers.....	68
4.1.2	Kinetik der vIRF4-Expression in den Zelllinien BCBL-1 und BC-1.....	68
4.1.3	Komplexbildung von endogen exprimiertem vIRF4 und CBF1 in BCBL-1-Zellen .....	70
4.1.4	Spezifische Interaktion von vIRF4 mit CBF1.....	71
<b>4.2</b>	<b>Kartierung der mit CBF1 interagierenden Region im vIRF4 Protein.....</b>	<b>73</b>
4.2.1	Bindungsstudien im Hefe- <i>Two-Hybrid</i> -System .....	74
4.2.1.1	Das Hefe- <i>Two-Hybrid</i> -System .....	74
4.2.1.2	Die Bindung an CBF1 erfolgt in vIRF4 im Aminosäurebereich 201-240 .....	75
4.2.2	Feinkartierung der CBF1 bindenden Region im vIRF4-Protein durch Peptidblot-Hybridisierung .....	76

4.2.3	Bestätigung und Vergleich der Bindungsstärken beider vIRF4-Fragmente im Hefe- <i>Two-Hybrid</i> -System .....	78
4.2.4	Das vIRF4-Protein bindet über ein Tetrapeptidmotiv an CBF1 .....	80
4.2.4.1	Herstellung von vIRF4-Punktmutanten .....	80
4.2.4.2	Die Analyse der vIRF4-Punkt- und -Deletionsmutanten im Hefe- <i>Two-Hybrid</i> -System und in den Säugerzellen HEK293 zeigt eine binäre Interaktion mit CBF1 .....	81
4.2.4.3	Die Aminosäuren Tryptophan und Prolin sind Teil eines Tetrapeptidmotivs ähnlich dem von Notch und EBNA2 .....	85
<b>B)</b>	<b>Identifizierung von zellulären Zielgenen des vIRF4-Proteins</b> .....	<b>86</b>
<b>4.3</b>	<b>Identifizierung von zellulären Zielgenen unter Verwendung eines konditionalen Zellsystems</b> .....	<b>86</b>
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung der Zelllinien tet-vIRF4-BC-1 und tet-vIRF4 mt-BC-1</b> .....	<b>88</b>
4.4.1	Doxycyclin-Titration zur Induktion von vIRF4 wt und vIRF4 mt .....	88
4.4.2	Kinetik der vIRF4-Expression in den konditionalen Zelllinien .....	92
<b>4.5</b>	<b>Vergleich der subzellulären Lokalisation des vIRF4-Wildtyps und der vIRF4-Mutante</b> .	<b>93</b>
4.5.1	Einzelzellanalyse mit Hilfe der Konfokalmikroskopie .....	94
4.5.2	Zellfraktionierung zur Quantifizierung des Expressionslevels .....	97
<b>4.6</b>	<b>Genomweite Identifizierung zellulärer Zielgene des vIRF4</b> .....	<b>99</b>
4.6.1	Durchführung von Genexpressionsarrays unter Verwendung von Gesamt-RNA.....	100
4.6.2	Genexpressionsanalyse unter Verwendung nascenter RNA.....	102
4.6.3	Ergebnis der Zielgensuche.....	105
<b>4.7</b>	<b>Bestätigung ausgewählter Zielgene durch <i>Real-time</i> PCR</b> .....	<b>111</b>
4.7.1	vIRF4 induziert zelluläre Gene .....	112
4.7.2	Fungiert vIRF4 als Repressor? .....	117
4.7.3	Weitere Untersuchungen zur Repression von Zielgenen.....	118
<b>4.8</b>	<b>Untersuchung der CBF1-abhängigen Induktion von vIRF4-Zielgenen</b> .....	<b>121</b>
4.8.1	Bioinformatische Promotoranalyse auf potentielle CBF1-Bindestellen.....	122
4.8.2	vIRF4 reguliert EGR1 CBF1-abhängig.....	123
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>127</b>
<b>A)</b>	<b>Charakterisierung der vIRF4/CBF1-Interaktion</b> .....	<b>128</b>
<b>5.1</b>	<b>Spezifische Interaktion von vIRF4 mit CBF1</b> .....	<b>128</b>
<b>5.2</b>	<b>Kartierung der CBF1-Bindestelle in vIRF4</b> .....	<b>129</b>
5.2.1	Die Interaktion von vIRF4 und CBF1 wird durch zwei distinkte Regionen des vIRF4 vermittelt.....	129
5.2.2	Sequenzvergleich des hochaffinen vIRF4-Peptids mit dem von Notch und EBNA2 .....	131
<b>B)</b>	<b>Identifizierung von zellulären Zielgenen des vIRF4-Proteins</b> .....	<b>133</b>
<b>5.3</b>	<b>Affymetrix-Genexpressionsanalyse unter Verwendung eines konditionalen Zellsystems</b> .....	<b>133</b>
5.3.1	Konfokalstudien und Zellfraktionierung .....	133
5.3.2	Identifizierung von vIRF4-Zielgenen.....	134
5.3.3	Bestimmung des vIRF4-regulierten Genexpressionsprofils anhand der Affymetrix-Microarraydaten .....	135
<b>5.4</b>	<b>Bestätigung der vIRF4-Regulation ausgewählter Zielgene</b> .....	<b>137</b>
5.4.1	Ist vIRF4 ein Repressor?.....	138
5.4.2	Verläuft die Induktion zellulärer Gene CBF1-abhängig?.....	139
<b>5.5</b>	<b>vIRF4 als Regulator zellulärer Zielgene</b> .....	<b>141</b>
5.5.1	Werden durch vIRF4 auch Notch-Zielgene reguliert?.....	141
5.5.2	Funktion der Zielgene.....	144
5.5.3	Kooperiert vIRF4 mit der Zielgenregulation von RTA? .....	145
<b>5.6</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>147</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>149</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>162</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>163</b>
8.1	Abkürzungen .....	163
8.2	Der vIRF4-Peptidblot.....	165
8.3	Affymetrix-Microarrayanalyse .....	169
<b>9</b>	<b>Ehrenwörtliche Versicherung</b> .....	<b>170</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Übersichtsdiagramm des KSHV-Genoms. ....	11
Abb. 1.2: Schematische Übersicht zu vIRF4. ....	15
Abb. 1.3: Die Zielgenaktivierung von Notch IC. ....	21
Abb. 4.1: Expression von vIRF4 in den Zelllinien BCBL-1 und BC-1. ....	70
Abb. 4.2: Die Komplexbildung von vIRF4 und CBF1 ist auch nach endogener Expression der Proteine nachweisbar. ....	71
Abb. 4.3: Das vIRF4-Protein interagiert spezifisch mit CBF1. ....	72
Abb. 4.4: Das Prinzip des Hefe- <i>Two-Hybrid</i> -Systems. ....	75
Abb. 4.5: Schematische Zusammenfassung aller verwendeten Deletionskonstrukte des vIRF4-Proteins im Hefe- <i>Two-Hybrid</i> -System. ....	76
Abb. 4.6: Das vIRF4-Peptid von As 466-478 zeigt in der Peptidblot-Hybridisierung eine starke Interaktion mit CBF1. ....	78
Abb. 4.7: CBF1 interagiert mit zwei Regionen von vIRF4. ....	79
Abb. 4.8: Die hochaffine vIRF4-Bindung an CBF1 wird vorwiegend über zwei Aminosäuren eines Tetrapeptidmotivs vermittelt. ....	83
Abb. 4.9: Das hochaffine CBF1-Bindemotiv in vIRF4 ähnelt stark dem Bindemotiv von Notch und EBNA2. ....	85
Abb. 4.10: Etablierung einer konditional vIRF4 exprimierenden Zelllinie. ....	87
Abb. 4.11: Dox-Titration zur Induktion von vIRF4 wt und vIRF4 mt. ....	89
Abb. 4.12: Quantifizierung der Proteinmengen von vIRF4 wt und vIRF4 mt. ....	92
Abb. 4.13: Einzelzellanalyse der subzellulären Lokalisation von vIRF4 wt und vIRF4 mt. ....	96
Abb. 4.14: Zellfraktionierung zur subzellulären Lokalisation von vIRF4 wt und vIRF4 mt. ....	99
Abb. 4.15: Schematischer Versuchsaufbau zur Identifizierung differentiell regulierter Gene. ....	101
Abb. 4.16: Zusammenfassung der Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA-Proben. ....	102
Abb. 4.17: Schematische Darstellung zur Anreicherung nascenter RNA durch 4sU-Markierung. ....	103
Abb. 4.18: Schematischer Versuchsaufbau zur Identifizierung differentiell regulierter Gene durch vIRF4 unter Verwendung nascenter RNA. ....	104
Abb. 4.19: Zusammenfassung der Qualitätskontrolle von Proben nascenter RNA. ....	105
Abb. 4.20 (Folgende Seite): Darstellung vIRF4 differentiell regulierter Gene im Clusterbaum. ....	107
Abb. 4.21: Auswertung der Microarrays unter Berücksichtigung beider Affymetrix-Screens. ....	111
Abb. 4.22: Vergleich der Expression der Referenzgene G6PD und 18S rRNA. ....	112
Abb. 4.23: Bestätigung der Affymetrix-Daten für vIRF4-induzierte Gene durch <i>Real-time</i> PCR. ....	115
Abb. 4.24: Untersuchung der vIRF4-vermittelten Repression ausgewählter Gene durch <i>Real-time</i> PCR. ....	118
Abb. 4.25: Toxizitätstest durch Propidiumiodidfärbung. ....	119
Abb. 4.26 (Folgende Seiten): vIRF4 reguliert EGR1 CBF1-abhängig. ....	123

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendeter Hefestamm.....	27
Tab. 2.2: Reportergene und ihre Phänotypen.....	27
Tab. 2.3: In dieser Arbeit verwendeter Hefestamm.....	27
Tab. 2.4: Allgemeine Zelllinien.....	27
Tab. 2.5: In der AG Kempkes hergestellte Zelllinien.....	28
Tab. 2.6: Primer zur Klonierung mit dem Gateway®-System.....	28
Tab. 2.7: Sonstige Primer.....	29
Tab. 2.8: Primer zur Quantifizierung von Transkripten mittels <i>Real-time</i> PCR.....	30
Tab. 2.9: Leervektoren und in der Arbeitsgruppe Kempkes bereits vorhandene <i>Entry</i> - und Expressionsvektoren (Gateway®-kompatibel).....	31
Tab. 2.10: Durch Gateway®-BP-Reaktion hergestellte <i>Entry</i> -Vektoren in pDonor207.....	32
Tab. 2.11: Durch sonstige Klonierung hergestellte <i>Entry</i> -Vektoren.....	32
Tab. 2.12: Durch Gateway®-LR-Reaktion hergestellte Expressionsvektoren.....	33
Tab. 2.13: Durch sonstige Klonierung hergestellte Expressionsplasmide.....	34
Tab. 2.14: Primäre Antikörper.....	34
Tab. 2.15: Sekundäre gekoppelte Antikörper.....	35
Tab. 3.1: Transfektionsansatz.....	44
Tab. 3.2: PCR-Ansatz für die Pwo DNA-Polymerase.....	52
Tab. 3.3: PCR-Programm für die Pwo DNA-Polymerase.....	52
Tab. 3.4: PCR-Ansatz für die PrimeSTAR DNA-Polymerase.....	53
Tab. 3.5: PCR-Programm für die PrimeSTAR DNA-Polymerase.....	53
Tab. 3.6: PCR-Ansatz für die zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese.....	54
Tab. 3.7: PCR-Programm für die zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese.....	54
Tab. 3.8: <i>Real-time</i> PCR-Programm für das LightCycler 480 II Gerät.....	58
Tab. 4.1: Vergleich der subzellulären Lokalisation von vIRF4 wt und vIRF4 mt innerhalb einer Zellpopulation.....	97
Tab. 4.2: Bestätigung der Affymetrix-Daten für VIRF4-induzierte Gene durch Gene durch <i>Real-time</i> PCR.....	116
Tab. 4.3: Analyse der relativen Transkriptmengen potentiell vIRF4-reprimierter Gene durch <i>Real-time</i> PCR.....	121
Tab. 4.4: Zusammenfassung potentieller CBF1-Bindestellen für die vIRF4-induzierten Gene.....	122



## Zusammenfassung

Das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus (KSHV) gehört zur Gruppe der  $\gamma$ -Herpesviren. Das humanpathogene Virus etabliert in B-Lymphozyten latente Infektionen, die nach Reaktivierung des lytischen Zyklus zur Produktion neuer infektiöser Viren führen und damit als Virusreservoir dienen. KSHV wird mit drei Tumoren assoziiert: dem Kaposi-Sarkom (KS) - einem endothelialen Tumor, und zwei B-Zelllymphomen – dem Primären Effusionslymphom (PEL) und der Multizentrischen Castleman-Erkrankung (MCD). Der evolutionär konservierte Notch-Signalweg reguliert verschiedene Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse wie die Hämatopoese und Lymphopoese. Ein wichtiges Effektorprotein des genregulierenden Notch-Signalwegs ist das DNA-Bindeprotein CBF1. Durch die Rekrutierung von Korepressor- und Koaktivorkomplexen an die DNA sowie seiner Interaktion mit Notch trägt CBF1 erheblich zur weiteren Notch-Signalgebung und Aktivierung zellulärer Zielgene von Notch bei. Für KSHV-infizierte PEL- und KS-Zellen wurde ein aktiver CBF1/Notch-Signalweg beschrieben, der zum zellulären Phänotyp und zum Überleben der Zellen beiträgt. Eine Interaktion mit CBF1 ist für die beiden viralen Proteine LANA und RTA gezeigt worden. In der Arbeitsgruppe Kempkes wurde unlängst die Interaktion eines weiteren KSHV-kodierten Proteins, dem viralen Interferon regulatorischen Faktor 4 (vIRF4), mit CBF1 erstmals beschrieben. In meiner Doktorarbeit sollte die vIRF4/CBF1-Interaktion näher beschrieben und eine mögliche Modulation des Notch-Signalwegs durch vIRF4 untersucht werden.

Eine Feinkartierung des vIRF4-Proteins ergab eine binäre Interaktion mit CBF1. So konnte anhand einer Analyse deletierter und trunkierter vIRF4-Fragmente im Hefe-*Two-Hybrid*-Screen sowie einer Peptidblot-Bindungsstudie, neben einer Region von 40 Aminosäuren im N-terminalen Bereich des Proteins auch ein hochaffines Peptid von 13 Aminosäuren im zentralen Bereich des Proteins identifiziert werden. Weitere Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass die Aminosäuren Tryptophan und Prolin des kürzeren hochaffinen Peptids für die Bindung des vIRF4-Peptids und des gesamten vIRF4-Proteins an CBF1 essentiell sind. Das hochaffine Bindemotiv zeigt damit in seiner Sequenz starke Ähnlichkeit mit dem CBF1-Bindemotiv von Notch und dem EBV-Protein EBNA2.

Aufgrund der Tatsache, dass die viralen CBF1-Interaktionspartner des KSHV transkriptionelle Regulatoren sind, wurden im Anschluss erste Untersuchungen durchgeführt, um eine mögliche Rolle von vIRF4 als transkriptionellen Regulator zellulärer Gene zu definieren. Die Identifizierung des interessanten CBF1-Bindemotivs in vIRF4 warf außerdem die Frage auf, ob die Regulation der Zielgene über CBF1 verläuft und ob eine Überlappung mit zellulären Notch-Zielgenen vorliegt. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde zunächst eine Genexpressionsanalyse (Affymetrix-Microarray) des humanen Genoms in der mit KSHV latent infizierten PEL-Zelllinie BC-1 in An- und Abwesenheit von vIRF4 durchgeführt. Auch wenn vIRF4 nur sehr wenige Gene mehr als 1,5-fach regulierte, konnten die

Microarrayergebnisse dennoch für ausgewählte Gene in unabhängigen Experimenten durch *Real-time* PCR-Analysen bestätigt werden. In anschließenden Untersuchungen zur Induktion der ausgewählten Gene nach konditionaler Expression einer vIRF4-Mutante, die nicht mehr an CBF1 binden kann, konnte für das Gen EGR1 (*early growth response 1*), einem Transkriptionsregulator, eine CBF1-abhängige Induktion nachgewiesen werden. Eine Regulation von klassischen Notch-Zielgenen war anhand der Microarraydaten nicht zu beobachten.

In meiner Arbeit konnte ich erstmals zeigen, dass das KSHV-kodierte Protein vIRF4 über zwei Regionen an CBF1 bindet, wobei die hochaffine Bindung über ein Motiv ähnlich dem von Notch vermittelt wird. Dennoch konnte die Zielgenanalyse eine Regulation zellulärer Notch-Zielgene über CBF1 nicht bestätigen.

## Summary

The Kaposi's-sarcoma associated herpesvirus (KSHV) belongs to the group of  $\gamma$ -herpesviruses. It establishes lifelong latency in B lymphocytes which leads to the production of new infectious virions after reactivation of the lytic cycle. KSHV is associated with three malignant diseases: Kaposi's-sarcoma (KS), an endothelial disease and two lymphoproliferative disorders, primary effusion lymphoma (PEL) and multicentric Castleman's disease. The Notch signaling pathway is an evolutionarily conserved pathway that regulates multiple developmental and differentiating processes like haematopoiesis and lymphopoiesis. An important effector molecule of this gene regulating pathway is the DNA-binding protein CBF1. It recruits corepressor and coactivator complexes to the promoter of Notch target genes and furthermore interacts with Notch and thus, takes part in further Notch signaling and activation of cellular target genes of Notch. In KSHV-infected PEL B cells and KS cells Notch signaling is active and contributes to the cellular phenotype and survival of these cells. Two viral proteins, LANA and RTA, have been shown to directly bind to CBF1. Recently, we could describe a novel KSHV encoded interaction partner of CBF1, the viral interferon regulatory factor 4 (vIRF4). The aim of my PhD thesis was the characterization of the vIRF4/CBF1 interaction and furthermore to determine the potential role of vIRF4 in modulating Notch signaling.

During my PhD thesis I analyzed the binding of vIRF4 to CBF1 by mapping in detail the interacting region in vIRF4 using the yeast two-hybrid system and peptide blot hybridization as technical approaches. I identified a binary binding of vIRF4 to CBF1 via a 40 amino acid region in the N-terminal region as well as a high affinity binding peptide of 13 amino acids. Further studies revealed that the tryptophan and proline residues within this high affinity fragment are critical for the interaction with CBF1 of the vIRF4 peptide and the entire vIRF4 protein. Interestingly, this binding sequence showed strong similarity to the CBF1-binding motive of Notch and EBNA2.

Due to the fact that the viral interaction partners of CBF1 mentioned above are transcriptional regulators of cellular target genes I furthermore analyzed a potential role of vIRF4 as a transcriptional regulator. In addition, I looked for modulation of Notch signaling of vIRF4 by regulating cellular target genes in a CBF1 dependent manner. Therefore, I determined the expression profile of cellular genes in the absence and presence of vIRF4 in the KSHV positive and PEL derived cell line BC-1 (Affymetrix-Microarray). Even though only few genes were regulated more than 1.5 fold by vIRF4 I nevertheless could confirm the Microarray results for several selected cellular genes by independent experiments using real-time PCR. Adjacent studies of the cellular gene expression pattern after the conditional expression of a vIRF4 mutant which cannot bind to CBF1 any longer showed specifically for EGR1 (*early*

*growth response 1*), a transcriptional regulator, a CBF1 dependent induction. However, a regulation of typical Notch target genes in particular has not been observed.

My work described for the first time that vIRF4 interacts with CBF1 via two regions of which the high affinity binding results from a motive containing the aminoacids tryptophan and proline and shares strong similarity to the Notch binding motive. Nevertheless, an analysis of the gene expression profile could not confirm a regulation of canonical cellular Notch target genes via CBF1.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus

Im Jahre 1994 identifizierten Chang und Kollegen ein neues Virus, welches sie aus dem Gewebe eines Kaposi-Sarkoms eines AIDS-Patienten isoliert hatten (Chang et al., 1994). Das Virus wurde als Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus (KSHV) bezeichnet. KSHV, auch humanes Herpesvirus 8 genannt (HHV8), gehört zur Unterfamilie der  $\gamma$ -Herpesviren. Sein nächster humaner Verwandter ist das Epstein-Barr Virus (EBV). KSHV und EBV sind zwei humanpathogene, lymphotrophe Viren, die den DNA-Tumorviren zugeordnet werden. Bei KSHV handelt es sich, wie auch bei EBV, um ein Herpesvirus, das vorwiegend in latenter Form im Körper persistiert und zu einem späteren Zeitpunkt in die lytische Phase übertreten kann. Die Reaktivierung des Virus kann vor allem in immunsupprimierten Patienten lebensbedrohliche Erkrankungen verursachen und zur Bildung von teilweise höchst aggressiven Tumoren führen. Auch wenn die Prävalenz des KSHV in der Bevölkerung nicht mit EBV zu vergleichen ist, so stellt die Infektion in der afrikanischen Bevölkerung sowie bei HIV-Infizierten und transplantierten Patienten ein großes Problem dar. Die Infektion kann den Notch-Signalweg, welcher an zahlreichen Entwicklungsprozessen beteiligt ist, auf verschiedenen Ebenen modulieren. Virale Gene nutzen und manipulieren verschiedene Komponenten dieses Signalwegs, um daraus Vorteile für den viralen Lebenszyklus zu ziehen.

### 1.1.1 Epidemiologie

KSHV ist ein Virus, das vorwiegend in der Bevölkerung des Mittelmeerraumes und in Afrika auftritt. Das Virus ist in Afrika vor allem südlich der Sahara stark vertreten, wo sich in 50 % und mehr der erwachsenen Bevölkerung ein serologischer Nachweis einer KSHV-Infektion erbringen lässt. Aber auch unter Kindern dieser Region ist eine KSHV-Infektion weit verbreitet. Auch im mediterranen Raum ist das Virus gehäuft nachweisbar, wobei sich hier ein Nord-Süd-Gefälle bemerkbar macht: So ist eine stetige Zunahme von weniger als 3 % in Norditalien, bis hin zu 30 % in Sizilien zu verzeichnen (Calabro et al., 1998; Whitby et al., 1998).

In endemischen Ländern erfolgt die Übertragung meist im Kindesalter. Neuere Studien weisen daraufhin, dass die Übertragung hauptsächlich intrafamiliär über den direkten Kontakt in Form von Speichel erfolgt. Ein möglicher Übertragungsweg von Mutter zu Kind während der Schwangerschaft oder Geburt wird als unwahrscheinlich eingeschätzt, kann jedoch in Hochrisikogebieten nicht ausgeschlossen werden (Übersicht: Feller et al., 2010). Zu den häufigen Infektionswegen im Erwachsenenalter zählen Sexualkontakt, Blut und

Blutprodukte und ebenfalls der direkte Kontakt in Form von Speichel (Pica and Volpi, 2007). In nicht-endemischen Ländern wird KSHV mit erhöhter Frequenz in HIV-infizierten Patienten nachgewiesen. Zwischen 1950 und 1970 ließ sich in den USA parallel mit dem Anstieg von HIV auch eine zunehmende Verbreitung von KSHV feststellen. Dies betraf vorwiegend homosexuelle HIV-positive Männer. Studien lassen vermuten, dass sich KSHV in dieser Gruppe bereits vor der HIV-Pandemie ausbreitete (Falke 2009; Übersicht: Schulz, 2006; Schulz 2009).

### 1.1.2 KSHV assoziierte Erkrankungen

Ein charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist der Wechsel zwischen latentem und lytischem Lebenszyklus. KSHV und EBV etablieren latente Infektionen in B-Lymphozyten, die nach Reaktivierung des lytischen Zyklus zur Produktion neuer infektiöser Viren führen und damit als Virusreservoir dienen.

KSHV steht in Assoziation mit drei Tumoren: einem endothelialen Tumor - dem Kaposi-Sarkom (KS), und zwei B-Zelllymphomen – dem Primären Effusionslymphom (PEL) und der Multizentrischen Castleman-Erkrankung (MCD).

#### 1.1.2.1 *Kaposi-Sarkom*

Erstmals beschrieben wurde das Kaposi-Sarkom (KS) 1872 von dem ungarischen Arzt Moritz K. Kaposi. Dieser untersuchte fünf männliche Patienten und beschrieb die für die Krankheit typischen violetten Verfärbungen der Haut als „*idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin*“. Erst 1994 identifizierten Chang und Kollegen durch den Nachweis von KSHV-spezifischen Sequenzen ein neues Herpesvirus mit dem Namen Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus (Chang et al., 1994).

Auch wenn der Krankheitsbegriff das Wort Sarkom beinhaltet, so zeigt diese Erkrankung viele Unterschiede zu einem traditionell mesenchymalen Tumor. Anders als bei klassischen Krebserkrankungen, bei welchen die Tumore durch die klonale Expansion eines einzigen Zelltyps entstehen, ist das Kaposi-Sarkom histologisch komplex. KS-Läsionen setzen sich aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen zusammen, deren Verhältnis im Verlauf der Erkrankung variiert (Grayson and Pantanowitz, 2008; Herndier and Ganem, 2001; Regezi et al., 1993a; Regezi et al., 1993b; Übersicht: Ganem, 2010).

Das klinische Bild des Kaposi-Sarkoms prägen Läsionen, typische blau-violette Verfärbungen und Knotenbildung auf Händen und Füßen, die sich bei Fortschreiten der Krankheit auf Arme und Beine ausweiten. Später sind auch Schleimhäute und innere Organe wie Lunge, Gastrointestinaltrakt und Gehirn betroffen. Typisch sind auch Einblutungen in die Tumorumgebung, die als gelb-grüne Verfärbungen auffallen. Weit fortgeschrittene

Einzelumore können zentral nekrotisieren, exulzerieren und bluten. Ein charakteristisches histologisches Merkmal ist die Ausbildung von Spindelzellen, die vaskuläre Gefäße umgeben (Antman and Chang, 2000; Übersicht: Jenner and Boshoff, 2002). Ihr Ursprung ist unklar. Es wird vermutet, dass die Zellen mit lymphatischen Endothelzellen (LECs) eng verwandt sind. KSHV infiziert aber auch Endothelzellen der Blutgefäße (BECs) und induziert darüber hinaus deren Umdifferenzierung in LECs. Spindelzellen exprimieren daher Marker für LECs und wenige Marker für BECs (Grayson and Pantanowitz, 2008; Hong et al., 2004; Weninger et al., 1999). In frühen KS-Läsionen sind nur 10 % der Spindelzellen KSHV-positiv. Im späten Stadium hingegen sind es bereits 90 % der Zellen. Man vermutet deshalb, dass das Virus für infizierte Zellen einen Wachstumsvorteil bewirkt (Boshoff et al., 1995).

Das Kaposi-Sarkom tritt in vier Formen auf - das klassische KS, das endemische KS und das Post-Transplantat KS, welche unabhängig von einer HIV-Infektion vorkommen, sowie das HIV assoziierte KS. Alle vier Formen sind dem histologischen Bild nach identisch und in ihrer Etiologie an eine vorausgehende KSHV-Infektion gebunden (Moore and Chang, 1995).

Das klassische Kaposi-Sarkom ist mit einem Verhältnis von 15 zu 1, in der männlichen Bevölkerung weit häufiger verbreitet. Betroffen sind vor allem Männer aus Osteuropa und dem mediterranen Raum. Das Kaposi-Sarkom ist in der mediterranen, sowie ost- und mitteleuropäischen Bevölkerung um ein Zehnfaches häufiger vertreten als dies in Nordeuropa oder den Vereinigten Staaten der Fall ist (Übersicht: Järviluoma and Ojala, 2006). Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der histologischen Diagnose liegt bei 64 Jahren. Anfangs kommt es zu den typischen blau-violetten Verfärbungen und zur Knotenbildung auf Händen und Füßen, die sich bei Fortschreiten der Krankheit auf Arme und Beine ausweiten. Nur in 10 % der Fälle sind auch innere Organe und Schleimhäute betroffen. Die Erkrankung nimmt einen langsamen Verlauf und das Ausbreiten von Läsionen ist meist lokal beschränkt, so dass viele Patienten keine Therapie benötigen und klassisches KS selten lebensbedrohlich ist (Übersicht: Ganem, 2010).

Das endemische KS ist in der afrikanischen Subsahara, vor allem entlang des Äquators weit verbreitet und trat dort auch schon vor der HIV-Pandemie auf. Endemisch afrikanisches KS betrifft Frauen wie auch Kinder weitaus öfter, als es bei klassischem KS beobachtet wird. Zusätzlich entwickeln 18 % der Betroffenen ein orales KS (Wamburu et al., 2006), was ohne Behandlung bei einem Langzeit-KS zum Abbau der Kieferknochen und in Folge dessen zu lockeren Zähnen und Zahnverlust führt (Pantanowitz and Duke, 2008; Übersicht: Feller et al., 2010).

Transplantierte Patienten haben aufgrund der immunsuppressiven Therapie ein erhöhtes Risiko für KS. Dieser Subtyp von KS stellt eine aggressive Variante dar, in welchem auch Lymphknoten, Mucosa und innere Organe betroffen sind (Marcelin et al., 2007; Mbulaiteye and Engels, 2006; Übersicht: Lebbé et al., 2008; Übersicht: Wen and Damania, 2009).

In nicht-endemischen Ländern konnte eine weitere Form des KS definiert werden: Das HIV assoziierte KS (HIV-KS). HIV-KS ist eine äußerst aggressive Form des Kaposi-Sarkoms im fortgeschrittenen Stadium bei der die mittlere Überlebensrate bei Wochen bis Monaten liegt und gilt als maligne, von den Gefäßendothelien ausgehende, multilokuläre Systemerkrankung. HIV-KS tritt in den westlichen Ländern gehäuft bei homosexuellen HIV-positiven Männern auf. Auch in nicht-endemischen Ländern Afrikas, in denen die Prävalenz des KSHV in der Allgemeinbevölkerung sehr hoch ist, war mit Zunahme der HIV-Infektionen auch eine Zunahme von HIV-KS zu beobachten (Dedicoat and Newton, 2003; Falke et al 2009; Übersicht: Feller et al., 2010). Der Großteil der HIV-KS-Patienten in Afrika ist zwischen 10 und 50 Jahren alt. Nur 6 % der Patienten sind älter als 50 Jahre und nur 3 % jünger als 10 Jahre (Wamburu et al., 2006). Neben den krankheitstypischen Symptomen sind bei dieser Form auch meist die Lymphknoten, Schleimhäute und andere innere Organe massiv betroffen. In 20 % der HIV-KS-Patienten beginnt KS in der Mundhöhle. Und wiederum 70 % der HIV-KS-Patienten entwickeln orales KS (Feller et al., 2007). Das Kaposi-Sarkom ist daher eine häufige Todesursache bei AIDS-Patienten und stellt auch in den Vereinigten Staaten den häufigsten AIDS-assoziierten Tumor dar (Antman and Chang, 2000). Dennoch kann durch eine hochaktive antiretrovirale Kombinationstherapie wie HAART (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), wie sie der westlichen Welt zur Verfügung steht, indirekt auch HIV-KS therapiert werden, womit gute Erfolge erzielt wurden. Ein großes Problem stellt die Erkrankung jedoch in Afrika dar, wo HIV pandemisch auftritt und HAART nicht immer verfügbar ist. Hier kann bereits von einer HIV-KS Epidemie gesprochen werden. HIV-KS zählt dort zu den häufigsten bösartigen Tumoren, die in der Bevölkerung diagnostiziert werden (Übersicht: Feller et al., 2010). Zu den Betroffenen zählen auch Kinder. In Malawi beispielsweise stellt KS den zweithäufigsten Krebs unter Kindern dar und 93 % von Kindern mit KS sind HIV-positiv. Die Erkrankung zeigt in Kindern einen sehr aggressiven Verlauf, in welchem Lymphadenopathie und eine Dysfunktion der Atemwege auftreten und meist auch die Mundhöhle betroffen ist (Übersicht: Feller et al., 2010). Dabei sterben ohne HAART 25 % der HIV-positiven Neugeborenen bereits im ersten Lebensjahr und die restlichen 75 % der Kinder entwickeln vor dem 7. Lebensjahr AIDS (Chakraborty et al., 2002). Deshalb stellt die Erkrankung vor allem für Kinder in diesen Risikogebieten ein ernstes Problem dar.

Es steht mittlerweile außer Frage, dass KSHV den primären und notwendigen Faktor in der Entwicklung eines Kaposi-Sarkoms, gleich welcher Form, darstellt (Übersicht: Ganem, 2010). Zusätzlich scheint der Immunstatus des Wirtes ein wichtiger Kofaktor zu sein (Antman and Chang, 2000).

### 1.1.2.2 Primäres Effusionslymphom

Schon bald nach der Entdeckung von KSHV in Kaposi-Sarkomen wurde dieses Virus auch in einem Primärem Effusionslymphom (PEL) entdeckt. PEL, auch *body cavity-based lymphoma*



(BCBL) genannt, stellt eine maligne Effusion ohne auffallende Tumormasse dar. Bei dieser äußerst selten auftretenden Erkrankung finden sich diese Ergüsse vornehmlich in der Bauch- und Lungenhöhle und im Herzbeutel. Die meisten PEL-Patienten sind auch HIV-positiv. PEL ist ein aggressives und schnell fortschreitendes Lymphom. Der genaue zelluläre Ursprung der PELs ist bisher unklar. Gewöhnlich handelt es sich um monoklonale Zellen, die von B-Zellen abstammen. Von den Zellen werden nur wenige Oberflächenmarker differenzierter B-Zellen, wie zum Beispiel CD20 exprimiert (Arguello et al., 2003; Carbone et al., 1998; Gaidano and Carbone, 2001). Es wird vermutet, dass es sich bei PEL-Zellen um B-Zellen handelt, deren Immunglobulingene bereits die Hypermutation im Keimzentrum durchlaufen haben, die jedoch in ihrer weiteren Entwicklung zu Plasmazellen blockiert werden (Übersicht: Jenner and Boshoff, 2002). Sie besitzen einen intermediären Phänotyp zwischen Immunoblasten und Plasmazellen (Carbone et al., 1996; Nador et al., 1996).

PEL steht in fester Assoziation mit KSHV. In 70-80 % der Fälle liegt in den PEL-Zellen eine Koinfektion mit EBV vor (Carbone et al., 1998; Übersicht: Drexler et al., 1998; Übersicht: Jenner and Boshoff, 2002). EBV ist ein lymphotropes Herpesvirus, welches ebenfalls den DNA-Tumorviren zugeordnet wird und ruhende B-Lymphozyten nach Infektion zur Proliferation anregt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass EBV die PEL-Zellproliferation antreibt, denn die Proliferation fördernden Epstein-Barr nukleären Antigene 2 und 3 (EBNA-2 und -3) werden gar nicht, und das latente Membranprotein 1 (LMP1) nur in geringen Mengen, exprimiert (Callahan et al., 1999; Horenstein et al., 1997; Übersicht: Jenner and Boshoff, 2002). Die EBV-negative, KSHV-positive Zelllinie BCBL-1 und die EBV- und KSHV-positive Zelllinie BC-1 sind zu wichtigen Modellzelllinien in Untersuchungen zu KSHV geworden. Die Zellen beider Linien sind PEL-Zellen, die aus dem Tumor eines PEL-positiven Patienten isoliert wurden (Cesarman et al., 1995; Renne et al., 1996).

### *1.1.2.3 Multizentrische Castleman-Erkrankung*

Bei der Multizentrischen Castleman-Erkrankung (MCD) kommt es zu einer Fehlsteuerung in der Proliferation der Lymphozyten. Als charakteristische Symptome treten Schwellungen der Lymphknoten, Fieberschübe, Nachtschweiß und Gewichtsabnahme auf und die Milz ist immer massiv vergrößert. MCD steht in starker Assoziation mit HIV und tritt in HIV-positiven Patienten mit erhöhter Frequenz auf. Es handelt sich um eine eher seltene Erkrankung, die zur Gruppe der atypischen Lymphome gezählt wird. Da MCD in den Statistiken nicht separat aufgeführt wird, existierten bisher keine exakten Angaben zur Inzidenz (Roca, 2009). In mehreren Studien konnte ein erhöhtes Vorkommen von KSHV-DNA in MCD festgestellt werden. KSHV wurde in 50 % aller HIV-negativen und in 100 % aller HIV-positiven Fälle von MCD nachgewiesen. Bei 15 % der HIV-negativen und bei 75-100 % der HIV-positiven Patienten tritt zusätzlich ein Kaposi-Sarkom auf (Soulier et al., 1995). Auch unter HAART

wird MCD weiterhin beobachtet und zeigt in den letzten Jahren eine stetige Zunahme an MCD-Erkrankten (Powles et al., 2009). Gleichzeitig war jedoch ein Rückgang der KS-Inzidenz um 23 % in MCD-Patienten zu beobachten. Die Prognose ist aber nach wie vor schlecht (Mylona et al., 2008).

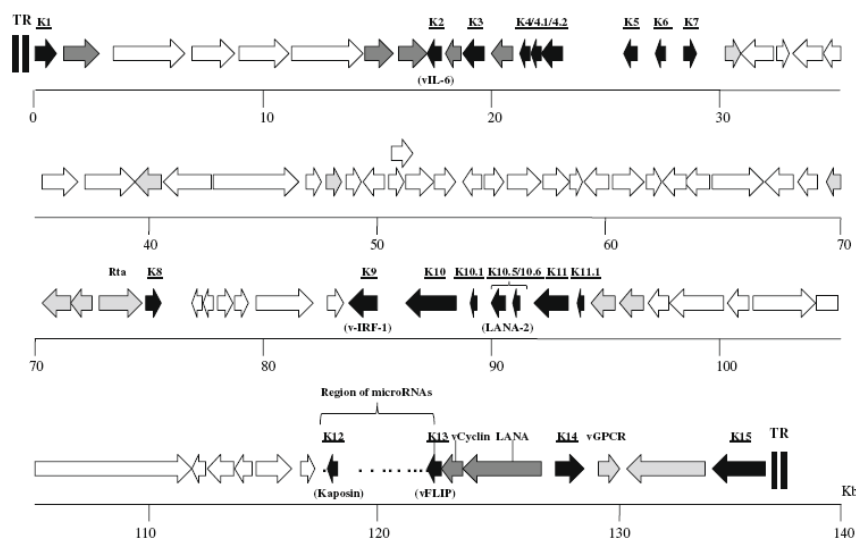
Im Vergleich zu der benignen und lokalisierten Hyperplasie des lymphatischen Gewebes, die von Castleman 1956 erstmals beschrieben wurde, ist die MCD, wie sie bei der HIV-Infektion auftritt, eine lymphoproliferative Erkrankung mit malignem Charakter. Die infizierten Zellpopulationen sind gewöhnlich polyklonal, von plasmazellähnlicher Gestalt und zeigen keine weitere B-Zelldifferenzierung bezüglich der Immunglobulingene (Oksenhendler et al., 2002). Darüber hinaus ist eine Deregulation in humanem Interleukin-6 und -10 zu beobachten und wird als zentraler Faktor in der Pathogenese der Krankheit angesehen. Bei der HIV-assoziierten MCD trägt vermutlich das virale Interleukin-6 stark zur plasmazellähnlichen Differenzierung der Zellen bei (Oksenhendler et al., 2002). Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung ist eine Standardtherapie bislang nicht etabliert.

### 1.1.3 Das Genom des KSHV

Die DNA liegt in linearisierter Form, eingeschlossen im viralen Kapsid, vor. Nach Infektion der Zelle zirkularisiert das Genom und bildet im Kern der Wirtszelle ein doppelsträngiges Episom, welches gewöhnlich in geringer Kopienzahl vorliegt (Lagunoff and Ganem, 1997; Renne et al., 1996). Das Genom hat eine Länge von 145 kb (Kilobasen) doppelsträngiger DNA. Die genkodierende Region wird von 801 bp langen sogenannten „terminal repeats“ (TR) flankiert. Die Zahl der TRs unter den KSHV Isolaten variiert und reicht von 16 bis 75 (Duprez et al., 2007). Zusammen mit den TRs ergibt sich so eine Gesamtgröße von etwa 165 kb (Renne et al., 1996). Die Genomgröße von KSHV ist damit seinem nächsten humanpathogenen Verwandten, dem EBV, mit einer Größe von 172 kb, sehr ähnlich. Während der Mitose ist das KSHV-Genom über die TR-Sequenzen an die H2-Histone angeheftet, wodurch das virale Genom an die Tochterzellen weitergegeben wird. Diese Bindung wird über das virale latente Protein LANA vermittelt (Übersicht: Speck and Ganem, 2010).

In der kodierenden Region befinden sich mindestens 87 offene Leserahmen (*open reading frames*, ORF), wobei nicht bekannt ist, wie viele davon Exons oder komplette Gene darstellen (Jenner et al., 2001; Lagunoff and Ganem, 1997). Das KSHV-Genom ist in sieben hochkonservierte Blöcke unterteilt, welche durch kurze KSHV-spezifische Regionen mit sogenannten „*unique* ORFs“ voneinander abgegrenzt sind. Ein Großteil der konservierten ORFs weisen Homologien zu denen des Rhadinovirus Herpesvirus saimiri (HVS) auf. Deshalb basiert die Numerierung der KSHV-ORFs auf der HVS-Nomenklatur. KSHV spezifische ORFs wurden mit K1 bis K15 bezeichnet (Übersicht: Järviluoma and Ojala,

2006). Von den konservierten ORFs werden Strukturproteine, Enzyme und Gene für DNA-Replikation (z.B. DNA-Polymerase), Nukleotidsynthese (z.B. Dihydrofolatreduktase) und Regulatoren der Genexpression (z.B. der Replikations- und Transkriptionsaktivator, RTA) kodiert (Russo et al., 1996). Ein besonderes Merkmal der sogenannten „*unique genes*“ des KSHV ist, dass eine Großzahl von Genen Sequenzähnlichkeiten zu zellulären Genen aufweist. Es gibt eine auffallende Parallele von den von KSHV kodierten zellulären Homologen zu den durch EBV induzierten zellulären Genen. Zu den von EBV hochregulierten Genen gehören Bcl-2, Cyclin D und IL-6 (Finke et al., 1992; Jones et al., 1995; Palmero et al., 1993; Russo et al., 1996). Im KSHV-Genom finden sich Gene, die zu diesen zellulären Proteinen homologe virale Proteine kodieren. Diese waren ursprünglich Teil des zellulären Genoms des Wirts, wurden jedoch als Kopien in das virale Genom integriert und werden nun zur Modifikation von Signalwegen und regulatorischen Prozessen der Wirtszelle verwendet. So dienen vBcl-2, vCyclin und vIL-6 zum Schutz vor Apoptose oder sichern das Durchlaufen des Zellzyklus (Chang et al., 1996; Moore et al., 1996; Russo et al., 1996).



**Abb. 1.1: Übersichtsdiagramm des KSHV-Genoms.**

Dargestellt ist ein Auszug von KSHV-*open reading frames* (ORFs). Die Nummern zeigen ihre grobe Lokalisation innerhalb des Genoms in kb an. Die genkodierende Region ist von *terminal repeats* (TR) flankiert. KSHV-spezifische ORFs sind als K1 bis K15 und durch schwarze Pfeile dargestellt. ORFs, homolog zu denen von Rhadinoviren werden als dunkelgraue Pfeile, ORFs, homolog zu anderen  $\gamma$ -Herpesviren, wie z.B. EBV, werden als hellgraue Pfeile und ORFs, homolog zu den meisten Herpesviren werden als weiße Pfeile angezeigt. (Abb. aus Wen and Damania, 2009).

### 1.1.4 Der virale Lebenszyklus von KSHV

Wie alle Herpesviren durchläuft KSHV in seinem viralen Lebenszyklus zwei verschiedene Phasen. Das Virus persistiert in der Zelle vorwiegend im latenten Zustand. Während der

Latenz werden nur etwa 10 % aller Gene exprimiert und keine funktionellen oder infektiösen viralen Partikel produziert (Russo et al., 1996). Untersuchungen in B-Zelllinien, isoliert aus PEL-Patienten, zeigten einen Latenz-Lokus auf, der ausnahmslos in allen latent infizierten Zellen transkribiert wird. Der Lokus beinhaltet neben 12 prä-miRNAs (Micro-RNA) vier ORFs, die für das latente nukleäre Antigen 1 (LANA 1), v-Cyclin, das Flice inhibitorische Protein (v-FLIP) und die Kaposin Protein-Familie kodieren. Die ersten drei Gene stehen unter Kontrolle eines einzigen Promotors, dem LANA-Promotor (LTc) (Dittmer et al., 1998; Dittmer, 2003; Hansen et al., 2010; Marshall et al., 2007). Die Expression der Kaposine steht unter Kontrolle eines zweiten Promotors, dem Kaposin-Promotor (LTd) (Cai and Cullen, 2006; Li et al., 2002; Pearce et al., 2005). Alle genannten latenten Gene werden in KS-Spindelzellen, MCD- und in PEL-Zellen exprimiert (Dittmer, 2003; Hansen et al., 2010; Marshall et al., 2007). Die latenten Gene halten die Replikation des viralen Episoms aufrecht, verhindern die antivirale Immunantwort des Wirtes und unterstützen die Proliferation infizierter Zellen. So kann eine lebenslange Infektion aufrechterhalten werden. Ein weiteres latentes Protein ist vIRF3, auch LANA2 genannt. Das vIRF3-Protein wird nur in PEL- und MCD-Zellen, aber nicht in KS-Zellen exprimiert. Das deutet darauf hin, dass vIRF3 lymphozytenspezifisch ist.

Die lytische Phase dient der Replikation des viralen Genoms und der Produktion neuer infektiöser Viruspartikel. Die Reaktivierung des lytischen Zyklus wird durch physiologische Stressfaktoren, wie z.B. Hypoxie (Haque et al., 2003) ausgelöst, allerdings sind die genauen physiologischen Prozesse nicht bekannt. Die lytische Reaktivierung kann in Kultur auch chemisch induziert werden. In dieser Phase wird das gesamte Repertoire an Genen in einer streng geordneten zeitlichen Reihenfolge exprimiert. Die Gene werden in die Kategorien „sehr früh“, „früh“ und „spät“ eingestuft. Entscheidend bei der Kategorisierung ist neben dem Zeitpunkt der Expression ihre Sensitivität gegenüber Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinsynthese, und PAA (*phosphonoacetic acid*), dem Inhibitor der Replikation. Die Expression der sehr frühen Gene ist nicht auf die virale Proteinsynthese angewiesen und kann somit nicht durch Cycloheximid gehemmt werden. Sehr frühe Gene sind für die Regulierung der weiteren Transkriptionskaskade im lytischen Zyklus enorm wichtig. Zu dieser Kategorie zählt RTA, welches als „*switch*“ Protein für die Initiierung und das Fortlaufen des lytischen Zyklus benötigt und dafür allein ausreichend ist. Weitere sehr frühe Gene sind K8 und ORF45. Die Expression von frühen und späten Genen kann durch Cycloheximid gehemmt werden. Die Expression der frühen Gene ist jedoch im Gegensatz zu den späten Genen von der viralen DNA-Synthese unabhängig (Sun et al., 1999; Ye et al., 2007). Frühe und späte Gene sind für die Replikation des viralen Genoms, dem Zusammenbau von Virionen und dem Austritt der Viruspartikel aus der Zelle verantwortlich.

KSHV ist wie alle Herpesviren lymphotrop und infiziert B-Lymphozyten. In gesunden seropositiven Menschen kann virale DNA hauptsächlich in CD19-positiven B-Zellen

nachgewiesen werden (Ambroziak et al., 1995). Ob KSHV B-Zellen des Keimzentrums oder Gedächtnis-B-Zellen infiziert, ist bis heute nicht geklärt (Übersicht: Speck and Ganem, 2010).

## 1.2 Virale Interferon regulatorische Faktoren

### 1.2.1 Gemeinsame Kennzeichen

Das KSHV-Genom kodiert für vier virale Interferon regulatorische Faktoren (vIRF1 bis 4), die in ihrer Sequenz Homologien zu zellulären Interferon regulatorischen Faktoren (zIRFs) aufweisen (Offermann, 2007). Zelluläre Interferon regulatorische Faktoren sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die an der Interferoninduktion beteiligt sind. Die Induktion von Interferon- $\alpha$  und - $\beta$  (IFN- $\alpha$ /IFN- $\beta$ ) ist dabei ein zentraler Punkt in der Virusabwehr der Zelle.

Neun humane zIRFs sind bisher beschrieben. Alle IRFs zeigen Sequenzhomologien in den ersten 115 Aminosäuren (As) des N-Terminus. Dieser Bereich enthält eine konservierte DNA-Bindedomäne, in der sich charakteristische Wiederholungen der Aminosäure Tryptophan finden, wobei fünf Tryptophan-Aminosäuren in einem Abstand von 10 bis 18 Aminosäuren aufeinander folgen (Nguyen et al., 1997). Der C-Terminus der Proteine ist nicht konserviert. Anhand der Kristallstruktur der DNA-Bindedomäne von zIRF1 ist bekannt, dass die Bindung an DNA über drei der fünf konservierten Tryptophane vermittelt wird (Escalante et al., 1998). In der DNA-Bindedomäne (DNA-BD) existieren homologe Sequenzen zwischen den vIRFs und den zIRFs (Russo et al., 1996). Jedoch ist bislang nur für vIRF1 eine DNA-Bindung beschrieben worden (Park et al., 2007). Da den vIRFs zwei der drei essentiellen Tryptophane, welche die DNA-Bindung vermitteln, fehlen, wird vermutet, dass die vIRFs deshalb nicht direkt an die DNA-Erkennungsstellen der zellulären IRFs binden können.

Mit Ausnahme des vIRF3 werden alle viralen IRFs von jeweils zwei Exons kodiert und jedes Gen verfügt über eine eigene TATA-Box und eine eigene Polyadenylierungsstelle. Die Gene vIRF1, vIRF2 und vIRF4 werden vorwiegend während des lytischen Zyklus exprimiert, wo hingegen das vIRF3-Protein der latenten Phase zugeordnet wird (Jenner et al., 2001). Das vIRF1 und vIRF3 scheinen in allen PEL- und KSHV-infizierten MCD-Zellen exprimiert zu werden. In KS konnte eine Expression von vIRF1 nur über RT-PCR und eine Expression von vIRF3 gar nicht nachgewiesen werden (Rivas et al., 2001). Ob die vIRF3-Expression in PEL-Zellen induziert werden kann, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Dittmer, 2003; Jenner et al., 2001).

Sowohl vIRF1 als auch vIRF2 und vIRF3 modulieren die zelluläre IFN vermittelte Signaltransduktion. Eine Inhibition der IFN-Induktion erfolgt hauptsächlich durch Interaktion mit zIRF1, zIRF3 und zIRF7. Dies geschieht bei vIRF1 auf direktem Wege oder durch Konkurrenz um die Bindung des transkriptionellen Koaktivators p300 (Burysek et al., 1999;

Lin et al., 2001). Die Bindung des viralen Proteins unterdrückt die Aktivität von p300 als Histonacetylase. Das Protein vIRF3 bindet an zIRF7 und unterbindet dadurch die zIRF7 vermittelte IFN- $\alpha$  Produktion (Joo et al., 2007). Auch vIRF2 inhibiert die Aktivität von zIRF1 und zIRF3 durch Interaktion mit zIRF1 und p300 (Fuld et al., 2006). Zelluläres IRF3 wird allerdings nicht gebunden. Die weitere IFN vermittelte Immunreaktion wird auch durch Bindung und Hemmung doppelsträngiger RNA-aktivierter Proteinkinase R (PKR) unterbunden (Burysek and Pitha, 2001).

Das vIRF1 besitzt darüber hinaus auch eine Rolle als Onkogen und unterdrückt die Transkription und proapoptotische Wirkung von p53 (Nakamura et al., 2001). Rivas und Kollegen konnten dies auch für vIRF3 zeigen (Rivas et al., 2001). Auch dem vIRF2-Protein kann eine antiapoptotische Wirkung durch transkriptionelle Repression des CD95L zugeschrieben werden (Kirchhoff et al., 2002).

### 1.2.2 Der virale Interferon regulatorische Faktor 4 (vIRF4)

In dieser Arbeit war vIRF4 Mittelpunkt der Untersuchungen. In Vorarbeiten konnte vIRF4 als Interaktionspartner von CBF1, dem zentralen Effektormolekül des stark konservierten Notch-Signalwegs, identifiziert werden.

Wie auch vIRF2 und vIRF3, wird vIRF4 von zwei Exons, K10 und K10.1, kodiert (Jenner et al., 2001). Für die Initiation der Transkription existieren zwei Transkriptionsstartpunkte (Cunningham et al., 2003). Nach Induktion des lytischen Zyklus in PEL-Zelllinien lassen sich im Northernblot mit einer für den offenen Leserahmen spezifischen Sonde zwei Transkripte von 2,9 und 1 kb nachweisen. Das 2,9 kb Transkript kodiert für das vIRF4-Protein. Ob das 1 kb Transkript auch für ein Protein kodiert, ist nicht beschrieben (Kanno et al., 2006).

Das exprimierte vIRF4 ist mit 911 Aminosäuren (As) und einem Molekulargewicht von 100 kilodalton (kDa) ein sehr großes und unter den vIRFs das größte Protein. Im Allgemeinen ist über das Protein nach wie vor wenig bekannt, dennoch konnten einige Publikationen in den letzten Jahren neue und interessante Informationen zu vIRF4 liefern. Das vIRF4 wird nach Induktion in den Zellen aller mit KSHV assoziierten Tumore KS, MCD und PEL exprimiert, ist aber innerhalb der Zelle unterschiedlich lokalisiert. In KS-Zellen wird vIRF4 gering exprimiert und findet sich im Zellkern der Zellen. MCD-Zellen weisen vIRF4 im Zytoplasma auf. In PEL wurde vIRF4 hauptsächlich im Zellkern und weniger im Zytoplasma exprimiert (Kanno et al., 2006).

Die N-terminale Region des vIRF4-Proteins besitzt homologe Regionen zu den vIRFs und zu der DNA-BD der zIRFs. Auch im zentralen Bereich finden sich Sequenzübereinstimmungen zu den viralen und zellulären IRFs. Allerdings weist vIRF4 in seinem Gen auch lange Sequenzen ohne Homologie zu den IRFs auf. Deshalb ist es gut möglich, dass sich das vIRF4-Protein in seiner Funktion von den anderen viralen oder zellulären IRFs unterscheidet.

Uetz und Kollegen konnten im Jahre 2006 fünfzehn potentielle virale Interaktionspartner von vIRF4 identifizieren (Uetz et al., 2006). Kurz darauf wurde von Kanno und Kollegen das Poly(A)-Bindeprotein (PABP) als erster zellulärer Interaktionspartner publiziert. PABP ist ein Protein, welches die Prozessierung, Stabilität und den Export von polyadenylierten RNAs sowie die Initiierung der Translation beeinflusst (Guhaniyogi and Brewer, 2001; Kuyumcu-Martinez et al., 2004; Übersicht: Smith and Gray, 2010). Die Bindung erfolgt im vIRF4-Protein in dem Aminosäurebereich 157 bis 380. Weitere Untersuchungen dazu ergaben, dass beide Interaktionspartner als Komplex vorwiegend im Zellkern lokalisiert sind. Getrennt konnten beide Proteine aber sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Sander und Kollegen führten ebenfalls Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von vIRF4 oder einem seiner potentiellen viralen Interaktionspartner nach transients Transfektion von HeLa-Zellen durch. Auch hier konnte vIRF4 nach alleiniger Expression vorwiegend im Kern detektiert werden. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass die vIRF4-Lokalisation innerhalb der Zelle von der Koexpression des Interaktionspartners abhängt. So konnte sich nach Koexpression von vIRF4 und einem potentiellen viralen Interaktionspartner die subzelluläre Lokalisation für vIRF4 oder für beide Interaktionspartner ändern (Sander et al., 2008). Bezüglich der PABP/vIRF4-Interaktion vermutet die Arbeitsgruppe Katano, dass eine erste Funktion von vIRF4 in der Inhibierung der PABP-Funktion im Zellkern liegt, wodurch die Translation im Wirt lahmgelegt wird. Um die Beziehung der beiden Proteine zueinander weiter aufzuklären, sind weitere Studien notwendig. Fortführende Daten liegen bislang nicht vor. Eine mögliche vIRF4-vermittelte Inhibition der Interferon  $\beta$ -Induktion nach Sendai Virus-Infektion war nicht nachweisbar (Kanno et al., 2006). Darüber hinaus wurde für vIRF4 die Interaktion mit dem *murine double minute 2* (MDM2)-Protein beschrieben (Lee et al., 2009). MDM2 ist eine E3 Ubiquitin Ligase und der wesentliche Negativregulator von p53. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass vIRF4 mit MDM2 interagiert und dadurch die MDM2-Ubiquitinierung supprimiert wird. Als Folge wird p53 ubiquitiniert, abgebaut und die p53 vermittelte Apoptose dadurch verhindert. Es wird vermutet, dass vIRF4 über diesen Mechanismus gezielt den p53 vermittelten und irreversiblen Zellzyklusarrest und damit die Apoptose verhindert, und so im Wirt den Abwehrstrategien des Immunsystems gegen Virusinfektionen entgegen wirkt.



**Abb. 1.2: Schematische Übersicht zu vIRF4.**

Das vIRF4-Protein umfasst 911 As. Dargestellt sind die für vIRF4 publizierten Binderegionen mit den Proteinen PABP (grün) und MDM2 (blau). Zusätzlich angegeben sind die Aminosäurepositionen der Binderegionen.

### 1.3 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein evolutionär konservierter genregulierender Signalweg, bei dem ein Signalaustausch benachbarter Zellen stattfindet und so verschiedene grundlegende zelluläre Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse gesteuert werden können.

Dazu gehört die zellspezifische Differenzierung während der Embryogenese und auch die Hämatopoese und Lymphopoese im erwachsenen Menschen. Dieser umfangreiche Signalweg wurde in Lymphozyten bislang besonders gut in T-Zellen untersucht. Dabei legt ein aktiver Notch-Signalweg die Ausdifferenzierung einer hämatopoetischen Vorläuferzelle zur T-Zelle fest. Neuere Daten zeigen auch, dass Notch die Differenzierung und Aktivität von peripheren T-Zellen steuert, wie z.B. die Differenzierung zu T-Helferzellen vom Typ 2 (TH2) (Amsen et al., 2007; Fang et al., 2007). Die Untersuchungen meiner Arbeit konzentrieren sich auf B-Lymphozyten. Im Folgenden möchte ich deshalb die Rolle von Notch und seinem Signalweg in B-Zellen näher erläutern. Die B-Zell-Entwicklung kann in die frühe B-Zell-Entwicklung, welche im Knochenmark stattfindet und in die späte B-Zell-Entwicklung, die in den sekundären Lymphorganen wie der Milz durchlaufen wird, unterteilt werden. Notch scheint erst in der späten B-Zell-Entwicklung eine Rolle zu spielen. Sogenannte Übergangs-B-Zellen verlassen das Knochenmark und wandern in die Milz. Dort differenzieren sie zu folliculären B-Zellen (FoB) oder zu B-Zellen der Marginalzone (MZB) aus. FoB-Zellen reagieren auf eine T-Zell vermittelte Immunantwort und formen das Keimzentrum, wo sie zu Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen differenzieren. MZB-Zellen verweilen in der sogenannten Marginalzone, welche das weiße Mark der Milz umgibt. Sie differenzieren schneller zu Antikörper-produzierenden Zellen als es FoB-Zellen tun und agieren vorwiegend unabhängig der T-Zell vermittelten Immunantwort (Martin and Kearney, 2002; Übersicht: Radtke et al., 2010). Notch2 ist essentiell für die Entwicklung von MZB-Zellen, wo hingegen es für die Entwicklung folliculärer B-Zellen entbehrlich ist. So führte eine B-Zell-spezifische Inaktivierung von Notch2 und CBF1 zu einem Verlust von B-Zellen (Saito et al., 2003; Tanigaki et al., 2002). Demnach scheint in B-Zellen der Notch2-Rezeptor Auslöser für weitere Zellveränderungen zu sein, ganz im Gegensatz zur T-Zell Differenzierung, bei der Notch1 der Hauptrezeptor ist. Auch die Inaktivierung des Notch-Liganden Delta-like1 (Dll1) führte zu einem Verlust von MZB-Zellen, wo hingegen die T-Zell Entwicklung unbeeinträchtigt blieb (Hozumi et al., 2004). Deshalb wird vermutet, dass die spezifische Interaktion von Notch2 und Dll1 die MZB-Entwicklung festlegt. Notch scheint aber auch eine wichtige Rolle bei der terminalen Differenzierung von reifen B-Zellen zu antikörperproduzierenden Zellen zu haben (Santos et al., 2007). So konnte der Ligand Dll1, nicht jedoch Jag1, die Immunglobulin-Sekretion in aktivierten MZB-Zellen erhöhen. Auch konnte gezeigt werden, dass Notch durch Zusammenwirken mit dem B-Zell Rezeptor die B-Zellaktivierung steigern kann (Thomas et al., 2007).



Mutationen aber auch virale Infektionen, die zu einem deregulierten Notch-Signalweg führen, haben vaskuläre Deformationen, neuronale Störungen und weitläufige Entwicklungsdefekte zur Folge. Eine Deregulation dieses Signalwegs ist auch mit der Entstehung von Tumoren unterschiedlichster Gewebe assoziiert. Insbesondere eine deregulierte Expression der aktivierten Form von Notch ist an der Entstehung der T-Zell akuten lymphoblastischen Leukämie wesentlich beteiligt (Grabher et al., 2006). Aber auch in KSHV-infizierten PEL B-Zellen und in KS-Zellen liegt ein aktiver Notch-Signalweg vor, der zum Phänotyp der Tumorzellen sowie zum Überleben der Zellen in Kultur und nach Transplantation *in vivo* beiträgt (Curry et al., 2007; Curry et al., 2005; Lan et al., 2006a; Lan et al., 2009). So führte die Inhibierung der Notch-Aktivierung zur Induktion von Apoptose in KS-Tumorzellen. Auch in PEL-Zellen führte eine Blockade der Notch-Signalgebung zu einer verminderten Proliferation der Zellen.

### 1.3.1 Die Primärstruktur von Notch

Der Notch-Signalweg wurde erstmals in B-Zellen beschrieben, kommt aber in den verschiedensten Zellen und Geweben vor, ist bei allen Metazoen verbreitet und stark konserviert. Im Menschen existieren vier verschiedene Notch-Rezeptoren (Notch 1-4). Das Notch-Protein stellt einen transmembranären Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 300 kDa (für Notch1) dar. Notch ist ein Hetero-Oligomer, bestehend aus einer großen extrazellulären Domäne, einem transmembranären Teil und einer kleinen intrazellulären Region. Die extrazelluläre Domäne beinhaltet 36 Tandemwiederholungen von 40 As, ein cysteinreiches Motiv homolog zu EGF (*epidermal growth factor*) und drei Kopien einer weiteren cysteinreichen Region, welche als LNR Motiv bezeichnet wird (Tamura et al., 1995). Die intrazelluläre Region enthält mehrere funktionelle Domänen, welche die Signaltransduktion vermitteln. Diese setzen sich aus der RAM-Domäne (*RBP-Jk-associated molecule*), gefolgt von sieben Ankyrin-Wiederholungen (ANK), einer mutmaßlichen Transaktivierungsdomäne (nur für Notch1 und Notch2) und einem C-terminalen PEST-Motiv zusammen (Ehebauer et al., 2006). Die Struktur des Notch-Rezeptors ist in der Evolution stark konserviert.

Notch-Rezeptoren verfügen über mindestens drei Spaltstellen (S1 bis S3), an welchen sie, um eine Effektorfunktion ausüben zu können, proteolytisch gespalten werden. Die Rezeptoren werden als Vorläufer-Proteine synthetisiert. Im Golgi-Apparat erfolgt dann die erste Spaltung an S1 durch Furin-ähnliche Konvertasen, wodurch zwei Fragmente entstehen. Das N-terminale Notch-Fragment beinhaltet den Großteil der extrazellulären Domäne. Das C-terminale Fragment enthält einen kleinen extrazellulären Teil, die Transmembrandomäne und den intrazellulären Teil (Notch IC) (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998; Rand et al., 2000). Beide Fragmente werden im Golgi-Apparat nicht-

kovalent zu einem Heterodimer gebunden, welches dann an der Zelloberfläche exprimiert wird (Rand et al., 2000).

### 1.3.2 Aktivierung des Notch-Signalwegs

Die Aktivierung des Notch-Signalwegs erfolgt durch Zell-zu-Zell Kontakt, wodurch es zur Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors kommt. Bei den Liganden handelt es sich ebenfalls um Transmembranproteine die zur Familie der DSL-Proteine (*Delta*, *Serrate*, *Lag 2*) gehören. Zu den humanen Liganden zählen Jagged1 und 2, Delta-like1, Delta-like3 und 4 (Übersicht: Kopan and Ilagan, 2009). Die zweite proteolytische Spaltung findet an S2 in der extrazellulären Region des C-terminalen Fragments statt. Dessen Spaltstelle wird erst durch Liganden bedingte Konformationsänderungen zugänglich. Katalysiert wird die Spaltung durch Metalloproteasen, beim Säuger ADAM10/TACE, wodurch die Ektodomäne von Notch entfernt wird (Brou et al., 2000; Gordon et al., 2007; Mumm et al., 2000; Parks et al., 2000). Das extrazellulär trunkierte Notch-Protein wird nun ein letztes Mal und in diesem Fall durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex in der Transmembranregion an S3 gespalten, wodurch der intrazelluläre Bereich von Notch (Notch IC) freigesetzt wird (De Strooper et al., 1999; Okochi et al., 2002; Schroeter et al., 1998; Struhl and Adachi, 2000; Zhao et al., 2005). Die S3 Spaltung kann an der Zelloberfläche oder aber in Endosomen stattfinden. Nach Freisetzung wandert Notch IC in den Kern, wo es mit dem DNA-Bindeprotein CBF1 interagiert und so die Transkription von Notch-Zielgenen induziert. Die Dreifach-Spaltung stellt sicher, dass ein signalgebendes Notch-Fragment nur aus einem Volllänge Notch-Protein generiert wird, welches korrekt synthetisiert, an die Zelloberfläche exportiert und durch geeignete Ligandenbindung aktiviert wurde.

Man weiß heute, dass eine Reihe an posttranslationalen Modifizierungen des Notch-Rezeptors und seiner Liganden, wie Glycosylierung und Ubiquitinierung, den Notch-Signalweg regulieren. Der Effekt der Glycosylierung im Notch-Signalweg ist komplex und bisherige Untersuchungen haben sich auf die Rolle der Glycosylierung des Notch-Rezeptors konzentriert. Glycosylierungen im Golgi-Apparat, aber auch trans-Golgi gewährleisten einen voll funktionsfähigen Rezeptor und erhöhen die ligandenspezifische Bindung (Übersicht: Kopan and Ilagan, 2009). Glycosyltransferasen der Fringe-Familie sind für das Anfügen von N-Acetylglucosamin an spezifische EGF-Wiederholungen an der extrazellulären Domäne von Notch verantwortlich (Haines and Irvine, 2003; Ju et al., 2000; Moloney et al., 2000; Okajima et al., 2003; Panin et al., 1997). Diese Modifizierung begrenzt die Aktivierung der Notch-Signalgebung auf Delta-Liganden, wo hingegen die Jagged-induzierte Signalgebung inhibiert wird (Hicks et al., 2000). Aber auch die Endozytose und der Transport des Rezeptors und seiner Liganden durch die Zelle, sowie die von Ubiquitinierung abhängige

Degradation von Notch stellen kritische modulatorische Faktoren der Signalwegsaktivierung dar (Übersicht: Kopan and Ilagan, 2009).

### 1.3.3 Das CSL-Protein und seine Funktion im Notch-Signalweg

#### 1.3.3.1 Das zelluläre Effektormolekül CBF1

CBF1, auch RBP-Jk genannt, gehört zur Familie der CSL-Proteine (CBF1, *C-promotor binding factor* im Menschen; SuH, *Suppressor of Hairless* in *Drosophila melanogaster*, Lag-1 in *Caenorhabditis elegans*). CSL-Proteine sind Transkriptionsfaktoren und dabei stark konservierte Proteine, die als zentrale Effektoren im Notch-Signalweg fungieren. Die essentielle Funktion von CBF1 wurde in verschiedenen Experimenten belegt. In *knock-out* Mäusen wirkte sich der CBF1-Verlust lethal auf die Entwicklung der Embryonen aus (Oka et al., 1995). Konditionale Deletionen von CBF1 führten im hämatopoetischen System zu einer Unterbrechung der T-Zell-Entwicklung und der ektopischen Entwicklung von B-Zellen im Thymus (Han et al., 2002). Innerhalb der Zelle findet sich CSL im Zellkern. Dies steht im Gegensatz zu dem CSL-Protein aus *Drosophila*, welches im Zytoplasma bis zur Bindung von Notch IC verweilt und erst als Komplex in den Zellkern gelangt. Die Lokalisierung im Zellkern bei Säugern ist bedingt durch die Interaktion mit dem Korepressorkomplex SMRT/SKIP. Dabei scheint vor allem SMRT die kritische Komponente für den Eintritt von CSL in den Zellkern auszumachen. CSL-Mutanten, die nicht in der Lage sind SMRT zu binden, gelangen auch nicht in den Kern (Zhou et al., 2000).

Das ubiquitär exprimierte Protein CBF1 ist 60 kDa schwer und besteht seiner Kristallstruktur nach aus drei Struktur-Domänen: Einer N- und C-terminalen Domäne (NTD As 42-178; CTD As 31-36 und As 353-442), die durch eine zentrale *Beta-Trefoil*-Domäne (BTD) (As 179-326) verbunden sind (Kovall and Hendrickson, 2004). Die Regionen NTD und CTD weisen in ihrer Struktur Ähnlichkeit mit Transkriptionsfaktoren der Rel-Familie, wie z.B. NFκB oder NFAT, auf. Durch Kristallstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass CBF1 als Monomer über NTD und BTD an die DNA bindet. Es konnte jedoch keine abgegrenzte DNA-Bindedomäne bestimmt werden. Die DNA-Bindung erfolgt vielmehr über einzelne Aminosäurereste, die über die NTD und die BTD verteilt sind (Kovall and Hendrickson, 2004). Dabei bindet CBF1 spezifisch an die DNA-Sequenz 5'-CGTGGGAA-3', was erstmals in *in vitro* Experimenten gezeigt werden konnte (Chung et al., 1994; Tun et al., 1994). CBF1 verfügt über eine Zellkernlokalisierungssequenz <sup>81</sup>KKKKE<sup>85</sup> (Amakawa et al., 1993) und kann über die As 120-200 einen Repressorkomplex binden (Hayward, 2004).

Notch IC allein hat keine DNA-Bindeaktivität, sondern wird nach Interaktion mit CBF1 durch dieses an die DNA rekrutiert (Carroll et al., 2006; Purslove and Mackay, 2005). Über diesen

sich ausbildenden Komplex erfolgt dann die transkriptionelle Regulierung von Notch-Zielgenen.

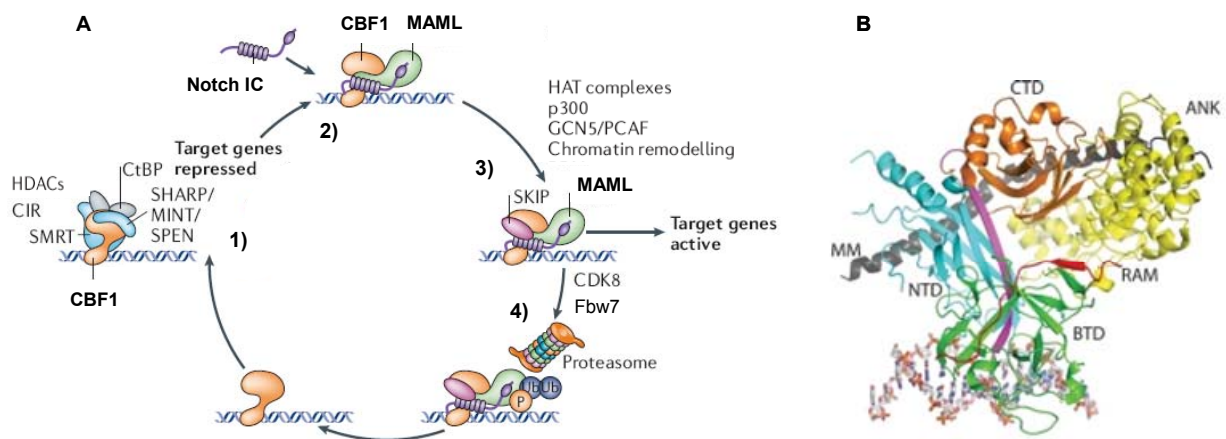
### 1.3.3.2 *Die Interaktion von Notch und CBF1 und die Aktivierung von Notch-Zielgenen*

CSL-Proteine sind für die Aktivierung von Zielgenen des Notch-Signalwegs verantwortlich und essentiell. In Abwesenheit von Notch IC rekrutiert CBF1 einen Korepressorkomplex (Hsieh et al., 1999; Kao et al., 1998), der in Abhängigkeit der Notch-Zielgene verschiedene Komponenten enthält (siehe Abb. 1.2). Dem Komplex können SMRT (auch als NcoR bekannt), SKIP (Ski-interacting protein), CIR (CBF1 *interacting corepressor*), KyoT2, CtBP und SHARP (auch bekannt als MINT und SPEN) angehören. Der Korepressorkomplex führt zur Rekrutierung von Histondeacetylasen (HDACs) oder von Chromatin-verändernden Komplexen wie SAP30. Der Komplex setzt sich aus verschiedenen Kombinationen der genannten Proteine zusammen.

Für den Wechsel von Repression zur Aktivierung bindet Notch an CBF1, was zusammen mit dem Koaktivator MAML zur Ausbildung eines Dreifach-Komplexes führt (Petcherski and Kimble, 2000; Wu et al., 2000).

*In vitro* bindet Notch IC sehr stark über seine RAM-Domäne an CBF1 (Tamura et al., 1995). Die Bindung kann auch über die ANK-Wiederholungen erfolgen, jedoch ist die Bindung um einiges schwächer und kann nicht in jedem System gezeigt werden (Del Bianco et al., 2008; Friedmann et al., 2008; Kato et al., 1997). Kovall und Hendrickson konnten dann anhand der Kristallstruktur zeigen, dass die hochaffine Bindung über ein Tetrapeptidmotiv mit dem Consensus  $\Phi W\Phi P$  innerhalb der RAM-Domäne vermittelt wird. Während es sich bei  $\Phi$  um eine beliebige hydrophobe Aminosäure handeln kann, scheinen Tryptophan (W) und Prolin (P) für die Bindung essentiell zu sein. Die Interaktion findet mit einer hydrophoben Tasche auf der Oberfläche der BTD von CBF1 statt (Kovall and Hendrickson, 2004). Die Bindung induziert Konformationsänderungen in CBF1, welche die Dissoziation des Korepressorkomplexes erleichtern (Lubman et al., 2004; Wilson and Kovall, 2006). Dadurch ist zu erklären, dass die Notch-Bindung den Repressorkomplex von CBF1 verdrängt. Die Rekrutierung von Notch an die DNA durch die RAM-BTD-Bindung erleichtert die Bindung von ANK an die C-terminale Domäne von CBF1 (Bertagna et al., 2008; Del Bianco et al., 2008; Friedmann et al., 2008). MAML erkennt die CBF1/ANK-Verbindung und bindet darüber an den Komplex, wodurch dieser weiter stabilisiert wird (Del Bianco et al., 2008; Nam et al., 2006; Nam et al., 2003; Wilson and Kovall, 2006). Die Aktivierung der Transkription folgt erst, wenn weitere Transkriptionsfaktoren an den Dreifach-Komplex rekrutiert werden. Durch die Bindung von MAML kommt es in dem Komplex zu Konformationsänderungen, so dass es MAML möglich wird Histonacetylasen (HATs) zu rekrutieren und zu binden (Nam et al.,

2006; Wallberg et al., 2002; Wilson and Kovall, 2006; Wu et al., 2002). Anhand der Kristallstruktur war klar zu erkennen, dass die Bildung des Dreifach-Komplexes bestehend aus CBF1, Notch IC und MAML für die Transaktivierung von Notch-Zielgenen unerlässlich ist. Der Aktivorkomplex setzt sich letztlich aus dem Dreifach-Komplex, den Histonacetyltransferasen (HATs) p300 und PCAF/GCN5 sowie SKIP zusammen. MAML scheint jedoch nicht nur an der transkriptionellen Aktivierung von Notch-Zielgenen, sondern auch an einem anschließenden Notch „turnover“ beteiligt zu sein. Es rekrutiert die Proteine Cyclin C und CDK8, die Notch IC innerhalb der PEST-Domäne phosphorylieren. Als Folge wird Notch IC durch die E3 Ubiquitin Ligase Fbw7 (Sel 10 in *C. elegans*) ubiquitiniert, proteosomal abgebaut und der Aktivorkomplex aufgelöst (Fryer et al., 2004). Damit kehrt der Repressionszustand zurück, wodurch in der Zelle eine neue Signalgebung erfolgen kann.



**Abb. 1.3: Die Zielgenaktivierung von Notch IC.**

(A) Schematisch dargestellt ist die Notch-Aktivierung in Abhängigkeit von CBF1. 1) In Abwesenheit von Notch IC bindet CBF1 einen Repressorkomplex an die DNA, dessen genaue Zusammensetzung abhängig vom Zelltyp ist. 2) Gelangt Notch IC in den Kern, interagiert es mit CBF1, wodurch sich zunächst ein ternärer Komplex aus CBF1, Notch IC und MAML bildet. 3) Dies führt zur Rekrutierung weiterer Koaktivatoren und letztlich zur Transkription von Notch-Zielgenen. 4) Modifizierungen von Notch IC durch die Kinasen CDK8 und Fbw7 führen zum proteosomalen Abbau von Notch IC. (Abb. modifiziert nach Bray et al., 2006). (B) Bänderdiagramm des Dreifach-Komplexes (*C. elegans*) bestehend aus MAML (MM), den ANK-Wiederholungen und RAM von Notch, sowie CBF1 gebunden an DNA. CBF1 ist in seinen drei Strukturdomänen - den N- und C-terminalen Domänen (NTD und BTD) sowie der zentralen Beta-Trefoil-Domäne (BTD) - dargestellt. (Abb. aus Friedmann et al., 2008).

Nach Aktivierung kommt es zur Expression von Notch-Zielgenen, zu denen HES1, 5 und 7 und HEY1, 2, sowie HEYL zählen. Diese Transkriptionsfaktoren werden als die wesentlich primären Effektoren des Notch-Signalwegs angesehen. Weitere Zielgene sind unter anderem die Rezeptoren CD21, CD23 und die Gene MYC, Deltex1, NRARP, CyclinD1 und p21 (Übersicht: Kempkes et al., 2005; Übersicht: Kopan and Ilagan, 2009).

## 1.4 Modulation des Notch-Signalwegs durch virale Proteine

Zahlreiche Viren haben Strategien entwickelt, den Notch-Signalweg zur Regulation viraler und zellulärer Zielgene zu benutzen. EBV war das erste Virus bei dem eine Modulation des zellulären Notch-Signalwegs durch virale Proteine beschrieben wurde. In EBV latent infizierten B-Zellen interagieren die Epstein-Barr Virus nukleären Antigene (EBNA) 2, 3A, 3B und 3C mit CBF1, um ruhende B-Zellen zu aktivieren und latente Infektionen zu etablieren (Hayward et al., 2006). EBNA2 aktiviert wie Notch die Transkription von Zielgenen des Signalwegs. Es bedient sich dabei des DNA-Adaptermoleküls CBF1 und verdrängt den Korepressorkomplex, wodurch die Repression unterbunden wird. Die Bindestelle in CBF1 überlappt mit der Bindestelle des Repressorkomplexes. Dadurch ist zu erklären, dass EBNA2 den Repressorkomplex von CBF1 verdrängt. EBNA2 aktiviert die Transkription, indem es zusätzlich die allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIIH und TFIIIB, die Histonacetyltransferasen p300/CBP, PCAF und den Chromatin-Remodelling-Komplex SWI/SNF rekrutiert. CBF1-Bindestellen finden sich in vielen EBNA2-Promotoren. EBNA2 kann als Funktionsäquivalent zu Notch IC betrachtet werden (Übersicht: Kempkes et al., 2005). Obwohl die Bindestellen von EBNA2 und Notch überlappen, haben Versuche gezeigt, dass die Bindestellen nicht identisch sind, denn es konnten Punktmutationen in CBF1 eingeführt werden, die entweder zum Verlust der EBNA2-Bindung, aber nicht zum Verlust der Notch-Bindung führten oder umgekehrt (Fuchs et al., 2001; Sakai et al., 1998).

Die Proteine der EBNA3-Familie konkurrieren mit EBNA2 um CBF1-Bindung und/oder verhindern die DNA-Bindung von CBF1 (Hayward et al., 2006; Johannsen et al., 1996).

In KSHV-infizierten Zellen konnte gezeigt werden, dass der CBF1/Notch-Signalweg das Überleben latent infizierter Zellen fördert und das Gleichgewicht zwischen Etablierung von Latenz und Reaktivierung der lytischen Phase kontrolliert (Lan et al., 2005b; Lan et al., 2007). Eine KSHV-Infektion kann auf verschiedenen Ebenen zu einer Modulation des Notch-Signalwegs führen. Zum einen regulieren virale Gene die Transkription von Komponenten des Notch-Signalwegs. Zum anderen können sie durch Stabilisierung von Notch IC die Signalgebung von Notch steigern oder verlängern (Emuss et al., 2009; Lan et al., 2007; Liu et al., 2010). Bisher wurde auch für zwei virale Proteine des KSHV eine Interaktion mit CBF1 beschrieben: RTA und LANA.

Bei RTA (Replikations- und Transkriptionsaktivator) handelt es sich um ein Protein der frühen lytischen Phase. Die ektopische Expression von RTA reicht aus, um den lytischen Zyklus vollständig zu aktivieren. RTA aktiviert die Expression einer Vielzahl von lytischen Genen, wie ORF57, ORF59, K8, K12 und vIL-6. Es kann darüber hinaus seine eigene Expression induzieren. Die Autoaktivierung stellt eine wichtige Strategie von KSHV dar, um den lytischen Zyklus maximal zu aktivieren. RTA kann die Promotoren viraler Gene durch direkte Bindung an DNA aktivieren, wie es z.B. für K8, K12 und ORF57 beschrieben worden

ist (Chang et al., 2002; Duan et al., 2001; Lukac et al., 2001; Wen et al., 2009). In einer Suche nach RTA-Bindestellen des KSHV-Genoms konnten 19 Bindestellen identifiziert werden. Die Untersuchungen machten deutlich, dass die Bindestellen untereinander und mit bereits publizierten Bindestellen zum Teil kaum Überlappung zeigten und die RTA-Aktivierung einer komplexen Regulation unterliegt (Chen et al., 2009). Es gibt aber auch RTA-responsive Promotorsequenzen an die RTA nicht direkt bindet, sondern die Transaktivierung durch Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren induziert. Dazu gehört neben C/EBP $\alpha$ , Oct-1 und STAT3, auch die Interaktion mit CBF1 (Gwack et al., 2002; Liang et al., 2002; Liang and Ganem, 2004; Sakakibara et al., 2001; Wang et al., 2003). Die CBF1-abhängige Induktion wurde unter anderem für vIL-6, ORF57 und ORF59 beschrieben (Deng et al., 2002b; Liang et al., 2002; Liu et al., 2008). Die Interaktionsregionen von CBF1 und RTA wurden bereits kartiert. In CBF1 finden sich zwei separate, jedoch benachbarte Regionen, die mit RTA interagieren. Die stärkere Bindung wird über den N-terminalen Bereich von As 1-180 und die schwächere über As 179-500 im zentralen Bereich vermittelt. Die weniger affine Binderegion überlappt somit mit der Binderegion von Notch und EBNA2, die im Bereich As 179-361 liegt. Für RTA konnte eine CBF1-bindende Region im zentralen Bereich des Proteins von As 170-400 definiert werden. Diese Region beinhaltet eine Leucinreiche Wiederholungssequenz, deren Deletion die CBF1-Bindung massiv beeinträchtigt (Liang et al., 2002). Zur Aktivierung der lytischen Genexpression greift RTA in den Notch-Signalweg ein und ahmt dabei die Aktivität von Notch IC nach. Die Interaktion von RTA und CBF1 ist bei der Reaktivierung des Virus ein entscheidender Faktor (Liang et al., 2002; Liang and Ganem, 2003; Staudt and Dittmer, 2007). Ob der lytische Zyklus durch Notch IC allein induziert werden kann, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ergebnisse von Chang und Kollegen belegen, dass Notch IC in der Lage ist, die virale Genexpression zu aktivieren. Allerdings konnte nur eine begrenzte Zahl an Genen aktiviert werden, so dass der lytische Zyklus nicht durch Notch IC induziert werden konnte. RTA z.B. wurde nicht durch Notch aktiviert, obwohl sich in seinem Promotor die funktionelle CBF1-Bindestelle befindet. Dies bekräftigt die essentielle Funktion von RTA als „Switch“-Protein von latenter zu lytischer Phase (Chang et al., 2005a; Lan et al., 2006b). RTA tritt auch als Aktivator zellulärer Gene in Erscheinung. Bislang beschrieben wurden humanes IL-6, CD21 und CD23, wobei Letztere CBF1-abhängig reguliert werden (Chang et al., 2005b; Deng et al., 2002a). Neueste Genexpressionsanalysen zeigten eine Reihe weiterer potentieller Zielgene von RTA auf, die jedoch bislang nicht experimentell bestätigt worden sind. Auffallend jedoch waren die in den Promotorsequenzen gehäuft auftretenden Bindestellen des Transkriptionsfaktors CREB. Wie in Promotor-Reporterstudien gezeigt werden konnte, kann RTA abhängig vom Promotorkontext, als Aktivator oder Inhibitor von CREB-responsiven Genen fungieren (Brown et al., 2010).

LANA1 (Latenz assoziiertes nukleäres Antigen 1) hingegen wird während der Latenz exprimiert und ist mit 222 bis 234 kDa ein sehr großes Protein. Die C-terminale Proteindomäne enthält eine sequenzspezifische DNA-Binderegion, welche konservierte Sequenzen innerhalb der TRs (*terminal repeats*) der viralen DNA erkennt (Ballestas and Kaye, 2001; Garber et al., 2001). Dieser Sequenzabschnitt stellt den Replikationsursprung des latenten viralen Plasmids dar (oriP). Die Bindung von LANA an diese Region ist wichtig für die Replikation der episomalen DNA während der Latenz (Hu et al., 2002). Die N-terminale Domäne von LANA beinhaltet Sequenzen, mit denen das virale Genom an die Chromosomen des zellulären Genoms angehängt werden kann. Die Interaktion findet dabei mit den Histonen H2A und H2B statt und gewährleistet somit die Weitergabe des viralen Genoms an die nächste Tochtergeneration der Wirtszelle (Barbera et al., 2006; Piolot et al., 2001). LANA ist an der Aufrechterhaltung der latenten Phase erheblich beteiligt und kontrolliert die latente Infektion durch Repression von RTA. LANA interagiert ebenfalls mit CBF1. Der LANA/CBF1-Komplex lagert sich an die CBF1-Bindestelle innerhalb des RTA-Promotors an und reprimiert den Promotor (Lan et al., 2005a). Außerdem werden durch die Bindung vermutlich Moleküle rekrutiert, die an der Repression mitbeteiligt sind. Dazu gehören Histondeacetylasen und CBF1-interagierende Korepressoren (Krithivas et al., 2000). LANA interagiert mit verschiedenen zellulären Proteinen. Es inhibiert die p53-Aktivität, was das Überleben latent infizierter Zellen fördert (Friborg et al., 1999). Auch bindet LANA Rb, einen Negativregulator zum Fortschreiten des Zellzyklus, und beeinträchtigt dessen Funktion (Radkov et al., 2000). Des Weiteren wurde die Interaktion mit der Kinase GSK-3 $\beta$  beschrieben, was die Hochregulierung von  $\beta$ -Catenin bewirkt und ein transkriptionelles Programm zum Eintritt in die S-Phase einleitet (Fujimuro et al., 2003). Außerdem ist LANA ein transkriptioneller Koaktivator von JUN (An et al., 2004).

In Vorarbeiten war es möglich, einen dritten Interaktionspartner von CBF1 zu identifizieren: den viralen Interferon regulatorischen Faktor 4 (vIRF4). Dieser Hinweis auf eine mögliche Modulation des Notch-Signalwegs durch vIRF4, bildete die Motivation diese Arbeit zu beginnen.



## 1.5 Zielsetzung

Die Arbeitsgruppe Kempkes arbeitet schon seit geraumer Zeit an der Modulation des CBF1/Notch-Signalwegs durch herpesvirale Proteine. Neben den Epstein-Barr nukleären Antigenen (EBNA)2, 3A, 3B und 3C aus EBV interagieren auch die KSHV-Proteine RTA und LANA mit CBF1. CBF1 ist ein Effektormolekül, welches in KSHV-infizierten Zellen das zelluläre Überleben und den viralen Lebenszyklus zu kontrollieren scheint, wodurch es im Kontext von KSHV assoziierten Erkrankungen eine wichtige Position einnimmt. Vor Beginn meiner Doktorarbeit war deshalb ein alle offene Leserahmen des KSHV umfassender Hefe-*Two-Hybrid*-Screen der Arbeitsgruppen Haas und Kempkes durchgeführt worden, um nach weiteren mit CBF1 interagierenden KSHV-Proteinen zu suchen. Auf diesem Weg konnte vIRF4 als neuer Interaktionspartner von CBF1 identifiziert werden. Die Interaktion konnte ich während meiner Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Kempkes in verschiedenen zellulären Systemen verifizieren.

Für vIRF4 liegen bisher wenig publizierte Daten vor. Aufgrund homologer Sequenzen zu zellulären Interferon regulatorischen Faktoren wurde vIRF4 in die Gruppe der viralen Interferon regulatorischen Faktoren eingestuft. Eine mögliche Rolle im Interferonsignalweg konnte bis heute nicht bestätigt werden. Weitere Publikationen weisen ihm möglicherweise eine Rolle als Transkriptstabilisator und eine Beteiligung in Prozessen der Apoptose zu. Seine genaue Funktion ist jedoch nicht geklärt. Durch seine Interaktion mit CBF1 war erstmals eine Verknüpfung zum Notch-Signalweg gegeben.

In meiner Doktorarbeit wollte ich zunächst die Interaktion von vIRF4 und CBF1 näher beschreiben. Dazu sollte die genaue CBF1-Bindestelle in vIRF4 kartiert werden. Sowohl die mit CBF1 interagierenden EBV- als auch die KSHV-Proteine fungieren als transkriptionelle Regulatoren. Das CBF1-Protein, als Interaktionspartner der viralen Proteine, bildet dabei das zentrale Element und fungiert als Adapterprotein, welches virale Proteine an die Promotoren der Zielgene rekrutiert. Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe Kempkes beschäftigen sich mit der zentralen Frage, welcher molekulare Mechanismus der herpesviralen Regulation von Genen zugrunde liegt, und ob die viralen Proteine an gleiche oder ähnliche Cis-aktive Sequenzen der Zielgen-Promotoren binden. Zelluläre und virale Zielgene von vIRF4 sind bislang nicht beschrieben worden. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass vIRF4 in einem GAL4-abhängigen Reportersystem als Repressor wirkte. Im zweiten Teil meiner Arbeit sollten deshalb erstmals in einer genomweiten vergleichenden Genexpressionsanalyse (Affymetrix-Array) zelluläre Zielgene von vIRF4 identifiziert und seine Rolle als transkriptioneller Regulator definiert werden. Dies sollte Aufschluss bringen, ob eine Modulation der Notch-Signatur vorliegt und gleichzeitig geeignete Kandidatengene hervorbringen, um in zukünftigen Studien den molekularen Mechanismus der Regulation zu untersuchen. Diesbezüglich sollte auch geklärt werden, ob vIRF4 möglicherweise über das

Adapterprotein CBF1 an Zielgene rekrutiert wird. Die Bestimmung der minimalen Binderegion von CBF1 in vIRF4 sollte es ermöglichen, eine vIRF4-Mutante zu generieren, die nicht mehr in der Lage ist, CBF1 zu binden. Mit dieser sollte dann die CBF1-abhängige Regulation von Zielgenen in einem geeigneten zellulären System untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Hefestamm

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendeter Hefestamm

Hefestamm	Beschreibung
AH109	<i>MATa</i> ; <i>trp1-901</i> ; <i>leu2-3, 112</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3-200</i> ; <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> ; <i>LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3</i> , <i>GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2</i> ; <i>URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i> (James et al., 1996)

Tab. 2.2: Reportergene und ihre Phänotypen

Reportergen	Genprodukt	Positiver Phänotyp
<i>ADE2</i>	Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase	Ade <sup>+</sup> : Adenin-Prototrophie
<i>HIS3</i>	Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase	His <sup>+</sup> : Histidin-Prototrophie

### 2.2 Bakterienstämme

Tab. 2.3: In dieser Arbeit verwendeter Hefestamm

Bakterienstamm	Beschreibung
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> , <i>lacI</i> <sup>-</sup> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , Δ( <i>lacZYA-argF</i> ), U169, F80d/ <i>lacZ</i> ΔM15, <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> ; Invitrogen, UK;
<i>E. coli</i> DB3.1	F <sup>-</sup> , <i>gyrA462</i> , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , Δ( <i>sr1-recA</i> ), <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> (Sm <sup>R</sup> ), <i>xyf5</i> , Δ <i>leu</i> , <i>mtl-1</i> ; Invitrogen, UK
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ(DE3), pLysS, Cm <sup>r</sup> ; Promega, Deutschland;

### 2.3 Zelllinien

Tab. 2.4: Allgemeine Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
BC-1	humane Lymphomzelllinie, latent infiziert mit EBV und KSHV (Cesarman et al., 1995)
BCBL-1	humane Lymphomzelllinie, latent infiziert mit KSHV (Renne et al., 1995)

HEK293	humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, transformiert durch DNA-Fragmente des Adenovirus Typ 5 (Graham et al., 1977)
HeLa	humane Zervix-Karzinom-Zelllinie (Scherer et al., 1953)

Tab. 2.5: In der AG Kempkes hergestellte Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Bezeichnung der Zell-linie in dieser Arbeit
BS611.1	BC-1 Zellen stabil transfiziert mit einem Leervektor zur Dox-induzierbaren, alleinigen Expression des NGFR (Plasmid BS477.4)	tet-leer-BC-1
BS611.2	BC-1 Zellen stabil transfiziert mit einem Vektor zur Dox-induzierbaren Expression von HA-vIRF4 und dem NGFR (Plasmid BS488.5)	tet-vIRF4-BC-1
KHe913*	BC-1 Zellen stabil transfiziert mit einem Vektor zur Dox-induzierbaren Expression der HA-vIRF4-Mutante ( $\Delta 201-240/W471A/P473A$ ) und dem NGFR (Plasmid KHe906)	tet-vIRF4mt-BCBL-1

Zelllinien, die in dieser Arbeit hergestellt wurden, sind mit „\*“ gekennzeichnet.

Dox = Doxycyclin; HA = Hemagglutinin des humanen Influenza Virus; tet = Tetracyclin; mt = Mutante; NGFR = *Nerve Growth Factor Receptor*;

## 2.4 Oligonukleotide/Primer

Alle Oligonukleotide wurden bei Metabion GmbH, Deutschland synthetisiert.

Tab. 2.6: Primer zur Klonierung mit dem Gateway®-System

In **fett** sind die Sequenzen der zur Klonierung in den Vektor pDonor207 notwendigen Anlagerungssequenzen (*attB-Sites*) dargestellt. Die forward Primer (fo/fw) enthalten am 5'-Ende einen Teil der *attB1-Site*, während die reversen Primer (re) einen Teil der *attB2-Site* enthalten. Die Primer SP343.1 ex fo und SP343.2 ex re sind im 3'-Bereich komplementär zu dem Teil der *attB-Sites*, der über die spezifischen Primer angehängt wurde und enthalten im 5'-Bereich den Rest der *attB-Sites*. Die Primer wurden so gewählt, dass sie „in frame“ mit dem Startcodon ATG der *attB1-Site* und dem Stopcodon UAG (CTA) der *attB2-Site* waren.

Bezeichnung	Genfragment	Sequenz 5' → 3'
SP343.1 ex fo	Universelle Primer zur Vervollständigung der <i>attB-Sites</i>	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</b>
SP343.2 ex re		<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</b>

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
KHe189 fw	<b>AAAAGCAGGCTCCGCCATGGGAGATCTTCCTGTCACGG</b>
KHe189 re	<b>AGAAAGCTGGGTCTATCAATGTAGACTATCCCAAATG</b>

KHe193 fw	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCAGCGGGTGTCTTTTGTG</b>
KHe346 fw	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATGCCTCGCTACACGGAG</b>
KHe346 re	<b>AGAAAGCTGGGTCTATTAGTCTCTGTGGTAAATGG</b>
KHe371 fw	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCCTAAAGCCGGTGGC</b>
KHe371 re	<b>AGAAAGCTGGGTCTAACGTCCATACACCGTCTG</b>
KHe375 re	<b>AGAAAGCTGGGTCTAGTAGCTTTGTTCTCTAGTG</b>
KHe379 fw	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGAGGAGGCAGGGGCTG</b>
KHe379 re	<b>AGAAAGCTGGGTCTAAGCAGGCGGATCTCCG</b>
KHe383 re	<b>AGAAAGCTGGGTCTACCATGGAAAACACGCAGG</b>
KHe458 fw	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCTGTTGTCCCCCAATG</b>
KHe459 re	<b>AGAAAGCTGGGTCTAGGCAGCCTTCTGTTCACTG</b>
KHe460 fw	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTGCTCCGTGTGGATACCAG</b>
KHe460 re	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTGCTCCGTGTGGATACCAG</b>

Tab. 2.7: Sonstige Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
KHe185 fw *	GATCGAATTCGCAATACGCGCGCCTGTTTGGCACCCACCAGTTGGTCACGC CGGATGACTCGAGGATC
KHe185 re *	GATCCTCGAGTCATCCGGCGTGACCAACTGGTGGGTGCCAAACAGGCGCG CGTATTGCGAATTCGATC
KHe408 fw	AGCTAGTTGTGGCGAGAAAG
KHe408 re	CCCACATGGGCCTACTATAAC
KHe568.1 fw *	GATCGAATTCGCTCCGTGTGGATACCAGTGAATGAGGGCGCATCTACCTC AGGTATGGGGTCTCTGGGTGACTCGAGGATC
KHe568.1 re *	GATCCTCGAGTCACCCAGAGGACCCCATACCTGAGGTAGATGCGCCCTCA TTCACTGGTATCCACACGGAGCAGAATTCGATC
KHe568.2 fw *	GATCGAATTCACGCGACAAGTTACGCAGGCCTCGTCTTTACGTGGCGGG TTCCCGGAGATCCGCCTGCTTGACTCGAGGATC
KHe568.2 re *	GATCCTCGAGTCAAGCAGGCGGATCTCCGGGAACCCGCCACGTAAAGGAC GAGGCTGCGTAACTTGTGCGGTGAATTCGATC
KHe569.1 fw **	P-ACGCCGTGGTGCCGGAAGTTCGCAC
KHe569.1 re **	P-GACCAACTGGGGCGTGGGCAACAGGCGCG
KHe812 fw *	GATCGAATTCGCAATACGCGCGCCTGTTGCCACGCCCCAGTTGGTCACGC CGGATGACTCGAGGATC
KHe812 re *	GATCCTCGAGTCATCCGGCGTGACCAACTGGGGCGTGGGCAACAGGCGCG CGTATTGCGAATTCGATC
KHe813 fw	CCATCAACGCTGACCGGCCCTTCAG
KHe813 re	GGCAGCCTTCTGTTTCAGTCGTTATATCGC

\* Die jeweiligen fw- und re-Primerpaare sind zueinander komplementär und enthalten am 5'-Ende eine *EcoRI*-Site und am 3'-Ende eine *XhoI*-Site (dargestellt in **fett**) mit Nukleotidüberhängen. Unmittelbar vor der *XhoI*-Site (in 5' Richtung) war ein Stoppcodon angefügt worden.

\*\* Die Primer für die zielgerichtete Mutagenese enthalten am 5'-Ende eine Phosphatgruppe (P) und wurden über HPLC aufgereinigt. Die mutierten Nukleotide sind **fett** dargestellt. Der Primer, über den die Punktmutationen eingeführt werden sollten, wurde so gewählt, dass in 3'- und 5'-Richtung der mutierten Nukleotide ein komplementärer Sequenzbereich von 10 Nukleotiden vorhanden ist.

**Tab. 2.8: Primer zur Quantifizierung von Transkripten mittels *Real-time* PCR**

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Universal Probe Library Assay Design Center (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>) oder des online-Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) ausgewählt. Zur Quantifizierung von Transkripten mittels *Real-time* PCR wurden die Primer nach Möglichkeit so gewählt, dass das Amplifikat Exon-Intron-Exon-Grenzen enthält. Waren zahlreiche Transkripte für ein Gen annotiert, so wurden mit Hilfe des Ensembl Genome Browsers (<http://www.ensembl.org>) diejenigen Exons für die Primerauswahl bestimmt, die in möglichst allen Transkripten enthalten sind und in der *Real-time* PCR zu einem Produkt identischer Größe führen.

Gen	Bezeichnung der Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing-temp. [°C]	Produktgröße [bp]
18S rRNA	GS43.1 for	CGGCTACCACATCCAAGGAA	60	187
	GS43.1 rev	GCTGGAATTACCGCGGCT		
EGR1	KHe985.3 fw	AGCCCTACGAGCACCTGAC	60	92
	KHe985.3 re	GGTTTGGCTGGGGTAACTG		
FAS	KHe985.10 fw	AAGCCCTGTCCTCCAGGT	60	113
	KHe985.10 re	GAAAAATGGGCTTTGTCTGTG		
GAPDH	BS688 for	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	62	226
	BS688 rev	GAAGATGGTGATGGGATTTTC		
G6PD	KHe968 fw	GAGCCAGATGCACTTCGTG	60	91
	KHe968 re	GGGCTTCTCCAGCTCAATC		
IL12A	KHe985.1 fw	GAATGCAAAGCTTCTGATGGA	60	112
	KHe985.1 re	TGGCACAGTCTCACTGTTGAA		
JUN	KHe985.6 fw	CCAAAGGATAGTGCGATGTTT	60	62
	KHe985.6 re	CTGTCCCTCTCCACTGCAAC		
MAML2	KHe863-MAML2 fw	CAGCCTGCCCAATCTCTACC	62	297
	KHe863-MAML2 re	TGCTCCATGATCTGCCTCTG		
MUC1	KHe1049.1 fw	AGTGCCGCCGAAAGAACTAC	60	225
	KHe1049 re	CTGCTGCCACCATTACCTG		
MYC	KHe930.1 fw	CACCAGCAGCGACTCTGA	60	102
	KHe930.1 re	GATCCAGACTCTGACCTTTTGC		
NGFR	KHe823 fw	CTTGTGGAGCCAACCAGAC	60	193
	KHe823 re	CCAGTCGTCTCATCCTGGTAG		
OAS2	KHe985.2 fw	CCTGCCTTTAATGCACTGG	60	71
	KHe985.2 re	ATGAGCCCTGCATAAACCTC		
PDCD4	KHe985.11 fw	TGGAAAGCGTAAAGATAGTGTGTG	60	91
	KHe985.11 re	TTCTTTCAGCAGCATATCAATCTC		
RGS1	KHe863-RGS1 fw	GCCAGGAATGTTCTTCTCTGC	62	164
	KHe863-RGS1 re	GGAAGATTTTCATTCCAGATTCCAG		

vIRF4	BS556 for	TGTGTATGGGAACCTTCGTG	62	276
	BS556 rev	TTACCAAACCACCAGCCTTC		

bp = Basenpaar(e); temp. = Temperatur; fw = *forward*; re = *reverse*

## 2.5 Plasmide

Tab. 2.9: Leervektoren und in der Arbeitsgruppe Kempkes bereits vorhandene *Entry*- und Expressionsvektoren (Gateway®-kompatibel)

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pHACR3-Dest	Säuger- <i>Destination</i> -Vektor zur Expression von N-HA-Fusionsproteinen; Ursprungsvektor pCR3	AG Jürgen Haas, Max von Pettenkofer Institut, München
pGADT7-Dest	Hefe- <i>Destination</i> -Vektor zur Expression von HA-GAL4-AD-Fusionsproteinen für das Hefe Two-Hybrid System; Ursprungsvektor pGADT7	
pGBKT7-Dest	Hefe- <i>Destination</i> -Vektor zur Expression von MYC-GAL4-DBD-Fusionsproteinen für das Hefe Two-Hybrid System; Ursprungsvektor pGBKT7;	
KHe140	vIRF4 in pDonor207	
pDEST15	Bakterien- <i>Destination</i> -Vektor zur Expression von N-GST-Fusionsproteinen;	Invitrogen, UK
pDonor207	Donor-Vektor	
pGBKT7	Hefevektor zur Expression MYC-GAL4-DBD-Fusionsproteinen für das Hefe Two-Hybrid System	AG Bettina Kempkes, Helmholtz Zentrum München
pMYCCS1	Säugervektor zur Expression von N-MYC-Fusionsproteinen; Ursprungsvektor pcDNA3	
BS126	vIRF4 in pHACR3	
BS477.4	von pRTS abstammender (Bornkamm et al., 2005), jedoch Gateway®-kompatibler Säuger- <i>Destination</i> -Vektor mit Dox-induzierbarem, bidirektionalem Promotor zur Expression eines N-HA-Fusionsproteins und des NGFR;	

BS488.5	vIRF4 in BS477.4	AG Bettina Kempkes, Helmholtz Zentrum München
SP138*	CBF1 in pGBKT7	
SP160*	CBF1 in pMYCCS1	
SP443	Vektor-Rückgrat pDEST15, ohne <i>ccdB</i> -Gen	
KT108	vIRF1 in pDonor207	
KT107	vIRF3 in pDonor207	

\* nicht Gateway®-kompatibel; konventionell kloniert;

**Tab. 2.10: Durch Gateway®-BP-Reaktion hergestellte *Entry*-Vektoren in pDonor207**

Bezeichnung	kodiertes Proteinfolement	verwendete Primer	Template
KHe188.1	vIRF4 As 315-911	KHe189 fw/re	KHe140
KHe192.1	vIRF4 As 731-911	KHe193 fw	KHe140
		KHe189 re	
KHe370	vIRF4 As 1-80	KHe371 fw/re	KHe140
KHe378	vIRF4 As 161-240	KHe379 fw/re	KHe140
KHe415	vIRF4 aa 1-314	KHe371 fw	KHe140
		KHe383 re	
KHe416	vIRF4 As 1-240	KHe371 fw	KHe140
		KHe379 re	
KHe417	vIRF4 As 1-160	KHe371 fw	KHe140
		KHe375 re	
KHe461	vIRF4 As 140-240	KHe458 fw	KHe140
		KHe379 re	
KHe462	vIRF4 As 161-200	KHe379 fw	KHe140
		KHe459 re	
KHe463	vIRF4 As 201-240	KHe460 fw	KHe140
		KHe379 re	
KHe486	vIRF2	KHe346 fw/re	* KHe478

\* PCR-Produkt; Isolierung von Gesamt-RNA aus lytischen BCBL-1-Zellen, cDNA-Synthese und PCR mit den „*nested*“ Primern KHe408 fw/re; As = Aminosäure;

**Tab. 2.11: Durch sonstige Klonierung hergestellte *Entry*-Vektoren**

Bezeichnung	Beschreibung	Klonierungsweg
KHe142	vIRF4 As 1-632	Restriktionsverdau von KHe140 mit <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> ; Klenow-Nukleotidergänzung; Religation des Vektors;



KHe143	vIRF4 As 1-313	Restriktionsverdau von KHe140 mit <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i> ; Klenow-Nukleotidergänzung; Religation des Vektors;
KHe785-1	vIRF4 W471A/P473A	Zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese mit <i>Phusion<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit</i> . PCR über das Template KHe140 mit den Primern KHe569.1 fw/re; Selbstligation des PCR-Produkts;
KHe815	vIRF4 ΔAs 201-240	Zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese mit <i>Phusion<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit</i> . PCR über das Template KHe140 mit den Primern KHe813 fw/re; Selbstligation des PCR-Produkts;
KHe816	vIRF4ΔAs 201-240, W471A/P473A	Zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese mit <i>Phusion<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit</i> . PCR über das Template KHe785-1 mit den Primern KHe813fw/re; Selbstligation des PCR-Produkts;

W = Aminosäure Tryptophan; A = Aminosäure Alanin;

Tab. 2.12: Durch Gateway®-LR-Reaktion hergestellte Expressionsvektoren

Bezeichnung	Beschreibung		verwendete Entry-Vektoren
	kodiertes Protein /Proteinfragment	Destination-Vektor	
KHe107	vIRF4 As 1-632	pGADT7-Dest	KHe142
KHe153	vIRF4 As 1-313	pDest15-GST	KHe143
KHe188	vIRF4 As 315-911	pGADT7-Dest	KHe188.1
KHe192	vIRF4 As 731-911	pGADT7-Dest	KHe192.1
KHe372	vIRF4 As 1-80	pGADT7-Dest	KHe370
KHe382	vIRF4 As 161-240	pGADT7-Dest	KHe378
KHe435	vIRF4 As 1-314	pGADT7-Dest	KHe415
KHe436	vIRF4 As 1-240	pGADT7-Dest	KHe416
KHe437	vIRF4 As 1-160	pGADT7-Dest	KHe417
KHe503	vIRF4 As 140-240	pGADT7-Dest	KHe461
KHe504	vIRF4 As 161-200	pGADT7-Dest	KHe462
KHe505	vIRF4 As 201-240	pGADT7-Dest	KHe463
KHe514	vIRF1	pHACR3-Dest	KT108
KHe515	vIRF2	pHACR3-Dest	KHe486
KHe516	vIRF3	pHACR3-Dest	KT107
KHe569.1.3	vIRF4 W471A/P473A	pHACR3-Dest	KHe785-1
KHe793-1	vIRF4 W471A/P473A	pGADT7-Dest	KHe785-1
KHe840	vIRF4 ΔAs 201-240,	pGADT7-Dest	KHe815
KHe841	vIRF4 ΔAs 201-240	pHACR3-Dest	KHe815
KHe842	vIRF4 ΔAs 201-240, W471A/P473A	pGADT7-Dest	KHe816

KHe843	vIRF4 ΔAs 201-240, W471A/P473A	pHACR3	KHe816
KHe891	vIRF4 As 315-911	pHACR3	KHe188.1
KHe906	vIRF4 ΔAs 201-240, W471A/P473A	BS477.4	KHe816

Tab. 2.13: Durch sonstige Klonierung hergestellte Expressionsplasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Klonierungsweg	Primer
KHe184	vIRF4 As 466-478 in pGADT7	<i>Annealen</i> von Oligonukleotiden; Restriktionsverdau mit <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>	KHe185 fw/re
KHe568.1	vIRF4 As 201-220 in pGADT7	<i>Annealen</i> von Oligonukleotiden; Restriktionsverdau mit <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>	KHe568.1 fw/re
KHe568.2	vIRF4 As 221-240 in pGADT7	<i>Annealen</i> von Oligonukleotiden; Restriktionsverdau mit <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>	KHe568.2 fw/re
KHe812	vIRF4 As 466-478 W471A/P473A in pGADT7	<i>Annealen</i> von Oligonukleotiden; Restriktionsverdau mit <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i>	KHe812 fw/re

## 2.6 Antikörper

Tab. 2.14: Primäre Antikörper

Spezifität	Spezies, Sonstiges	Anwendung	Bezugsquelle
α-CBF1 (RBP-J 7A11)	Ratte, m.k., IgG2b	WB	E. Kremmer, IMI
α-CBF1 (RBJ 6E7)	Ratte, m.k., IgG2b	IP	E. Kremmer, IMI
α-Dog CD3	Ratte, m.k., IgG1	IP	E. Kremmer, IMI
α-FGC (4F11.1)	Ratte, m.k., IgG2b	IP	E. Kremmer, IMI
α-GAPDH	Maus, m.k., IgG1	WB	Millipore (Chemicon), USA
α-GST (2C8)	Maus, m.k., IgG1	FACS	E. Kremmer, IMI
α-HA (3F10)	Ratte, m.k., IgG1	WB, IP	Roche Diagnostics, Deutschland
α-MYC (DE 9E10)	Maus, m.k., IgG1	IP	E. Kremer, IMI
α-NGF-R (HB8737-1)	Maus, m.k., IgG1	FACS	E. Kremmer, IMI
α-PARP	Maus, m.k., IgG1	WB	BD Pharmingen™, USA
α-RTA (RTA 7A11)	Ratte, m.k., IgG2b	WB	E. Kremmer, IMI
α-Tubulin	Kaninchen, p.k.	WB	Abcam, UK
α-vIRF4 (vIRF 8F8)	Ratte, m.k., IgG1	WB, IP,	E. Kremmer, IMI
α-vIRF4 (vIRF 1B6)	Ratte, m.k., IgG1	IF	E. Kremmer, IMI

Tab. 2.15: Sekundäre gekoppelte Antikörper

Spezifität	Spezies, Sonstiges	Anwendung	Bezugsquelle
$\alpha$ -Kanninchen-IgG-HRP	Ziege	WB	Promega GmbH, Deutschland
$\alpha$ -Maus-IgG-Cy5	Ziege	FACS	Dianova, Deutschland
$\alpha$ -Maus-IgG-HRP	Schaf	WB	Amersham Biosciences
$\alpha$ -Maus-IgG-HRP	Esel	WB	Santa Cruz Biotechnology, USA
$\alpha$ -Ratte-IgG-Cy3	Ziege	IF	Dianova, Deutschland
$\alpha$ -Ratte-IgG-HRP	Ziege	WB	Santa Cruz Biotechnology, USA

Cy3 = Cyanin 3; Cy5 = Cyanin 5; FACS = *fluorescence activated cell sorting*; GST = Glutathion-S-Transferase; HRP = Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*); IF = Immunfluoreszenz; IMI = Institut für molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München, Deutschland; IP = Immunpräzipitation; m.k. = monoklonal; p.k. = polyklonal; WB = Westernblot;

## 2.7 Materialien für die Kultur von Bakterien und Hefen

Adenin-Hemisulfat	Sigma-Aldrich, USA
Aminosäuren	Sigma-Aldrich, USA
Ammoniumsulfat	ICN Biomedicals, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, USA
Bacto-Agar	Becton, Dickinson
Bacto-trypton	Invitrogen, UK
Bacto-yeast-extract	Invitrogen, UK
Gentamycin	Sigma-Aldrich, USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
Pepton (aus Casein)	Roth, Deutschland
Select-Agar	Invitrogen, UK
Uracil	Sigma-Aldrich, USA
Yeast extract SERVABACTER®	
Powder	Serva, Deutschland
Yeast Nitrogen Base	Sigma-Aldrich, USA
Without Amino acids and Ammonium Sulfate	

## 2.8 Materialien für die Kultur humaner Zelllinien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Deutschland
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, USA
Fötale Kälberserum	Biochrom AG, Deutschland
„Gene Pulser“-Küvetten	Bio-Rad Laboratories, USA
L-Glutamin	GIBCO, UK
OptiMEM Medium	GIBCO, UK
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, UK

Puromycin	Merck (Calbiochem), Deutschland
RPMI 1640-Medium	GIBCO, UK
Trypsin	GIBCO, UK

## 2.9 DNA- und Protein- Standards

50 bp DNA ladder plus	MBI Fermentas, Deutschland
100 bp DNA ladder plus	MBI Fermentas, Deutschland
1 kb DNA ladder	Invitrogen, UK
2 log Marker	New England Biolabs, USA
Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, Deutschland

## 2.10 Enzyme und Reaktionssysteme

BP Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen, UK
ECL™	GE Healthcare, Deutschland
ECL Plus	GE Healthcare, Deutschland
FuGENE® Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit	Affymetrix, USA
GeneChip WT Terminal Labeling Kit	Affymetrix, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, USA
Jet Star 2.0	Genomed, Deutschland
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
LR Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen, UK
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Deutschland
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Deutschland
peqGold Trifast	PeqLab, Deutschland
Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Finnzymes, Finnland
PrimeSTAR® HS DNA-Polymerase	Takara Bio Inc., Japan
Pwo DNA-Polymerase und Puffer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs, USA; MBI Fermentas, Deutschland; Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
RNase A	Sigma-Aldrich, USA
RNasin	Promega GmbH, Deutschland
RNeasy MinElute Cleanup Kit	QIAGEN, Deutschland
RQ1 RNase-Free DNase	Promega GmbH, Deutschland
T4 DNA Ligase und Puffer	New England Biolabs, USA
TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega GmbH, Deutschland
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

WT Expression Kit

Ambion/ Applied Biosystems, USA

## 2.11 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 30 %	Roth, Deutschland
Acetyl-Coenzym A	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Agarose	Invitrogen, UK
APS	MP Biomedicals, Deutschland
Albumin Fraktion V	Roth, Deutschland
Chloroform	Merck, Deutschland
Complete Protease Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako GmbH, Deutschland
dNTPs	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Deutschland
Formaldehyd, 37%	Merck, Deutschland
Formamid, deionisiert	Roth, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Deutschland
MS2 RNA	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Paraformaldehyd	ICN Biomedicals GmbH, Deutschland
Polyethylenglycol	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, USA
Protein G-Sepharose	GE Healthcare, Deutschland
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, USA
Salmon Testis Carrier DNA	Sigma-Aldrich, USA
TEMED	Amersham Bioscience, Schweden
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deutschland

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von MP Biomedicals, Deutschland, Merck und Sigma bezogen.

## 2.12 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
<i>Econo-Pac chromatography columns</i>	Bio-Rad Laboratories, USA
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, USA
Gel-Blotting-Papier 3 MM	Whatman Ltd., USA
GeneChip Human Gene 1.0 ST	Microarrays Affymetrix, USA
Hyperfilm ECL <sup>TM</sup>	Amersham Bioscience, Schweden
Fuji Super RX X-Ray Film	Fujifilm, Japan

Immobilion PVDF Membran	Millipore, USA
LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
LS Columns, $\mu$ Columns	Miltenyi Biotech, Deutschland
Membranfilter	Schleicher & Schuell, Deutschland
Minisart Einwegspritzenfilter, steril, 0,43 $\mu$ m	Sartorius, Deutschland
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Deutschland

Plastikwaren wurden von Becton-Dickinson GmbH, Eppendorf, Greiner GmbH und NUNC GmbH, Deutschland, bezogen.

## 2.13 Laborausstattung

3.2 RS Varifuge	Heraeus Instruments, Deutschland
Bakterienschüttler innovaR 44	New Brunswick Scientific, USA
Bakterien-Inkubator	Heraeus Instruments, Deutschland
Centrifuge 5415	Eppendorf, Deutschland
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Deutschland
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories, USA
Elektroporationsküvetten, Gene Pulser 0,4 cm	Bio-Rad Laboratories, USA
FACS Calibur	Becton Dickinson, Deutschland
Fusion FX7™	PeqLab, Deutschland
Geldokumentationssystem	Ltf Labortechnik, Deutschland
Gelelektrophoresekammer (DNA, RNA)	Bio-Rad Laboratories, USA
Gelelektrophoresekammer (Protein)	PeqLab, Deutschland
Leica TCS SP2 Konfokal-Mikroskop	GE Healthcare (Amersham), UK
Light Cycler 480	Leica Microsystems, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Zeiss AG, Deutschland
Orion Microplate Luminometer	Menzel-Gläser, Deutschland
PCR System 9600	Berthold Detection Systems, USA
Quarzküvette	Perkin Elmer, Deutschland
Rotanta 460 R Zentrifuge	Biometra GmbH, Deutschland
Sonifikator II W-250 D	Hettich Zentrifugen, Deutschland
Spannungsquellen	Branson Ultrasonics Corporation, USA
Spektralphotometer Gene Ray	Bio-Rad Laboratories, USA
Spektralphotometer Ultrospec 1100 pro (DNA, RNA)	Biometra GmbH, Deutschland
Sterilbank	GE Healthcare (Amersham), UK
UV-Transiluminator	Heraeus Instruments, Deutschland
	PeqLab, Deutschland

Thermomixer 5436

Eppendorf, Deutschland

Zell-Inkubator HERA cell 240

Heraeus Instruments, Deutschland

## 2.14 Software und Datenbanken

AIDA (Advanced Image Data Analyser), Version 2.2

Raytest, Deutschland

BIO-1D Advanced

PeqLab, Deutschland

CellQuestPro

BD Biosciences, USA

Chromas Lite, Version 2.01

<http://www.technelysium.com.au>

Clone Manager 8, Version 8.0

Scientific & Educational Software, USA

ClustalW (Alignments)

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>

Ensembl Genome Browser

<http://www.ensembl.org>

FUSION-CAPT™

PeqLab, Deutschland

Genesis

<http://genome.tugraz.at>

Genomatix

<http://www.genomatix.de>

LightCycler Software 480

Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

NCBI Homepage

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Primer3

<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

RNAi designer

<https://rnaidesigner.invitrogen.com/sirna>

UCSC Genome Browser

<http://genome.ucsc.edu>

Universal ProbeLibrary Assay Design Center

<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=UP030>

### 3 Methoden

Alle angewandten Methoden wurden, wenn nicht anders vermerkt, anhand laborinterner Protokolle der AG Kempkes durchgeführt.

#### 3.1 Arbeiten mit Bakterien

##### 3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

Die Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder, zur Vereinzelung von Kolonien, auf LB-Agarplatten bei 37 °C kultiviert. Durch Zugabe von Antibiotika wurden transformierte Bakterien entsprechend dem vektorkodierten Resistenzgen selektiert. Die kurzzeitige Lagerung von Bakterien erfolgte bei 4 °C. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden 900 µl einer über Nacht gewachsenen Suspensionskultur mit 100 µl DMSO versetzt und bei -80 °C eingefroren.

**LB-Medium (-Agar):** 1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Yeast-Extract; 1 % NaCl; (1,5 % Agar); pH 7,4;

**Antibiotika:** 100 µg/ml oder 50 µg/ml Ampicillin; 50 µg/ml Kanamycin; 15 µg/ml Geneticin;

**Antibiotikazusatz:** 100 µg/ml Ampicillin bzw. 15 µg/ml Gentamycin

##### 3.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* DH5α nach der CaCl<sub>2</sub>

###### Methode

Fünfhundert ml LB-Medium wurden mit einer 5 ml Übernachtskultur von *E.coli* DH5α angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 unter starkem Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde anschließend auf eisgekühlte 50 ml-Röhrchen verteilt, 10 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (1600 g, 7 min, 4 °C). Die Zellpellets wurden in jeweils 10 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (1100 g, 5 min, 4 °C). Die Zellpellets wurden erneut in 10 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (1100 g, 5 min, 4 °C). Schließlich wurden die Zellpellets in 2 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, in Aliquots von 200-300 µl in eiskalte 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, in einem Eis-Ethanol-Gemisch schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

**CaCl<sub>2</sub>-Lösung:** 60 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM PIPES (pH 7,0); 15 % Glycerol;



### 3.1.3 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien durch Hitzeschock

Hundert  $\mu\text{l}$  chemisch-kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 10  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz oder 10  $\mu\text{l}$  LR-Reaktionsansatz oder 50-100 ng der zu transformierenden DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 50 sec bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt, nochmals kurz auf Eis inkubiert und mit 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C geschüttelt, um die Expression des Resistenzgens zu ermöglichen. Im Anschluss wurden die Bakterien abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 100-200  $\mu\text{l}$  Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in geeigneten Mengen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.1.4 Bestimmung der Transformationseffizienz

Um die Transformationseffizienz der kompetenten *E. coli*-DH5 $\alpha$  zu bestimmen, wurden 100 ng pUC19-DNA in die Bakterien transformiert. Nach dem Hitzeschock bei 42 °C für 50 sec wurden 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium zugegeben und 100  $\mu\text{l}$  der Verdünnungen  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  auf LB/Amp-Platten (100  $\mu\text{g/ml}$ ) ausplattiert. Angestrebt wurde eine Transformationseffizienz von  $10^5$ - $10^7$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA.

## 3.2 Arbeiten mit Hefe

### 3.2.1 Hefetransformation mit der Licium-Acetat-Methode

Eine Kolonie des Hefestammes AH 109 wurde dünn auf einer YPD-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Hefen einer halben Platte wurden dann mit einem sterilen Zahnstocher abgeschabt und in 500  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 13000 U/min für 20 sec abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml sterilem TE/LiAc gewaschen. Dieser Ansatz wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet in 750  $\mu\text{l}$  TE/LiAc (ausreichend für 15 Ansätze) resuspendiert. Nun wurden für jeden Ansatz je 1  $\mu\text{l}$  DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) vorgelegt. Pro Ansatz wurden 5  $\mu\text{l}$  Salmon Testes *Carrier* DNA (9,5 mg/ml; 5 min bei 95 °C), 50  $\mu\text{l}$  kompetente Hefezellen und 300  $\mu\text{l}$  PEG/LiAc hinzupipettiert und gut resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30 °C, folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 min. Anschließend wurde jeder Ansatz bei 13000 U/min für 20 sec abzentrifugiert und in 50  $\mu\text{l}$  sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde auf 1/6 einer 13 cm Selektivplatte (-Trp, -Leu) ausplattiert, auf der nur Zellen wachsen konnten, die das Plasmid aufgenommen hatten. Die Inkubation erfolgte 3-4 Tage bei 30 °C.

**PEG/LiAc-Lösung:** 8 ml 50 % PEG 3350, 1 ml 10 x TE-Puffer, 1 ml 10 x LiAc;

**TE/LiAc:** 8 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml 10 x TE-Puffer, 1 ml 10 x LiAc;

**10 x TE-Puffer:** 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5;

**10 x LiAc:** 1 M Lithium-Acetat, pH 7,5;

**YPDA-Medium:** Select Peptone (20 g/l), Yeast Extract (10 g/l), Agar (20 g/l), 0,003 % Adenin-Hemisulfat, ad H<sub>2</sub>O, 2 % Glucose;

**SD-Medium:** Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat (1,7 g/l), Ammoniumsulfat (5 g/l), Agar (20 g/l), 10% 10x Dropout Lösung, ad H<sub>2</sub>O, pH 5.8, 2 % Glucose;

**10x Dropout-Lösung (DO):** L-Adenin-Hemisulfat (200 mg/l), L-Arginin HCl (200 mg/l), L-Histidin HCl Monohydrat (200 mg/l), L-Isoleucin (300 mg/l), L-Leucin (1000 mg/l), L-Lysin HCl (300 mg/l), L-Methionin (200 mg/l), L-Phenylalanin (500 mg/l), L-Threonin (2000 mg/l), L-Tryptophan (200 mg/l), L-Tyrosin (300 mg/l), L-Uracil (200 mg/l), L-Valin (1500 mg/l), ad H<sub>2</sub>O;

Um ein bestimmtes Minimalmedium herzustellen, werden eine oder mehrere Aminosäuren weggelassen.

### 3.2.2 Test auf Selbstaktivierung

Jeweils zwei bis drei Transformanden eines jeden Ansatzes wurden mit einem sterilen Zahnstocher auf einer permissiven Platte (SD-Platte ohne Tryptophan und Leucin) ausgestrichen und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

Die gewachsenen Kolonien wurden auf verschiedene Selektionsmedien replikaplatziert:

SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Adenin;

SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin mit unterschiedlichen Konzentrationen an 3'-AT (0mM, 1mM, 2,5mM, 5mM, 7,5mM, 10mM, 20mM und 50mM);

## 3.3 Arbeiten mit Säugerzellen

### 3.3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 Medium kultiviert, dem 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 4 mM L-Glutamin und 10 bzw. 20 % fötales Kälberserum (FKS) zugesetzt worden war.

### 3.3.1.1 Adhärenente Zelllinien

HeLa-Zellen und die Zelllinie HEK293 wurden in Medium mit 10 % FKS kultiviert. Zum Ablösen der adhärenenten Zellen wurden diese mit Trypsin versetzt, bis die Zellen vollständig benetzt waren. Nach einer Inkubationszeit von 2-5 min wurden die Zellen abgelöst, mit frischem Medium verdünnt und ausgesät. Eine Verdünnung mit frischem Medium im Verhältnis 1:10 erfolgte alle 3-4 Tage.

### 3.3.1.2 Suspensionszellen

Die Zelllinien BC-1, BCBL-1, tet-vIRF4-BC-1 und tet-vIRF4 mt-BC1 wurden in Medium mit 20 % FKS kultiviert. Zum Erhalt des episomalen pRTS-1-Derivats wurde dem Medium der Zelllinien tet-vIRF4-BC-1 und tet-vIRF4 mt-BC1, 1 µg/ml Puromycin zugesetzt. Die Zelllinien wurden alle 3-4 Tage mit frischem Medium 1:4 verdünnt. In Versuchsphasen wurden die Zelllinien für standardisierte Kulturbedingungen zweimal wöchentlich auf eine Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt.

## 3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau versetzt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgte optisch anhand des Farbunterschieds. Trypanblau kann nur durch die Membran toter Zellen eindringen, weshalb tote Zellen blau angefärbt sind. Lebende Zellen hingegen erscheinen aufgrund der intakten Membran farblos. Durch Auszählen der Großquadrate der Neubauer-Zählkammer konnte mit folgender Formel die Zellzahl berechnet werden:

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

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

## 3.3.3 Aufbewahrung von Zellen

Um Zellen für längere Zeit aufzubewahren wurden  $1 \times 10^7$  Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein 1,8 ml Einfrierrohrchen (NUNC Cryotube) überführt. Die Röhrchen wurden in einem Kühlmodul mit Isopropanolmantel für mindestens 2 Tage bei -80 °C aufbewahrt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um cryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese möglichst schnell wieder aufgetaut, in 20 ml vorgewärmten Medium zum Entfernen von DMSO gewaschen und schließlich in frischem Medium resuspendiert. Erforderliche Selektionszusätze wurden dem Medium erst am nächsten Tag zugegeben.

**Einfriermedium:** 40 % RPMI 1640-Medium; 50 % FKS; 10 % DMSO;

### 3.3.4 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen nach der PEI-Methode

Für die transiente Transfektion von HEK293-Zellen wurde Polyethylenimin (PEI) verwendet. Am Vortag wurden die Zellen 1:3 verdünnt und in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Für eine effiziente Transfektion sollte die Platte am nächsten Tag zu 70 % konfluent sein. Das Zellkulturmedium wurde durch 5 ml serum- und antibiotikafreies Medium (OptiMEM) ersetzt. Pro Transfektionsansatz wurden 5-10 µg DNA mit 300 µl OptiMEM, sowie 12 µg PEI mit 300 µl OptiMEM in zwei verschiedenen Ansätzen gemischt. Beide Reaktionsansätze wurden vereinigt und für 20-30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Mix vorsichtig dem Medium der Zellkulturplatte hinzupipettiert und durch Schwenken der Platte verteilt. Nach einer Inkubation von 4 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> wurde der Transfektionsansatz durch 10 ml serumhaltiges Medium ersetzt und die Zellen weiter unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellernte erfolgte nach 24-48 h.

### 3.3.5 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit dem „FuGENE<sup>®</sup>“ Reagenz

Für die transiente Transfektion von HeLa-Zellen wurde das FuGENE Transfektionsreagenz (Roche) verwendet, da nur so eine Transfektionseffizienz von 70-80 % erreicht wurde. Die Zellen wurden am Vortag 1:3 verdünnt und in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät (zur anschließenden Zellfraktionierung) oder 3 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Loch in eine 6-Loch Platte ausgesät (zur anschließenden Immunfluoreszenzfärbung und Analyse im Konfokalmikroskop).

Der Transfektionsansatz setzt sich wie in Tabelle 3.1 angegeben zusammen.

**Tab. 3.1: Transfektionsansatz**

	10 cm-Schale	6-Loch Platte
<b>DNA Menge</b>	10 µg	2 µg
<b>OptiMEM</b>	500 µl	100 µl
<b>Fugene Reagenz</b>	40 µl	8 µl

Der Mix wurde für 15 min bei RT inkubiert und dann vorsichtig in das serumhaltige Kulturmedium pipettiert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet.

### 3.3.6 Analyse von Zellen durch FACS (*fluorescence activated cell sorting*)

Alle FACS-Analysen wurden an einem FACSCalibur Gerät (BD Biosciences) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CellQuestPro.

#### 3.3.6.1 *Propidiumiodidfärbung zur lebend/tot-Analyse von Zellen*

Lebende Zellen besitzen eine intakte Zellmembran, welche für Propidiumiodid (PI) nicht durchlässig ist. Bei toten Zellen erhöht sich die Membranpermeabilität, wodurch PI in die Zelle gelangen und in die DNA interkalieren kann. Die angefärbten Zellen können im FACS detektiert werden.

Für die PI-Färbung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, in 10 ml PBS/ 5 % FKS gewaschen und schließlich in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen. Unmittelbar vor der Messung wurde den Zellen PI (Endkonzentration 1  $\mu$ g/ml) zupipettiert.

Entscheidend für die Differenzierung von toten und lebenden Zellen ist die kurze Anfärbedauer von maximal 5-10 min. In dieser Zeit nehmen tote Zellen PI vollständig, lebende Zellen hingegen einen kaum messbaren Anteil auf (Belloc et al., 1994; Jacobs and Pipho, 1983). Die Messung erfolgte im FACS im Fluoreszenzkanal 3. PI absorbiert Licht einer Wellenlänge von 493 nm und emittiert im rot-fluoreszierenden Bereich von 636 nm.

**Propidiumiodid-Lösung:** 100  $\mu$ g/ml Propidiumiodid in H<sub>2</sub>O;

#### 3.3.6.2 *Nachweis des NGFR*

Für die Detektion des NGFR auf der Zelloberfläche wurden  $1 \times 10^6$  Zellen geerntet (300 g, 10 min, RT), in FACS-Puffer gewaschen und für 30 min auf Eis mit 50  $\mu$ l Maus- $\alpha$ -human-NGF-R Antikörper-Überstand bzw. einer entsprechenden Isotypkontrolle (Maus- $\alpha$ -GST, 2C8) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen (500 g, 5 min, 4 °C) und mit dem sekundären, Cy5-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Maus Antikörper (1:50 verdünnt in FACS-Puffer) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 750  $\mu$ l einer 2%igen PFA-Lösung aufgenommen und für die Analyse in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte im FACS im Fluoreszenzkanal 4.

**FACS-Puffer:** 5 % FKS in PBS

### 3.4 Arbeiten mit RNA

Sämtliche RNA-Arbeiten dieser Arbeit wurden mit gestopften Pipettenspitzen, RNase-freien Reaktionsgefäßen und Reagenzien sowie auf Eis durchgeführt.

#### 3.4.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung von peqGOLD TriFast (PEQLAB) nach Angaben des Herstellers. Das präparierte RNA-Pellet wurde in 35 µl sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen und für 10 min bei 56 °C unter Schütteln gelöst. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Absorption bei einer Verdünnung der präparierten RNA von 1:100 in einer Quarzküvette im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Gleichzeitig wurde die Verunreinigung durch Proteine (280 nm) und organische Verbindungen (230 nm) überprüft. Ein  $A_{260/280}$  - und  $A_{260/230}$  - Verhältnis von 1,8-2 entspricht einer RNA-Reinheit von 90 bis 100 %. Die Qualität der RNA wurde außerdem durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte anhand folgender Formel:

$$c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

#### 3.4.2 Markierung nascenter RNA und RNA-Präparation

Um eine Differenzierung von neu synthetisierter RNA (nascenter RNA) und Gesamt-RNA vornehmen zu können, besteht die Möglichkeit, nascente RNA durch den Einbau von 4-Thiouridin (4sU) zu markieren. Hierfür wurden die Zellen mit einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml in 90 ml Kulturen ausgesät und zum Markierungszeitpunkt mit 30 ml frischem, 4sU-haltigem Zellkulturmedium versetzt, so dass eine Endkonzentration von 100 µM 4sU bei einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml erreicht wurde. Nach einer Markierungsdauer von 1 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (500 g, 5 min, RT), das Zellpellet ( $1 \times 10^7$  Zellen) zügig in 2 ml peqGOLD TriFast (PEQLAB) resuspendiert, die Suspension in Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden pro ml mit 200 µl Chloroform vermischt, 30 sec stark geschüttelt, für 3 min bei RT inkubiert und abzentrifugiert (13.000 g, 15 min, 4 °C). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit ½ Volumen RNA-Präzipitationspuffer und ½ Volumen Isopropanol vermischt, 10 min bei RT inkubiert und abzentrifugiert (13.000 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde das RNA-Pellet 4 x mit 75 % Ethanol gewaschen (13.000 g, 10 min, 4 °C), nach kurzem Trocknen mit 50 µl TE-Puffer versetzt und 10 min bei 56 °C unter Schütteln

gelöst. Die RNA-Konzentration wurde erneut spektrometrisch bestimmt und die präparierte RNA auf 1 µg RNA/ µl TE-Puffer eingestellt. Bis zur Anreicherung der neu synthetisierten RNA wurde diese bei -80 °C gelagert.

**RNA-Präzipitationspuffer:** 1,2 M NaCl; 0,8 M NaCitrat

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

### 3.4.3 Anreicherung nascenter, 4sU-markierter RNA

Nach Markierung der nascenten RNA mit 4sU, konnte diese nun von der Gesamt-RNA getrennt angereichert werden. Die Anreicherung wurde in der AG Dölken (Genzentrum München) durchgeführt (laborinternes Protokoll nach Bernd Raedle). In dem Anreicherungsschritt wurden jeweils 50-100 µg der präparierten Gesamt-RNA in einer Konzentration von 100 ng/µl (in TE) eingesetzt. Durch Zugabe von 0,2 µg/µl Biotinylierungs-Reagenz *EZ-Link Biotin-HPDP* (Thermo Fisher Scientific) und 1,5-stündiger Inkubation bei RT erfolgte die Biotinylierung der 4sU-markierten RNA. Durch eine anschließende Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Fällung wurde ungebundenes Biotin-HPDP entfernt und die RNA nach Zugabe von 1/10 Volumen 5 M NaCl und 1 Volumen Isopropanol bei 20.000 g und 4 °C für 20 min präzipitiert. Im Anschluss wurde das RNA-Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen (20.000 g, 10 min, 4 °C), in 50-100 µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst und die RNA-Konzentration spektrometrisch bestimmt. Es folgte eine Denaturierung der RNA bei 65 °C für 10 min. Danach wurden die Proben 5 min auf Eis abgekühlt und bis zu 100 µg biotinylierte, 4sU-markierte RNA zur Anreicherung mit 100 µl µMACS Streptavidin *Beads* (Miltenyi Biotec) vermischt und für 15 min unter Rotation bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf µ *Columns* in einem µMACS Magnet (Miltenyi Biotec) geladen und die *Beads* 3 x mit je 1 ml 65 °C warmen Waschpuffer und 3 x mit je 1 ml Waschpuffer bei RT gewaschen. Durch 2-malige Zugabe von 100 µl 100 mM DTT in einem Abstand von 5 min konnte die neu synthetisierte, 4su-markierte RNA eluiert und mit Hilfe des *RNeasy MinElute Cleanup Kits* (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt werden.

**Waschpuffer:** 100 mM Tris/HCl, pH 7,4; 10 mM EDTA, pH 8,0; 1 M NaCl; 0,1 % Tween 20;

### 3.4.4 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Vor weiterer Verwendung der extrahierten RNA wurde deren Qualität durch Agarose-Gelelektrophorese in einem 1,2%igen Agarosegel und Ethidiumbromidfärbung untersucht. Dem Gel waren zur Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen 1x MOPS-Laufpuffer und 2,2 M Formaldehyd (37 %) zugegeben worden. Nun wurden zu 5 µg RNA 2 µl 5 x MOPS,

3,5 µl Formaldehyd (37 %), 10 µl Formamid und 0,08 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und 15 min bei 56 °C denaturiert. Im Anschluss wurden die Proben 5 min auf Eis inkubiert, mit 2 µl RNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 1-2 V/cm.

Nach der Elektrophorese können im Gel die Banden der 18S- und der 28S-rRNA detektiert werden. Intakte RNA zeichnet sich durch nach unten scharf begrenzte Banden aus, wo hingegen degradierte RNA im Gel einen sogenannten „Schmier“ erzeugt.

**MOPS-Laufpuffer:** 40 mM MOPS pH 7; 10 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA pH 8,0;

**RNA-Ladepuffer:** 50 % Glycerol; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,4 % Bromphenolblau;

### 3.4.5 DNase Verdau von RNA

Vor der weiteren Verwendung der RNA wurde eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA durch einen DNase Verdau entfernt. Pro Reaktionsansatz wurden 20 µg RNA mit 2 U RQ1 RNase-Free DNase sowie 40 U RNasin (Promega) nach Angaben des Herstellers verdaut und die RNA-Konzentration erneut spektrometrisch bestimmt.

### 3.4.6 Reverse Transkription in cDNA

Unter Verwendung des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems bzw. mit dem *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* von Roche wurden 1 µg DNase behandelte RNA gemäß des Herstellerprotokolls revers in cDNA transkribiert. Dabei wurden Zufalls-p(dN)<sub>6</sub>-Primer eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde parallel ein Ansatz ohne Zusatz von reverser Transkriptase mitgeführt. Für die anschließende Quantifizierung von Transkripten durch *Real-time* PCR wurde die cDNA unverdünnt oder falls erforderlich mit 1 x cDNA-Synthesepuffer 1:8 verdünnt (18 S rRNA) und in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

### 3.4.7 Genexpressionsanalyse unter Verwendung von GeneChip Gene 1.0 ST Arrays

In die genomweite Genexpressionsanalyse in An- und Abwesenheit von vIRF4 wurde Gesamt-RNA bzw. nascente RNA der konditionalen Zelllinie tet-vIRF4-BC-1 eingesetzt. Die weitere Aufarbeitung und Array-Hybridisierung der (i) Gesamt-RNA erfolgte in der AG Hoffmann (*Expression Core Facility*, TU München), der (ii) nascenten RNA in der AG Martin (Genzentrum, LMU). In beiden Fällen wurde ausgehend von je 1 µg Gesamt-RNA unter



Verwendung des *WT Expression Kit* (Ambion) nach Angaben des Herstellers Sinn-Strang cDNA (ss-cDNA) synthetisiert. Hierzu wurde die RNA unter Verwendung von Oligo-(dT)-Primern, die einen T7-Promotor tragen, zunächst in einzelsträngige cDNA revers transkribiert. Anschließend erfolgte die Zweitstrangsynthese (engl. *double-strand*, dsDNA) und eine Entfernung von RNA, Enzymen, Salzen, überschüssigen Primern und dNTPs. Die gereinigte dsDNA wurde dann mittels T7 RNA Polymerase *in vitro* zu cRNA (auch als *antisense* RNA bezeichnet; aRNA) transkribiert. Bei der Zweitstrangsynthese (ss-cDNA) erfolgte der Einbau von dUTP. Nach Entfernen der aRNA wurde die ss-cDNA gereinigt und mit Hilfe des *GeneChip WT Terminal Labeling Kit* (Affymetrix) fragmentiert und mit Biotin markiert. Die biotinylierte ss-cDNA konnte zur Hybridisierung von Oligonukleotid-Arrays des Typs Human Gene 1.0 ST (Affymetrix) eingesetzt werden. Auf den Arrays werden 28869 Gene (jedes durch ein *Probeset*) repräsentiert, wovon 28132 *Probesets* mit Ensembl-Information und 19734 *Probesets* mit voller Transkriptinformation durch *GenBank* und *Refseq* vertreten sind. Hybridisierung, Waschen und Färben der Arrays erfolgten unter Verwendung des *GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit* (Affymetrix) nach Angaben des Herstellers. Die an die *Probesets* eines Arrays gebundene, biotinylierte ss-cDNA wurde dabei mit Hilfe von Streptavidin-Phycoerythrin und biotinylierten  $\alpha$ -Streptavidin Antikörpern gefärbt und die Fluoreszenzsignale anschließend mit einem *GeneChip Scanner 3000* gemessen. Die Menge des bei 570 nm emittierten Lichts ist dabei proportional zur Menge der gebundenen ss-cDNA.

Die als CEL-Datei gespeicherten Intensitätswerte der Arrays mit Gesamt-RNA wurden von Frau Prazeres da Costa (*Expression Core Facility*, AG Hoffmann, TU München) mittels des R *package affy* ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) unter Verwendung des *robust multiarray average* (RMA) Algorithmus (Irizarry, et al., 2003) normalisiert. Die normalisierten Expressionswerte der 28869 *Probesets* auf den Arrays wurden zusammen mit einer aktuellen Probeset-Annotierung von Frau Prazeres da Costa in Form einer Excel-Tabelle zur Verfügung gestellt. Für die Bestimmung differentiell regulierter *Probesets* wurde für die in Abschnitt 4.6.3 angegebenen Arraygruppierungen mit den linearen Expressionswerten und mit Hilfe von Excel ein Student'scher T-Test unter gleicher Varianz durchgeführt. Die Tabelle war Grundlage für die Ermittlung von vIRF4-Zielgenen und ist im CD-ROM Anhang dieser Arbeit enthalten.

Die als CEL-Datei gespeicherten Intensitätswerte der Arrays mit nascenter RNA wurden in der AG Martin mittels des R *package affy* ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) unter Verwendung des *robust multiarray average* (RMA) Algorithmus (Irizarry, et al., 2003) normalisiert. Eine bioinformatische Auswertung war aufgrund des experimentellen Ansatzes nicht möglich.

### 3.5 Arbeiten mit DNA

#### 3.5.1 Schnelle Plasmidisolierung

Ein ml einer 3 ml Bakterien-Über-Nacht-Kultur wurde bei 13000 U/min für 30 sec abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl TENS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 5 min bei RT inkubiert, wodurch es zur Lyse der Bakterien kommt. Danach wurden dem Ansatz 150 µl 3 M NaAc (pH 5,2) zugegeben und gemischt. Dieser Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert und bei 16000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Aus 400 µl des Überstandes wurde die DNA durch Zugabe von 900 µl 100%igem Ethanol gefällt. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und bei 16000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl TER-Puffer gelöst. Hiervon wurden 2 µl in einen Restriktionsverdau eingesetzt.

**TENS:** 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 0,1 M NaOH; 0,5 % SDS;

**TER:** 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A;

#### 3.5.2 Präparative Plasmidisolierung

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxi-Präparation) wurde mit einer 400 ml-Bakterien-Übernachtskultur durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe des „Plasmid-Maxipräparationskits Jetstar Genomed 2.0“ nach dem Herstellerprotokoll. Das Pellet wurde je nach Pelletgröße in 100 bis 300 µl TE-Puffer aufgenommen und zur vollständigen Resuspension 1 h bei RT oder über Nacht im Kühlschrank gelagert.

**TE-Puffer:** 10 mM Tris-HCl (pH7,5); 1 mM EDTA; pH 7,5;

#### 3.5.3 Fällung von Nukleinsäuren

Die Fällung der DNA erfolgte durch die Zugabe des 0,1-fachen Volumens an 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und des 2,5-fachen Volumens an eiskaltem 100%igem Ethanol. Nach einer Inkubation bei -80°C für 30 min wurde die DNA durch Zentrifugation für 20 min bei 13000 U/m bei 4°C gefällt und mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in sterilem dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 3.5.4 Spektrometrische Bestimmung des Nukleinsäuregehalts

Um den Nukleinsäuregehalt einer DNA-Probe zu bestimmen, wurde diese verdünnt (meist 1:300) und die Absorption in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm im

Spektralphotometer gemessen. Der Anteil an absorbiertem ultraviolettem Licht ist proportional zur Menge an Basen in der Nukleinsäure. Dabei entspricht ein OD-Wert von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Die DNA-Konzentration berechnet sich demnach wie folgt:

$$c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 3.5.5 Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau von DNA wurde das Volumen so gewählt, dass eine Konzentration der eingesetzten DNA von 50 ng/µl nach Möglichkeit nicht überschritten wurde und das Volumen des Enzyms maximal 1/10 des Reaktionsvolumens betrug. 1 U Restriktionsenzym soll 1 µg DNA pro Stunde verdauen. Der Verdau erfolgte nach Angaben des Herstellers mit den empfohlenen Puffern. Bei einem Doppelverdau wurde der Puffer verwendet, durch welchen die höchste Enzymaktivität gegeben war. Die Vollständigkeit des Verdau wurde durch Gelelektrophorese überprüft.

### 3.5.6 Klenow-Nukleotidergänzung

Einige Enzyme liefern in einem Restriktionsverdau sogenannte „klebrige Enden“ (*sticky ends*), d.h. überhängende Enden, bei denen die Enden der komplementären Einzelstränge nicht gleich lang sind. Für eine anschließende Religation des linearisierten Plasmids, werden sogenannte „glatte Enden“ (*blunt ends*) benötigt. Mit Hilfe des Klenow Enzyms (Roche) können fehlende Nukleotide komplementär zum Einzelstrang ergänzt und so glatte Enden erzeugt werden. Das Klenow Enzym stellt das große Fragment der DNA Polymerase I dar und enthält so 5' → 3'-Polymerase- und 3' → 5'-Exonukleaseaktivität. Das Enzym katalysiert das Anfügen von Mononukleotiden in 5' → 3'-Richtung. Dafür wurden 5 µg verdaute DNA mit 4 U Klenow Enzym, 5 mM dNTPs und 10 µl Puffer gemischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 75°C.

### 3.5.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Anhand der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Migrationsgeschwindigkeit der Fragmente ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe.

Je nach Größe der Fragmente erfolgte die Auftrennung in 0,8-1,5%igen Agarosegelen, die in TAE-Laufpuffer angesetzt worden waren. Zur Detektion der Fragmente waren dem Gel 10 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben worden. Das ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und nach Absorption von ultraviolettem Licht bei 254 nm, sichtbares Licht emittiert. Die Proben wurden mit 1 x DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel geladen. Der Gellauf erfolgte bei 5-8 V/cm. Die Fragmentgröße und die DNA-Menge wurden anhand eines DNA-Größenstandards bestimmt.

**TAE-Laufpuffer :** 40 mM Tris-Acetat ; 1 mM EDTA; dH<sub>2</sub>O;

**DNA-Ladepuffer:** 10 % Bromphenolblau; 30 % Glycerin; 60 % dH<sub>2</sub>O;

**DNA-Größenstandard:** 1 kb-Leiter; 100 bp-Leiter; 2 log Marker;

### 3.5.8 Konventionelle PCR (*polymerase chain reaction*)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist es möglich einen bestimmten DNA-Abschnitt unter Verwendung von spezifischen und komplementären Primern *in vitro* zu amplifizieren. In die Reaktion eingesetzt wurde die Pwo DNA Polymerase (Roche), bzw. die PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA-Polymerase (Takara) nach Angaben des Herstellers.

**Tab. 3.2: PCR-Ansatz für die Pwo DNA-Polymerase**

Reagenzien	Volumen (100 µl)	End-konzentration
dNTP-Mix (2mM)	10 µl	200 µM
Primer forward (3 mM)	10 µl	300 nM
Primer reverse (3 mM)	10 µl	300 nM
Template DNA (100 ng/µl)	1 µl	
PCR-Puffer mit MgSO <sub>4</sub> (10x)	10 µl	1 x
Pwo DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
H <sub>2</sub> O	58,5 µl	

**Tab. 3.3: PCR-Programm für die Pwo DNA-Polymerase**

Zyklen	Programm	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	96°C	5 min
5	Denaturierung	94°C	30 sec
	Primerhybridisierung	59°C	30 sec
	Elongation	72°C	30 sec
20	Denaturierung	94°C	30 sec
	Primerhybridisierung	70°C	30 sec
	Elongation	72°C	30 sec
1	Elongation	72°C	7 min

Tab. 3.4: PCR-Ansatz für die PrimeSTAR DNA-Polymerase

Reagenzien	Volumen (50 µl)	End-konzentration
dNTP-Mix (2,5 mM)	4 µl	200 µM
Primer forward (3 mM)	5 µl	300 nM
Primer reverse (3 mM)	5 µl	300 nM
Template DNA (100 ng/µl)	2 µl	
PCR-Puffer (5x)	10 µl	1 x
PrimeSTAR DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl	1,25 U
H <sub>2</sub> O	39,5 µl	

Tab. 3.5: PCR-Programm für die PrimeSTAR DNA-Polymerase

Zyklen	Programm	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	96°C	5 min
25	Denaturierung	94°C	30 sec
	Primerhybridisierung	60°C	5 sec
	Elongation	72°C	30 sec
1	Elongation	72°C	10 min

### 3.5.9 Herstellung kurzer doppelsträngiger DNA aus synthetischen Oligonukleotiden

Sollen zur Klonierung kurze DNA-Fragmente hergestellt werden, so können alternativ zu einer PCR auch Oligonukleotide (Primer) der entsprechenden Sequenz synthetisiert und diese in den Vektor kloniert werden. Die Oligonukleotide müssen zueinander komplementär sein und an den Enden über Restriktionsschnittstellen verfügen, die bei der Synthese mit angefügt wurden. Für das *Annealen* der Oligonukleotide zu einer doppelsträngigen Sequenz wurden je 10 µl eines 100 µM Primerstocks mit 20 µl *Annealing*-Puffer vermischt und für 10 min bei 90 °C inkubiert. Der Mix wurde auf 37 °C abgekühlt und anschließend in einen Restriktionsverdau eingesetzt. Danach konnte die Sequenz mittels Ligase in den gewünschten Vektor kloniert werden. Der Vektor war zuvor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden.

**Annealing-Puffer:** 10 mM Tris/HCl pH 7,4; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl;

### 3.5.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die weitere Verwendung eines PCR-Produkts mussten zunächst aus dem Ansatz die Primer, Nukleotide und die Polymerase entfernt werden. Die Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin® Extract Kit von Macherey-Nagel. Das PCR-Produkt wurde in 2 x 15 bzw. 25 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

Um ein DNA-Fragment nach einem Restriktionsverdau aufzureinigen wurde der Ansatz auf ein Agarosegel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin® Extract Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Das Fragment wurde in 2 x 25 µl 1 x TE-Puffer eluiert.

### 3.5.11 Zielgerichtete *in vitro* Mutagenese

Mit Hilfe des Phusion™ *Site-Directed Mutagenesis Kit* von Finnzymes können gezielt Punktmutationen in DNA-Zielsequenzen (hier in vIRF4) während einer PCR-Reaktion eingefügt werden. In die Reaktion wurde ein die Zielsequenz enthaltendes Plasmid sowie Primer, die die gewünschten Mutationen enthalten, eingesetzt. Die Primer sollten rechts und links des mutierten Bereichs 10 komplementäre Nukleotide enthalten, müssen am 5'-Ende phosphoryliert sein und dürfen sich nicht überlappen. Die Phosphatgruppen am 5'-Ende der Primer ermöglichen nach der PCR-Reaktion eine Selbstligation des PCR-Produkts.

**Tab. 3.6: PCR-Ansatz für die zielgerichtete *in vitro* Mutagenese**

Reagenzien	Volumen (50 µl)	Endkonzentration
5x Phusion HF Buffer	10 µl	1 x
dNTP-Mix 10 mM	1 µl	200 µM
Primer forward 5 µM	5 µl	500 nM
Primer reverse 5 µM	5 µl	500 nM
Template DNA 100 pg/µl	1 µl	10 pg
Hot Start DNA-Pol 2 U/µl	0,5 µl	0,02 U/µl
H <sub>2</sub> O	27,5 µl	

**Tab. 3.7: PCR-Programm für die zielgerichtete *in vitro* Mutagenese**

Zyklen	Programm	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	98°C	30 sec
25	Denaturierung	98°C	10 sec
	Primerhybridisierung	65°C	30 sec
	Elongation	72°C	45 sec/1 kb
1	Elongation	72°C	7 min

Das PCR-Produkt wurde mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt und in 2x 15 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Für die anschließende Selbstligation des PCR-Produkts wurden davon 5 µl mit 5 µl 2 x Ligationspuffer und 0,5 µl Quick T4-Ligase 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und in den Bakterienstamm *E. coli* DH5α transformiert.

### 3.5.12 Klonierung von Plasmidvektoren

#### 3.5.12.1 Konventionelle Klonierung

Zur Klonierung bestimmter Konstrukte wurden die gewünschten Fragmente bzw. *Inserts* entweder durch Restriktion aus einem anderen Plasmid gewonnen, durch PCR hergestellt oder stellten synthetisierte und *annealte* Oligonukleotide dar. Die beiden letzteren Möglichkeiten erfordern das Anfügen von Restriktionsschnittstellen an das 5'-Ende der Primer. Sollten durch die Klonierung Fusionsproteine konstruiert werden, musste darauf geachtet werden, dass sich das Genfragment im gleichen Leserahmen wie der Fusionspartner im Vektor befand. Der Zielvektor wurde ebenfalls mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut. Die beiden Enden wurden mit zwei verschiedenen Enzymen verdaut, um eine Selbstligation zu vermeiden. Nach dem Restriktionsverdau erfolgte für den Vektor und das *Insert* die Aufreinigung durch Agarose-Gelelektrophorese. Im Anschluss daran wurde die Konzentration des Vektors und des *Inserts* ermittelt. Dazu wurden jeweils 10 % der eluierten Fragmente auf ein Gel aufgetragen und die Intensität der Banden mit einem ebenfalls aufgetragenen 2 log-Marker verglichen.

Für die Ligation von Vektor und *Insert* wurde ein Ansatz von 10 µl angesetzt, dem 40 U T4 Ligase hinzupipettiert wurden. Das molare Verhältnis von Vektor zu *Insert* entsprach in der Regel 1:3. Parallel dazu wurde ein Ansatz mit Vektor, ohne *Insert* und ohne Ligase vorbereitet. So konnte überprüft werden, ob der Vektor vollständig geschnitten worden war. Ein weiterer Ansatz ohne *Insert* mit Ligase diente als Kontrolle auf Selbstligation des Vektors. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde der Ligationsansatz in *E. coli* DH5α transformiert, auf LB-Agarplatten mit entsprechender Antibiotikakonzentration ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zum Test auf korrekte Klone, wurden von drei bis fünf Kolonien Flüssigkulturen angeimpft, eine schnelle Plasmidisolierung durchgeführt und die Plasmide durch geeigneten Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit überprüft. Von einem richtigen Klon wurde anschließend eine Maxi-Präparation durchgeführt.

### 3.5.12.2 Das Gateway®-Klonierungssystem: BP- und LR-Reaktion

Die Gateway-Technologie (Invitrogen) stellt eine universale Klonierungsmethode, basierend auf dem Rekombinationssystem des Bacteriophagen Lambda dar. Dadurch ist ein schnelles und hocheffizientes Überführen von DNA in multiple Vektorsysteme möglich.

In der sogenannten „BP-Reaktion“ wird ein PCR-Produkt in den Donor-Vektor (pDonor207) integriert. Dadurch entsteht ein *Entry*-Vektor, ein Zwischenvektor. Durch Rekombination wird das Genfragment in der sogenannten „LR-Reaktion“ in den gewünschten Expressionsvektor kloniert. Der Austausch findet zwischen dem *Entry*-Vektor und einem *Destination*-Vektor statt. Die Zielvektoren, d.h. Donor- und *Destination*-Vektor, enthalten ein toxisches Gen (*ccdB*). Während der Reaktion kommt es zu einem Austausch des DNA-Fragments gegen das toxische Gen. Die eigentliche Rekombination findet zwischen spezifischen Anlagerungssequenzen („*attenuation Sites*“, *att-Sites*) statt, die sowohl das DNA-Fragment, als auch das toxische Gen flankieren. Die Anlagerungssequenzen des DNA-Fragments wurden während der PCR in zwei Schritten angefügt. Nach erfolgreicher Integration des Fragments in den *Destination*-Vektor liegt ein fertiger Expressionsvektor vor, der zur Vervielfältigung in Bakterien transformiert werden kann. Das toxische Gen dient indirekt als Selektionsmittel. Alle transformierten Bakterien, die nicht das Fragment tragen, haben durch Rekombination das toxische Gen aufgenommen. Dadurch sind die Bakterien nicht überlebensfähig und sterben. Auf den Platten können demnach nur Klone wachsen, die das richtige Fragment enthalten.

#### BP-Reaktion:

In die Reaktion wurden 100 ng *Entry*-Vektor, 150 ng *Destination*-Vektor, sowie 1 µl des Enzymmixes LR-Clonase II eingesetzt. Der Ansatz wurde mit TE-Puffer auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt. Die LR-Reaktion erfolgte für 1 h bei 25°C. Zum Abstoppen der Reaktion wurde dem Ansatz 1 µl an Proteinase K zugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert.

#### LR-Reaktion:

In die Reaktion wurden 150 ng PCR-Produkt, 150 ng Donor-Vektor, sowie 2 µl des Enzymmixes BP-Clonase II eingesetzt und der Ansatz mit TE-Puffer auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die BP-Reaktion erfolgte für 1 h bei 25 °C und wurde durch eine Inkubation von 10 min bei 37 °C abgestoppt.

Die Amplifikation der Donor- und *Destination*-Vektoren erfolgte in den *ccdB*-resistenten *E. coli* DB3.1, die eine Mutation im Gyrase-Gen haben und daher die Expression des *ccdB*-Gens tolerieren.



### 3.5.13 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden bei der Firma MWG, Ebersberg, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Chromas Lite.

### 3.5.14 Quantifizierung von cDNA durch *Real-time* PCR

Die Methode der *Real-time* PCR ermöglicht die relative Quantifizierung von Transkripten. In dieser Arbeit wurde das LightCycler 480 II Gerät (96-Lochplatten-Version) zusammen mit dem LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (beides von Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers verwendet. SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der dem Reaktionsmix beigesetzt ist und in doppelsträngige DNA interkaliert. Er absorbiert blaues und emittiert grünes Licht. Nach jedem PCR-Zyklus misst das Gerät die emittierte Fluoreszenz. Der Zeitpunkt, zu dem genügend Amplifikat vorhanden ist, so dass das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund tritt, wird als *Crossing-point* (*Cp*) bezeichnet. Je mehr *Template* vorhanden ist, desto früher tritt das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund. Die Menge an *Template* ist dabei umgekehrt proportional zur Anzahl der erforderlichen PCR-Zyklen. Der *Cp*-Wert wird anhand des Maximum der zweiten Ableitung der während der Amplifikation aufgezeichneten Fluoreszenzkurve berechnet.

Um Schwankungen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA zu berücksichtigen, werden die Transkriptmengen der Zielgene auf ein Referenzgen normalisiert. Als Referenzgen werden meist nicht regulierte Haushaltsgene (hier Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, G6PD bzw. 18S rRNA) herangezogen. Die Transkriptmenge wird anhand einer Standardkurve für das Zielgen und das Referenzgen ermittelt. Dafür wurde entweder ein PCR-Produkt des Transkriptes unter Verwendung des transkriptspezifischen Primerpaares generiert und damit eine Verdünnungsreihe mit den Stufen  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-10}$  in  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  MS2 RNA (Roche Diagnostics) hergestellt oder die cDNA selbst in den Stufen  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-10}$  in  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  MS2 RNA verdünnt. Die Phagen-RNA hat die Funktion eines *Carriers* und erlaubt mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe.

Anhand der Standardkurve kann auch die Effizienz der Reaktion berechnet werden. Hierzu werden die *Cp*-Werte graphisch gegen den dekadischen Logarithmus der relativen Konzentration aufgetragen und die Amplifikationseffizienz aus der Steigung der Geraden ermittelt. Eine optimale Effizienz ergibt sich, wenn die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt wird.

Aus dem Quotient der Transkriptmenge des Zielgens und der Transkriptmenge des Referenzgens errechnet sich die normalisierte Transkriptmenge des Zielgens. Um die relative Transkriptmenge zu berechnen, wird das Verhältnis von Zielsequenz (d.h. das zu quantifizierende Transkript) zu Referenzsequenz (G6PD bzw. 18S rRNA) mit dem Verhältnis

der beiden Sequenzen in einer standardisierten Kalibratorprobe in Bezug gesetzt. Die genaue Berechnung der relativen Transkriptmenge erfolgte anhand folgender Formeln:

$$\text{Relative Transkriptmenge} = (M_{ZSP} / M_{RSP}) / (M_{ZSC} / M_{RSC}) \times MF$$

$M_{ZSP}$ : Menge der Zielsequenz in der Probe;  $M_{RSP}$ : Menge der Referenzsequenz in der Probe

$M_{ZSC}$ : Menge der Zielsequenz im Kalibrator;  $M_{RSC}$ : Menge der Referenzsequenz im Kalibrator

MF: Multiplikationsfaktor, je nach Abundanz des Transkriptes (meist  $10^6$ )

Die jeweilige Menge an Ziel- oder Referenzsequenz ergibt sich dabei nach folgender Formel:

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

$N_n$ : Anzahl der Moleküle im PCR-Zyklus n;  $N_0$ : Anzahl der Moleküle vor Beginn der Reaktion

E: Amplifikationseffizienz;  $C_p$ : *Crossing-point*

Zur relativen Quantifizierung wurde ein PCR-Lauf mit transkriptspezifischen Primern für das entsprechende Zielgen sowie ein weiterer PCR-Lauf mit transkriptspezifischen Primern für das Referenzgen (G6PD bzw. 18S rRNA) unter jeweiligem Einsatz der cDNA-Proben sowie mit zwei Ansätzen des Kalibrators und einem Ansatz mit H<sub>2</sub>O als Kontaminationskontrolle (Programm siehe Tab. 3.8) durchgeführt. Als Kalibrator diente die  $10^{-6}$ -Verdünnung aus der Erstellung der entsprechenden Standardkurve aus Amplifikat oder die  $10^{-4}$ -Verdünnung aus der Erstellung der entsprechenden Standardkurve aus cDNA.

Das Volumen des PCR-Ansatz betrug 10 µl mit einer Primer-Endkonzentration von 0,5 µM und unter Verwendung von je 1 µl cDNA. Die cDNA wurde dabei pur oder in einer angemessenen Verdünnung (1:4 bis 1:8) eingesetzt. Die Qualität der entstandenen PCR-Produkte wurde durch Schmelzkurvenanalyse und Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

**Tab. 3.8: Real-time PCR-Programm für das LightCycler 480 II Gerät**

<i>Analysis Mode</i>	Zyklen	Segment	Temp. [°C]	Ramp Rate [°C/ sec]	Zeit <sup>1</sup>	<i>Acquisition Mode</i>
none	1	Pre-Incubation	95	4,4	10 min	none
Quantification	38-45	Denaturation	95	4,4	3 sec	none
		Annealing	60-63	2,2	10 sec	none
		Extension	72	4,4	20 sec	single
Melting curves	1	Denaturation	95	4,4	5 sec	none
		Annealing	65	2,2	1 min	none
		Melting	97	0,1	-	continuous
none	1	Cooling	40	1,5	10 sec	none

<sup>1</sup> eingehaltene Zeit nach Erreichen der Temperatur; Temp.: Temperatur;

## 3.6 Proteinbiochemische Methoden

### 3.6.1 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen

Zur Herstellung eines vIRF4-Antikörpers wurde ein vIRF4-Fragment (As 1-313) in Bakterien exprimiert, aufgereinigt und als Antigen zur Immunisierung von Ratten eingesetzt. Dazu wurde der N-terminale Bereich des vIRF4 Proteins von As 1-313 mittels des Gateway-Systems in den Expressions-Vektor pDest-15 kloniert. Dadurch wurde die Expression eines Glutathion-S-Transferase (GST)-vIRF4-Fusionsproteins möglich. Als Kontrolle erfolgt auch die Expression und Aufreinigung von GST allein, um auszuschließen, dass Antikörper produziert werden, die sich gegen GST richten.

Die Aufreinigung von GST-gekoppelten Fusionsproteinen aus bakteriellem Extrakt erfolgt durch Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose. Dazu wurde das Plasmid in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS transformiert und die Bakterien auf Ampicillin enthaltenden LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit mehreren Kolonien angeimpft und erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit ungefähr 10 ml der Übernachtskultur wurde 1 l LB-Medium angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,5-0,8 geschüttelt. Anschließend wurde die Expression des Fusionsproteins durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration 1mM) gestartet und die Kultur für weitere 4 h bei 30 °C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde für 10 min bei 4000 U/min abzentrifugiert, einmal in PBS gewaschen und das Zellsediment in 35 ml Bindepuffer resuspendiert. Es folgte eine Ultraschallbehandlung auf Eis für 3 x 2 min, welche die Zellen komplett lysiert und ebenso die entstandenen Einschlusskörperchen aufbricht. Diese Einschlusskörperchen entstehen durch eine spontane Aggregation der Fusionsproteine, nachdem sie von den Bakterien exprimiert worden sind. Das Lysat wurde für 20 min bei 4 °C und 4500 U/min zentrifugiert und das Zellsediment verworfen. Der Überstand wurde mit 200 µl Glutathionsepharose versetzt und 1 h bei 4 °C unter Rollen inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann auf eine *Econo-Pac* Chromatographie-Säule von Bio-Rad gegeben, so dass der nicht gebundene Überstand durchtropfen konnte und als Durchlauf gesammelt wurde. Die Säule wurde mit 40 ml Bindepuffer gewaschen. Einzelne Fraktionen des Waschschrilles wurden aufgefangen. Die Eluation nativer GST-Fusionsproteine durch reduziertes Glutathion erfolgt mit 12 ml Eluationspuffer. Dafür wurde die Säule zunächst für 15 min mit Eluationspuffer inkubiert. Alle Eluate wurden in 1 ml Aliquots gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Reinheit der Fraktionen wurde im Coomassie-Gel und durch einen immunbiochemischen Nachweis im Westernblot mit einem GST-Antikörper überprüft.

**Bindepuffer:** 0,5 M Tris; 5 M Urea; 5 M NaCl; pH 7,5;

**Eluationspuffer:** 0,5 M Tris; 5 M Urea; 5 M NaCl; 1 M DTT; 1 M Glutathion; pH 7,5;

### 3.6.2 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden  $1 \times 10^7$  Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, in 1 ml PBS gewaschen und in 200  $\mu$ l eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis folgte eine dreimalige Sonifikation mit je 10 Impulsen bei einer Amplitude von 10 % und unter Verwendung einer 3 mm konischen Mikrospitze. Die Zelllysate wurden bei 25.000 g für 10 min und bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Röhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

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

### 3.6.3 Zellfraktionierung

Zur Fraktionierung von HeLa-Zellen in Zytoplasma- und Kernfraktion wurden diese zunächst transient transfiziert. Nach 24 h wurden pro Ansatz ca.  $2 \times 10^7$  Zellen (2 Zellkulturschalen, Durchmesser 10 cm) mit einem Zellschaber geerntet, bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, in 1 ml PBS gewaschen und in 200  $\mu$ l Puffer A resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden dem Lysat 1,25  $\mu$ l IGEPAL zugegeben und dieses zur weiteren Lyse für 5 min bei 4 °C auf einem Vortexer geschüttelt. Das Lysat wurde bei 15.000 U/min für 10 min und bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand enthält die Zytoplasmafraktion. Das Zellsediment wurde vorsichtig mit 1,5 ml Puffer A unter Schütteln bei 4 °C für 5 min gewaschen und bei 13.000 U/min für 2 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt. Dem Zellsediment wurden 50  $\mu$ l Puffer B zugegeben und das Gemisch für 30 min bei 4 °C geschüttelt. Durch eine Zentrifugation bei 15.000 U/min für 10 min bei 4 °C wurden Membranbestandteile abgetrennt. Der Überstand enthält die Kernfraktion. Kern- und Zytoplasmafraktion wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Der Nachweis von Tubulin  $\alpha$ , das im Zytoplasma lokalisiert ist und von PARP, das im Kern lokalisiert ist, diente zur Bestimmung der Sauberkeit der Proteinfractionen.

**Puffer A:** 10 mM Hepes pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 x  
Proteinaseinhibitor;

**Puffer B:** 20 mM Hepes pH 7,9; 400 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 x  
Proteinaseinhibitor;

### 3.6.4 Koimmunpräzitationen

#### 3.6.4.1 *Koimmunpräzitation nach Transfektion von HEK293-Zellen*

Zum Nachweis der Interaktion von Fusionsproteinen wurden diese in HEK293-Zellen transient exprimiert. Um eine unspezifische Bindung des potentiellen Interaktionspartners an die *Beads* kontrollieren zu können, wurde ein Ansatz in dem kein zu präzipitierendes Protein exprimiert wurde, mitgeführt.

Pro Präzipitationsansatz wurde eine 10 cm-Schale HEK293-Zellen 24-48 h nach Transfektion mit einem Zellschaber geerntet, in 1 ml PBS gewaschen und in 1 ml IGEPAL-Lysepuffer (mit 1 x Proteinaseinhibitor) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Lysate 3 x mit je 10 Impulsen bei einer Amplitude von 10 % und unter Verwendung einer 3 mm konischen Mikrospritze sonifiziert und anschließend für 10 min bei 21.000 g und 4 °C zentrifugiert. Vom Lysat wurden 100 µl abgenommen, nach der Konzentrationsbestimmung mit Laemmlipuffer gemischt und bei -20 °C aufbewahrt. Das restliche Lysat wurde in zwei Teile geteilt und für Immunpräzitation und Koimmunpräzitation mit je 100 µl Antikörperüberstand gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 30 µl einer 50%igen ProteinG-Sepharose-*Bead*-Suspension zugegeben, welche vorher 2 x mit IGEPAL-Puffer gewaschen worden war. Die Inkubation erfolgte über Nacht unter Rollen bei 4 °C. Anschließend wurden die *Beads* 3 x mit eiskaltem IGEPAL-Puffer unter Rollen bei 4 °C gewaschen und zum Schluss in 30 µl 2 x Laemmlipuffer aufgenommen. Zum Nachweis der Proteine wurden 30-50 µg des Lysats und 12 µl der Präzipitate auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen.

**IGEPAL-Lysepuffer:** 1 % IGEPAL; 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 x Complete Proteinase Inhibitor;

#### 3.6.4.2 *Koimmunpräzitation nach endogener Proteinexpression*

Der Nachweis der Interaktion der endogen exprimierten Proteine vIRF4 und CBF1 erfolgte in BCBL-1-Zellen. Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^7$  Zellen geerntet, in 1 ml PBS gewaschen und in 1 ml IGEPAL-Lysepuffer resuspendiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 3.6.4.1 beschrieben.

### 3.6.5 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Um den Proteingehalt der Lysate zu bestimmen, wurde eine Bradford-Lösung eingesetzt. Hierfür wurde zunächst eine Eichkurve erstellt. Für diese wurde die Bradford-Lösung 1:5 verdünnt, jeweils 1 ml davon mit je 1 bis 7 µg BSA gemischt und die Absorption der Lösung

im Spektralphotometer bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen. Die Bradford-Lösung enthält *Coomassie Brilliant Blue*. Durch Ausbildung von Proteinkomplexen wird das Absorptionsmaximum dieser sauren Lösung von 495 nm nach 595 nm verschoben. Als Nächstes wurde die Absorption von 0,5 bis 1 µl Zellysate in Bradford-Lösung gemessen und die Proteinkonzentration anhand der erstellten Eichkurve ermittelt.

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

### 3.6.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. SDS ist ein denaturierendes anionisches Detergenz, das an Proteine proportional zu deren Molekulargewicht bindet. Es verfügt über eine negative Partialladung und überdeckt so durch seine Bindung die Eigenladung der Proteine. Dies ermöglicht einen gerichteten Lauf der Proteine im elektrischen Feld. Das SDS-Gel ist unterteilt in ein Sammelgel, in dem die Proben konzentriert werden und in ein Trenngel, in dem die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgt. Für Proteine zwischen 40 und 120 kDa wurde ein 8%iges Trenngel aus einer 30 % (w/v) Acrylamidlösung nach Sambrook et al., 1989 gegossen. Der entsprechenden Menge Proteinextrakt (5-50 µg, je nach Protein und Fragestellung) wurde 2 x bzw. 5 x Laemmli-Puffer zugegeben. Dieser enthält β-Mercaptoethanol, wodurch Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten werden sowie hohe Konzentrationen an SDS, was bei einem Aufkochen der Proben für 5 min bei 95 °C zu einem Aufbruch der Sekundär- und Tertiärstrukturen führt. Die Proben wurden neben einem Molekulargewichtsstandard auf das Gel geladen und bei 25 mA pro Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

**Elektrophoresepuffer:** 25 mM Tris Base; 200 mM Glycin; 0,1 % SDS;

**2 x Laemmli-Puffer:** 4 % SDS; 20 % Glycerin; 120 mM Tris/HCL pH 6,8;  
5 % β-Mercaptoethanol; Spatelspitze Bromphenolblau;

**5 x Laemmli-Puffer:** 10 % SDS; 50 % Glycerin; 300 mM Tris/HCL pH 6,8;  
12,5 % β-Mercaptoethanol; Spatelspitze Bromphenolblau;

### 3.6.7 Coomassie-Färbung zur Detektion von Proteinen im SDS-Gel

Zur Detektion von Proteinen im SDS-Gel wurde dieses im Anschluss an die SDS-PAGE für 15-30 min in Coomassie-Lösung geschwenkt. Nachdem sich das Gel stark blau färbte, wurde die Coomassie-Lösung entfernt und das Gel im Coomassie-Fix solange entfärbt, bis das Gel wieder farblos war und nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren.

**Coomassie-Lösung:** 50 % Methanol; 10 % Essigsäure; 0,275 % Coomassie Brilliant Blue R250;

**Coomassie-Fix:** 50 % Methanol; 10 % Essigsäure;

### 3.6.8 Westernblot

Für den immunbiochemischen Nachweis der Proteine, wurden diese nach der Auftrennung durch SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde zunächst in 100 % Methanol aktiviert und anschließend mit dem Trenngel der SDS-PAGE, 3MM-Papieren und den Schwämmen der Westernblot Apparatur in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden auf der Kathodenseite beginnend 2 Lagen Schwämme, 2 Lagen des 3MM-Papiers, das Gel, die PVDF-Membran und wiederum 2 Lagen 3MM-Papier und 2 Lagen Schwämme aufeinandergelegt. Dadurch wurden die negativ geladenen Proteine auf die dem Pluspol zugewandte Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran durch Inkubation in Blockpuffer für 30 min abgesättigt. Dann wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem in Blockpuffer entsprechend verdünnten primären Antikörper inkubiert. Nach mehrfachem Waschen der Membran mit PBS/Tween folgte die Inkubation mit dem in Blockpuffer entsprechend verdünnten, an HRP gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h. Danach wurde die Membran erneut mehrfach mit PBS/Tween und einmalig mit PBS gewaschen. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit dem *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)<sup>TM</sup> Reaktionssystem nach Angaben des Herstellers. Das darin enthaltene Luminol reagiert mit Wasserstoffperoxid zu seiner oxidierten Form unter Freisetzung von Stickstoff und Licht. Diese auf Chemilumineszenz basierende Reaktion wurde durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert. Die Proteine wurden durch Exposition eines Hyperfilm ECL<sup>TM</sup> detektiert. Die Expositionsdauer des Films variierte je nach Signalstärke.

**Transferpuffer:** 25 mM Tris Base; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol;  
**Blockpuffer:** 5 % Milchpulver; 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl;  
**PBS/Tween:** 0,05 % Tween 20 in PBS;

### 3.6.9 Quantifizierung von Proteinmengen mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems „FusionFX7“ von Peqlab

Um Proteine nach Auftrennung eines Proteingemischs in der SDS-PAGE quantifizieren zu können erfolgte zunächst ein Westernblot. Der Nachweis des gebundenen sekundären Antikörpers erfolgte auch hier mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems. Die Detektion des durch die HRP-vermittelte Oxidation von Luminol freigesetztem Licht erfolgte hier jedoch nicht mit einem Chemilumineszenz-sensitiven Film, sondern mittels des „FusionFX7“-Geräts der Firma Peqlab. Das Gerät ermöglicht die direkte Messung der in der Reaktion freigesetzten Photonen. Die Signalintensitäten werden von dem Gerät als „Fläche“ (Fläche der Proteinbanden), „Höhe“ (Amplitude des Signals) und „Volumen“ (Signal über einer

vorgegebenen Fläche) wiedergegeben. Die Signalintensitäten dieser Arbeit wurden als „Volumen“ angegeben.

### 3.6.10 Radioaktive *in vitro* Translation

Für die radioaktive *in vitro* Translation des CBF1-Proteins wurde das „TNT<sup>®</sup> T7 Coupled Reticulocyte Lysate System“ von Promega, nach Angaben des Herstellers, verwendet. Während der Reaktion erfolgte gleichzeitig die radioaktive Markierung des Proteins mit [<sup>35</sup>S]-Methionin. Pro Ansatz wurden 10 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 50 µl eingesetzt.

Um die Expression des CBF1-Proteins zu überprüfen, wurden 5 µl des Reaktionsansatzes mit 5 µl 2 x Laemmlipuffer gemischt, auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Trocknen des Gels konnte das radioaktiv markierte Protein mit einem Röntgenfilm detektiert werden.

### 3.6.11 Radioaktive Detektion eines Peptidblots

Um die Bindung synthetischer Peptide, aufgespottet auf eine Cellulosemembran, an ein spezifisches Protein zu detektieren, wurde die Membran zunächst mit einigen Tropfen Ethanol benetzt und anschließend 3 x für 10 min mit 40 ml TBS gewaschen. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4° C in 40 ml Blockpuffer mit 0,2 % Azid inkubiert. Nach einmaligem Waschen für 10 min mit 50 ml TBST, wurden unspezifische Bindestellen durch die Inkubation der Membran mit 100 mM Cystein in 20 ml Blockpuffer für 30 min abgesättigt. Daraufhin wurde die Membran 3 h bei RT in Blockpuffer mit 50 µl des zu untersuchenden radioaktiv *in vitro* translatierten Proteins inkubiert. Die Membran wurde erneut zweimal mit 50 ml TBST gewaschen, anschließend luftdicht in Frischhaltefolie verpackt und die Signale mit einem Röntgenfilm bei -80 °C für mindestens 24 h detektiert.

**TBS:** 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,0;

**TBST:** 0,05 % Tween 20 in TBS;

**Blockpuffer:** 2,5 % Milchpulver; 5 M NaCl; 1 M Tris/HCl pH 6,8; 0,05 % Tween;

## 3.7 Konfokalmikroskopie

### 3.7.1 Immunfluoreszenzfärbung

In dieser Arbeit sollte die subzelluläre Lokalisation von vIRF4 nach Transfektion von HeLa-Zellen mit dem konventionellen Verfahren der Immunfluoreszenzfärbung visualisiert werden.



Dazu wurden sterile Deckgläschen in 6-Loch Platten überführt, mit PBS benetzt und  $3 \times 10^5$  HeLa-Zellen pro Loch ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit Hilfe des „FuGENE Transfektionsreagenz“ (Roche). Nach Expression des vIRF4-Proteins für 24 h, wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 10 min mit einer 2%igen PFA-Lösung fixiert. Danach wurden die Zellen 3 x mit einer Triton-Lösung permeabilisiert und 3 x für je 10 min mit einer Block-Lösung blockiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-vIRF-1B6 bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Nach sequentiellen Waschschritten für je 5 min auf einem Schwenkgerät mit PBS, Triton-Lösung, PBS und Block-Lösung, wurden die Zellen mit dem sekundären Cy3-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper für 45 min in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurden die Zellen unter Schwenken 3 x mit PBS gewaschen und für 90 sec mit DAPI (DNA-Färbung) gefärbt. Die Deckgläschen wurden zusammen mit *Mounting* Medium invers auf Objektträger überführt und mit Nagellack versiegelt. Bis zur Analyse im Konfokalmikroskop wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Eine Lagerung ist maximal für zwei bis drei Monate möglich.

**PFA-Lösung:** 2 % PFA in PBS;

**Triton-Lösung:** 0,15 % Triton X-100 in PBS;

**Block-Lösung:** 1 % BSA; 0,15 % Glycin in PBS;

### 3.7.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen in dieser Arbeit wurden an einem Leica TCS SP2 Konfokal-System mit einem Ölimmersionsobjektiv (HCX PI APO ldb. Blue 63 x 1.4) durchgeführt. Dabei wurden die Laser 405 nm (Dioden-Laser) und 543 (Helium-Neon-Laser) verwendet. Das Fluorochrom Cy3 absorbiert Licht einer Wellenlänge von 543 nm und hat ein Emissionsmaximum bei 570 nm. DAPI wurde mit Licht einer Wellenlänge von 405 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 430 nm. Für jedes Bild wurden 25 bis 30 Ebenen in einem Abstand von 0,25 µm aufgenommen.

### 3.7.3 Elektronische Bildbearbeitung

Für die Aufnahmen der Zellen und zur 2D-Bildprozessierung wurde die Leica Konfokal Software verwendet. Die Auswertung und Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm *Image J*.

## 3.8 Bioinformatische Methoden

### 3.8.1 Clusteranalyse

Mit Hilfe des Programms Genesis (<http://genome.tugraz.at>) (Sturn et al., 2002) konnte ein *unsupervised hierarchical clustering* von experimentellen Gruppen und *Probesets* anhand der Expressionswerte durchgeführt werden. Hierfür wurden zunächst die Expressionswerte der Arrays als Text-Datei formatiert, so in Genesis übertragen und für jedes *Probeset* auf einer Skala von -2 bis +2 normalisiert. Bei dieser Standardisierung wurde für jedes *Probeset* der Mittelwert der Expressionswerte berechnet, dieser von den einzelnen Expressionswerten subtrahiert und das Ergebnis durch die Standardabweichung geteilt. Die normalisierten Expressionwerte werden zur graphischen Darstellung durch eine Farbskala repräsentiert. Dabei entsprechen hohe Expressionswerte (+2) der Farbe Rot, mittlere (0) der Farbe Schwarz und niedrige (-2) der Farbe Grün. Unter Verwendung der Pearson Korrelation als Abstandsmaß und des *complete linkage* Algorithmus konnten die Daten schließlich in zwei Dimensionen (d.h. gleichzeitiges Clustern der experimentellen Gruppen und *Probesets*) bzw. in einer Dimension (in dieser Arbeit, Clustern der *Probesets*) geclustert werden.

### 3.8.2 Bioinformatische Promotoranalyse

Für eine *in silico* Analyse potentieller CBF1-Bindestellen in DNA-Sequenzen wurde die Software der Firma Genomatix (<http://www.genomatix.de>) verwendet. Um die Promotoren der bestätigten vIRF4-Zielgene EGR1, FAS, JUN, MAML2, PDCD4 und RGS1 auf CBF1-Bindestellen hin zu untersuchen wurde der Sequenzbereich von 1000 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts sowie stromabwärts im ersten Intron bzw. für JUN im Exon, aus Ensembl (<http://www.ensembl.org>) extrahiert und in die Software *MatInspector* geladen. Die Sequenz wurde nach Treffern für die Matrixfamilie V\$RBPF, welche aus den Matrizen V\$RBPJK.01 und V\$RBPJK.02 besteht, untersucht und die Qualität der identifizierten CBF1-Bindestellen anhand der *Matrix similarity* bewertet. Der *re-value* (*random expectation*), der die Trefferwahrscheinlichkeit für diese Matrix pro 1000 bp angibt, liegt bei 0,66.

## 4 Ergebnisse

Im Mittelpunkt der Untersuchungen der Arbeitsgruppe Kempkes steht die Analyse der transkriptionellen Modulation des CBF1/Notch-Signalweges durch virale Faktoren des Epstein-Barr Virus. EBV gehört wie auch KSHV zu den  $\gamma$ -Herpesviren. CBF1 ist als DNA-bindender Faktor das zentrale Effektormolekül des Notch-Signalweges und vermittelt über die Interaktion mit Notch dessen Zielgenregulation. Proteine des EBV und KSHV interagieren mit CBF1 und greifen auf unterschiedliche Art in den Notch-Signalweg ein. Vorarbeiten lieferten Hinweise, dass das KSHV-Protein vIRF4 als Repressor fungiert und führten zu der Frage, ob sich vIRF4 die Interaktion mit CBF1 zu Nutze macht, um mit demselben Mechanismus wie Notch Zielgene zu regulieren.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, zunächst die vIRF4/CBF1-Interaktion näher zu charakterisieren und im Anschluss zelluläre Zielgene von vIRF4 zu identifizieren. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit die transkriptionelle Regulation CBF1-abhängig verläuft.

### A) Charakterisierung der vIRF4/CBF1-Interaktion

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der weiteren Charakterisierung der vIRF4/CBF1-Interaktion. Ein wichtiger Punkt hierbei war die Kartierung der CBF1-Bindestelle im vIRF4-Protein. Zu wissen, welche exakte Region an der Bindung beteiligt ist, würde zum einen die direkte Komplexbildung von vIRF4 und CBF1 bekräftigen. Zum anderen würde der molekulare Mechanismus der Interaktion möglicherweise Hinweise zur Funktion von vIRF4 geben.

Nach Bestimmung der minimalen Binderegion von CBF1 an vIRF4 sollte die Herstellung einer vIRF4-Mutante folgen, die nicht mehr an CBF1 binden kann und dann für weitere Untersuchungen im zweiten Teil der Doktorarbeit zur Differenzierung CBF1-abhängiger und -unabhängiger Prozesse eingesetzt werden kann.

#### 4.1 Biochemische Bestätigung der Interaktion von endogen exprimiertem vIRF4 und CBF1 in humanen Zelllinien

Vor Beginn meiner Doktorarbeit waren Versuche zum immunbiochemischen Nachweis der Komplexbildung von vIRF4 und CBF1 stets nach transienter Transfektion von Zellen mit vIRF4 und CBF1 durchgeführt worden. Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollte deshalb die Interaktion von endogen exprimiertem vIRF4 und CBF1 nachgewiesen werden.

Es existieren zwei humane Zelllinien, BCBL-1 und BC-1, in welchen vIRF4 nach Induktion des lytischen Zyklus exprimiert wird. Beide Linien wurden ursprünglich aus dem Tumor eines PEL-positiven Patienten isoliert und sind latent mit KSHV infiziert. Die Linie BC-1 enthält darüber hinaus noch in latenter Form das EBV Genom. Durch chemische Substanzen wie Natriumbutyrat und 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat kann der lytische Zyklus in Zellkulturlinien gezielt induziert werden.

#### 4.1.1 Herstellung eines vIRF4-spezifischen Antikörpers

Alle meiner Arbeit vorhergehenden Versuche zu vIRF4 wurden nach Transfektion eines vIRF4-Fusionsgens gemacht, welches neben vIRF4 auch für ein Epitop eines weiteren Proteins, wie beispielsweise des Hämagglutinin (HA)-Proteins kodiert. Nach Expression des Fusionsproteins war es möglich, das *getagte* vIRF4-Protein über das Epitop im Westernblot zu detektieren. Zur Darstellung von endogen exprimiertem vIRF4 wurde ein spezifischer vIRF4-Antikörper benötigt. Bis zu meiner Doktorarbeit existierte kein vIRF4-Antikörper im Labor. Deshalb war der erste Schritt zunächst, von mir in Zusammenarbeit mit Elisabeth Kremmer einen Antikörper gegen vIRF4 herzustellen und im Labor zu etablieren (Daten nicht gezeigt). Hierfür wurde der N-terminale Bereich von vIRF4 von Aminosäure 1-313 fusioniert an GST in Bakterien exprimiert und mittels Glutathion Sepharose Affinitätschromatographie aufgereinigt. In der Gruppe von Elisabeth Kremmer wurde das GST-vIRF4-Fusionsprotein dann als Antigen zur Immunisierung von Ratten und zur Produktion von monoklonalen Antikörpern in Hybridomzellen (Methode siehe Kremmer et al., 1995) eingesetzt. Die erhaltenen Antikörperüberstände wurden dann von mir in Immunpräzipitationen und im Westernblot auf ihre vIRF4-Spezifität getestet. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit kamen zwei vIRF4-Antikörper zum Einsatz: vIRF-8F8 in Immunpräzipitationen und zur Detektion im Westernblot und vIRF-1B6 in der Konfokalmikroskopie.

#### 4.1.2 Kinetik der vIRF4-Expression in den Zelllinien BCBL-1 und BC-1

Bevor weitere Arbeiten mit diesen Zellen durchgeführt werden konnten, war es zunächst nötig, das Expressionsniveau von vIRF4 in beiden Zelllinien zu definieren.

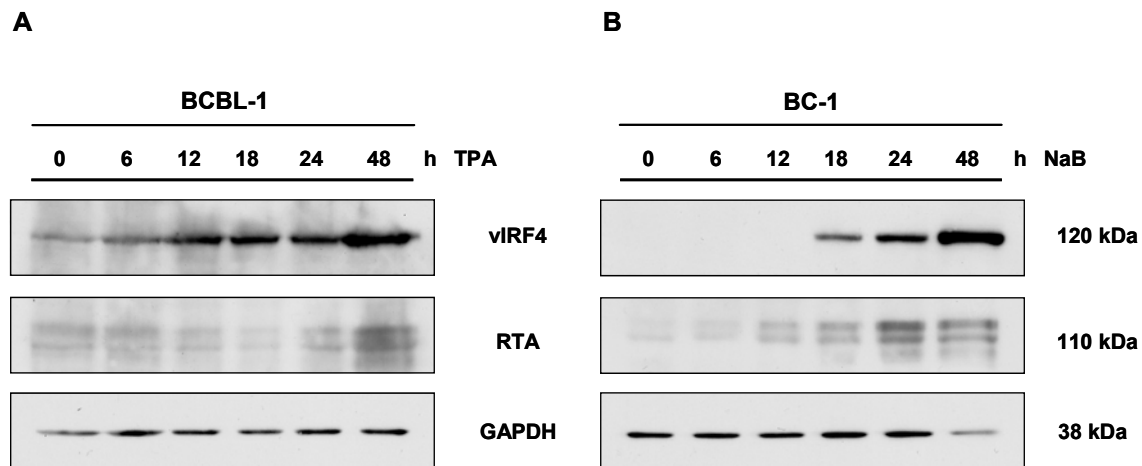
In folgendem Versuch wurde deshalb in einer Zeitreihe von 48 h die Expression von vIRF4 immunbiochemisch erfasst. Dafür wurde die Linie BCBL-1 mit 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) und die Linie BC-1 mit Natriumbutyrat (NaB) behandelt, was in beiden Linien zu einer Reaktivierung des lytischen Zyklus führt. Jeweils zum Zeitpunkt 0, 6, 12, 18, 24 und 48 h nach Reaktivierung wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte hergestellt. In einem anschließenden Westernblot konnte vIRF4 dann mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden.

Als Positivkontrolle für die Reaktivierung der lytischen Phase wurde für die Zeitreihe auch die Expression von RTA mittels immunbiochemischer Detektion überprüft. Dieser spezifische RTA-Antikörper wurde von meiner Kollegin Barbara Scholz in ihrer Doktorarbeit und ebenfalls in Zusammenarbeit mit Elisabeth Kremmer hergestellt. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei RTA um ein sehr frühes lytisches Gen und eignet sich deshalb gut als Expressionsmarker der lytischen Phase.

Das Ergebnis der Zeitreihe ist in Abb. 4.1 dargestellt. Für die Linie BCBL-1 (A) kann vIRF4 schon zum Zeitpunkt 0, bereits vor Induktion des lytischen Zyklus, detektiert werden. Die vIRF4-Expression nimmt in der lytischen Phase über die Zeit hinweg kontinuierlich zu und zeigt nach 48 h die stärkste Expression. Auch die RTA-Expression ist bereits im latenten Zustand (Zeitpunkt 0) nachzuweisen. Die stärkste RTA-Expression in dieser Zeitreihe wird ebenfalls nach 48 h detektiert. Die Linie BC-1 (B) zeigt ein geringfügig anderes Bild. Hier kann vIRF4 erst nach 18 h detektiert werden, wobei auch diese Expression dann über die weitere Zeit zunimmt und ebenfalls nach 48 h am stärksten ist. Für RTA zeigt sich nach 6 h eine kaum wahrnehmbare Bande, die dann nach 12 h deutlich und somit früher als vIRF4, detektierbar ist. Ein weiterer Anstieg ist bis 24 h zu erkennen. Nach 48 h scheint die RTA-Expression geringer als nach 24 h zu sein. Allerdings zeigt sich auch für die Ladekontrolle GAPDH nach 48 h eine schwächere Bande. Daher ist zu vermuten, dass für 24 h und 48 h aufgrund von Pipettierungenauigkeit keine äquivalenten Proteinmengen geladen wurden und die RTA-Expression vermutlich höher liegen würde.

Beide Linien zeigen innerhalb von 48 h eine kontinuierlich zunehmende Expression von vIRF4. Ein Unterschied beider Linien zeigt sich jedoch im latenten Zustand der Zellen. Hier können in der Linie BCBL-1 die lytischen Proteine RTA und vIRF4 bereits nachgewiesen werden. Für die Linie BC-1 ist das jedoch nicht der Fall.

Für die Zelllinie BCBL-1 ist in der Literatur beschrieben, dass es in 2-10 % der Zellen innerhalb einer Zellkulturpopulation auch ohne chemischen Stimulus zu einer spontanen lytischen Reaktivierung kommen kann. Damit lässt sich die in meinem Experiment schwache vIRF4- und RTA-Expression im latenten Zustand erklären und auf spontan lytische Zellen zurückführen.



**Abb. 4.1: Expression von vIRF4 in den Zelllinien BCBL-1 und BC-1.**

In (A) wurde die vIRF4-Expression in der Zelllinie BCBL-1 untersucht. Dafür wurde der lytische Zyklus mit 20 ng/ml TPA induziert. Zum Nachweis von vIRF4 in der Zelllinie BC-1 (B) wurde der lytische Zyklus mit 3 mM NaB induziert. Für die Analyse wurden 50 µg Gesamtproteinextrakt auf ein 8%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und vIRF4 im Westernblot mit dem monoklonalen Antikörper vIRF-8F8 detektiert. Gleichzeitig erfolgte, als Kontrolle für die Aktivierung des lytischen Zyklus von KSHV, die Detektion von RTA mit dem Antikörper RTA-7A11. GAPDH wurde als Ladekontrolle für äquivalente Proteinmengen detektiert.

#### 4.1.3 Komplexbildung von endogen exprimiertem vIRF4 und CBF1 in BCBL-1-Zellen

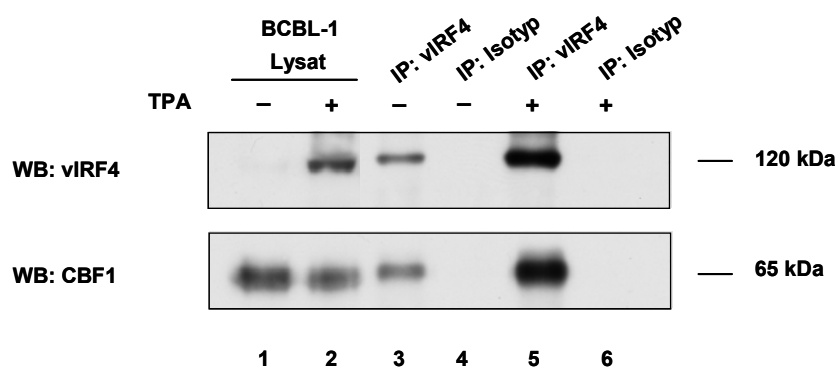
In dem vorherigen Versuch wurde das Expressionsniveau von vIRF4 in der lytischen Phase und in einem Zeitraum von 48 h immunbiochemisch dargestellt. Dabei war innerhalb der gewählten Zeitreihe die stärkste Expression nach 48 h zu beobachten.

Im nächsten Experiment sollte nun untersucht werden, ob die Komplexbildung von endogen exprimiertem vIRF4 und CBF1 nachgewiesen werden kann. Dazu wurden Koimmunpräzipitationen mit Proteinextrakten der KSHV-positiven Zellen BCBL-1 durchgeführt. Nach Behandlung der Zellen mit TPA für 48 h wurden diese geerntet, lysiert und zusammen mit Proteinextrakten von nicht induzierten Zellen, einer Immunpräzipitation mit einem vIRF4-spezifischen Antikörper unterzogen. Zum Nachweis der Komplexbildung von vIRF4 und CBF1 wurden im Anschluss die Proteine und Proteinkomplexe im Westernblot analysiert.

Wie Abb. 4.2 zeigt, wurde vIRF4 nach Induktion des lytischen Zyklus exprimiert und kann im Gesamtzelllysat nachgewiesen werden (obere Reihe, Spur 2). Darüber hinaus konnte vIRF4 auch in der lytischen Phase immunpräzipitiert werden (obere Reihe, Spur 5). Obwohl vIRF4 hier im Unterschied zu Abb. 4.1 nicht im Gesamtzelllysat der latenten Phase detektiert werden konnte, ließ es sich aber, wenn auch schwächer als in der lytischen Phase, immunpräzipitieren (obere Reihe, Spur 3). An dieser Stelle muss erneut darauf aufmerksam gemacht werden, dass in der Zelllinie BCBL-1 eine Subpopulation spontan lytischer Zellen existiert. Dadurch werden in einem geringen Prozentsatz an Zellen lytische Proteine

exprimiert. Bei der Immunpräzipitation kommt es zu einer Anreicherung des vIRF4-Proteins, welches dann im Westernblot detektiert werden kann. Für einen Nachweis im Gesamtzelllysate ist die vIRF4-Konzentration jedoch zu gering.

Die Komplexbildung von vIRF4 und CBF1 konnte durch Koimmunpräzipitation bestätigt werden. So ist die Expression von CBF1 sowohl im Lysat der latenten und lytischen Phase (untere Reihe, Spur 1 und 2), als auch in der Immunpräzipitation von vIRF4 (untere Reihe, Spur 3 und 5) im Westernblot darstellbar. Die Immunpräzipitation mit einer Isotypkontrolle fiel negativ aus und es konnte weder vIRF4 immunpräzipitiert, noch CBF1 koimmunpräzipitiert werden (untere Reihe, Spur 4 und 6). Das bedeutet, dass keine Kreuzreaktivität des vIRF4-Antikörpers vorliegt und die Koimmunpräzipitation von CBF1 vIRF4-abhängig ist.



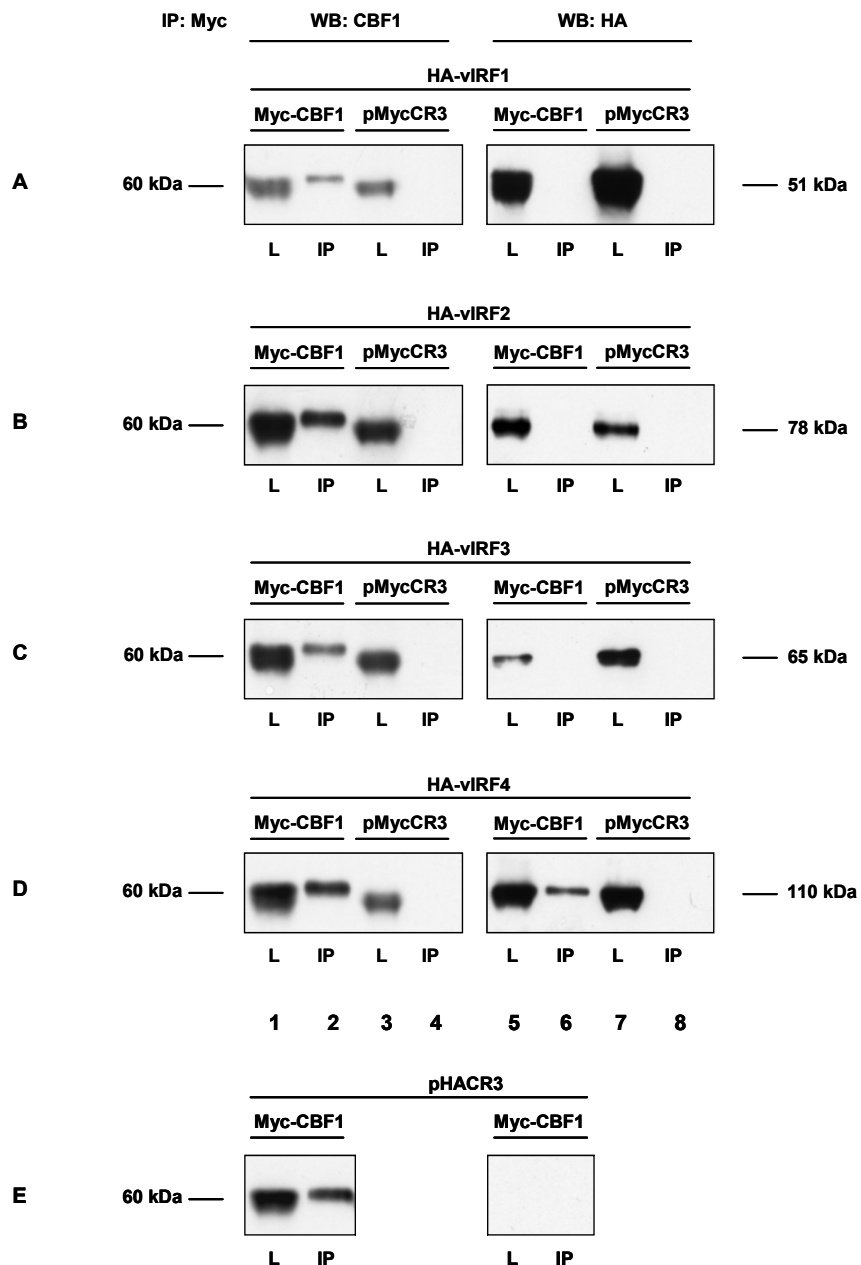
**Abb. 4.2: Die Komplexbildung von vIRF4 und CBF1 ist auch nach endogener Expression der Proteine nachweisbar.**

In  $2 \times 10^7$  Zellen der Linie BCBL-1 wurde mit 20 ng/ml TPA der lytische Zyklus induziert. Nach 48 h wurde mit den induzierten und mit nicht-induzierten Zellen eine Koimmunpräzipitation mit dem monoklonalen vIRF4-Antikörper (vIRF-8F8) bzw. einer vIRF4-Isotypkontrolle durchgeführt. Die Immunpräzipitate (IP) und die Gesamtzelllysate (L) wurden in einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Westernblot mit dem vIRF4-Antikörper (vIRF-8F8) und dem CBF1-Antikörper (RBP-7A11) detektiert. Die Proteinmenge des Lysats entspricht 2 % der IP (Immunpräzipitations)-Probe.

#### 4.1.4 Spezifische Interaktion von vIRF4 mit CBF1

Die Komplexbildung von vIRF4 und CBF1 konnte in verschiedenen zellulären Systemen, wie dem indirekten Nachweis im Hefe-*Two-Hybrid*-System, aber auch durch die immunbiochemische Darstellung des Komplexes in Säugerzellen, bestätigt werden. Es stellte sich nun die Frage, ob die Interaktion mit CBF1 etwas vIRF4-Spezifisches ist oder ob auch die anderen vIRFs in der Lage sind mit CBF1 zu interagieren. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Koimmunpräzipitationen der transient exprimierten Fusionsproteine durchgeführt. Die hierfür verwendeten Expressionsplasmide enthalten Sequenzen, die für ein Epitop des Myc- bzw. Hämagglutinin (HA)-Proteins kodieren. Diese sogenannten tags sind an die Leserahmen der Fusionspartner fusioniert und können nach Expression der

Fusionsproteine im Westernblot immunbiochemisch detektiert werden. In HEK293-Zellen wurden die Fusionsproteine HA-vIRF1, HA-vIRF2, HA-vIRF3 und HA-vIRF4 mit Myc-CBF1 koexprimiert, einer Myc-spezifischen Immunpräzipitation unterzogen und im Anschluss die Proteine und Proteinkomplexe im Westernblot analysiert. Als Negativkontrolle wurden HEK293-Zellen mit den Leervektoren pHACR3 und pMycCR3 transfiziert. Abb. 4.3 zeigt das Ergebnis der Analyse.



**Abb. 4.3: Das vIRF4-Protein interagiert spezifisch mit CBF1.**

Je 5 µg der Expressionsplasmide HA-vIRF1, -vIRF2, -vIRF3 und -vIRF4 wurden zusammen mit 5 µg des Expressionsplasmids Myc-CBF1 in 70 % konfluente HEK293-Zellen kotransfiziert und exprimiert. Die entsprechenden Leervektoren, mit tag aber ohne Fusionspartner, heißen pHACR3 und pMycCR3. Die Komplexbildung jedes HA-vIRFs mit CBF1 wurde durch Koimmunpräzipitation mit einem Myc-spezifischen



Antikörper und anschließender Detektion der Proteine im Westernblot mit den Antikörpern CBF1 (RBP-7A11) und HA untersucht. Die Auftrennung der Proteine und der Proteinkomplexe erfolgte auf einem 8%igen Polyacrylamidgel. Die Proteinmenge des Lysats (L) entspricht 2 % der IP-Probe.

Die Expression von Myc-CBF1 konnte in jedem Gesamtzelllysat und in jeder Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Spur 1 und 2, Reihe A bis E). Es konnte zusätzlich eine CBF1-Bande im Lysat nach Expression des CBF1-Leervektors pMycCR3 detektiert werden (Spur 3, Reihe A-D). Der Grund hierfür ist, dass CBF1 in HEK293-Zellen konstitutiv exprimiert wird und so im Westernblot die endogene CBF1-Expression zu sehen ist. Die IP hingegen richtete sich gegen Myc, weshalb endogenes CBF1 auch nicht immunpräzipitiert werden konnte (Spur 4, Reihe A-D). Des Weiteren ließen sich im Lysat alle HA-vIRFs nachweisen (Spur 5 und 7, Reihe A bis D). Eine Koimmunpräzipitation war aber nur für vIRF4 möglich (Spur 6, Reihe D). Ohne CBF1 als Bindungspartner ist HA-vIRF4 jedoch in der Immunpräzipitation von Myc-CR3 nicht nachweisbar (Spur 8, Reihe D). Somit handelt es sich bei der Komplexbildung von vIRF4 und CBF1 um eine spezifische Eigenschaft von vIRF4, zu welcher weder vIRF1, noch vIRF2 oder vIRF3 in der Lage sind.

## 4.2 Kartierung der mit CBF1 interagierenden Region im vIRF4 Protein

Für eine weitere Charakterisierung der vIRF4/CBF1-Interaktion sollte die minimale CBF1-Bindestelle im vIRF4-Protein kartiert werden. Dies würde zum einen die Komplexbildung von vIRF4 und CBF1 bekräftigen, und zum anderen könnte die genaue Bindestelle in ihrer Sequenz bei einem Vergleich mit anderen CBF1-Interaktionspartnern, wie Notch oder EBNA2, Hinweise zur Funktion von vIRF4 und einer möglichen Modulation des Notch-Signalweges liefern. Darüber hinaus sollte für den zweiten Teil dieser Arbeit eine vIRF4-Mutante generiert werden, die nicht mehr mit CBF1 interagieren kann. Um eine solche Mutante herstellen zu können war es zunächst notwendig, die minimale CBF1-Bindestelle im vIRF4-Protein zu definieren.

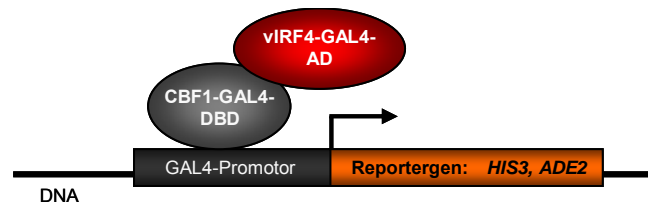
Die Kartierung erfolgte parallel in zwei experimentellen Ansätzen: Bindungsstudien im Hefe-*Two-Hybrid*-System und einer Peptidblot-Hybridisierungs-Analyse.

## 4.2.1 Bindungsstudien im Hefe-*Two-Hybrid*-System

### 4.2.1.1 Das Hefe-*Two-Hybrid*-System

Das Prinzip des *Two-Hybrid* Systems beruht auf der Aktivierung von Reporter genen nach Bindung eines Transkriptionsfaktors an deren Promotor (siehe Abb. 4.4). Man nutzt dabei die Tatsache, dass Transkriptionsfaktoren modular aufgebaut sind und aus einer DNA-Bindedomäne (DBD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) bestehen, die unabhängig voneinander funktionell aktiv sind. Zu einer transkriptionellen Aktivierung der Reporter gene kommt es nur, wenn beide Domänen an den Promotor rekrutiert werden. Die Zusammenführung kann auch indirekt durch die Interaktion von Fremdproteinen erfolgen, die als Fusionsproteine von DBD und AD exprimiert werden. Das Experiment wurde hier in Hefe durchgeführt. Hefepromotoren bestehen aus einer TATA-Box und einer stromaufwärts gelegenen Aktivierungssequenz (UAS, engl.: *upstream activating sequence*). Die UAS wird von spezifischen Transkriptionsfaktoren wie dem GAL4-Protein erkannt. In diesem Versuch wurde CBF1 an die DBD und vIRF4 bzw. verschiedene Deletionsfragmente von vIRF4 an die AD des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Kommt es zwischen CBF1 und dem vIRF4-Fragment zu einer Interaktion, kann der Komplex an den Promotor binden und die Transkription der Reporter gene induzieren. Das hier verwendete MATCHMAKER GAL4 *Two-Hybrid* System 3 umfasst die Reporter gene *HIS3* und *ADE2*, welche unter der Kontrolle verschiedener GAL4-abhängiger Promotoren stehen. Eine Transkription der Reporter gene verleiht dem auxotrophen Hefestamm AH109 Adenin- bzw. Histidin-Prototrophie. Dadurch ist es möglich, die Aktivierung des *HIS3*- und des *ADE2*- Reporters durch ein Wachstum der Hefezellen auf Selektivmedien zu detektieren.

Es gibt jedoch auch Transkriptionsfaktoren, bei denen die GAL4-DBD für eine Aktivierung des *HIS3*-Reporters ausreicht. Die Hintergrundaktivität kann durch den Kompetitor 3'-amino-1,2,4-triazol (3-AT) gehemmt werden. 3-AT ist ein Hemmstoff des *HIS3*-Genprodukts Imidazolglycerol-phosphat-Dehydratase und limitiert die Histidinbiosynthese und das Wachstum der Zelle. In Gegenwart von 3-AT wachsen nur solche Hefezellen, in denen das *HIS3*-Genprodukt einen basalen Schwellenwert übersteigt. Je höher die 3-AT-Konzentration liegt, bei der noch ein Hefewachstum stattfindet, desto stärker ist die Aktivierung des *HIS3*-Reporters. Somit wird durch Replikaplattierung der Transformanden auf histidinfreie Selektivplatten unterschiedlicher 3-AT-Konzentration, eine semiquantitative Einschätzung der Interaktionsstärke ermöglicht.



**Abb. 4.4: Das Prinzip des Hefe-Two-Hybrid-Systems.**

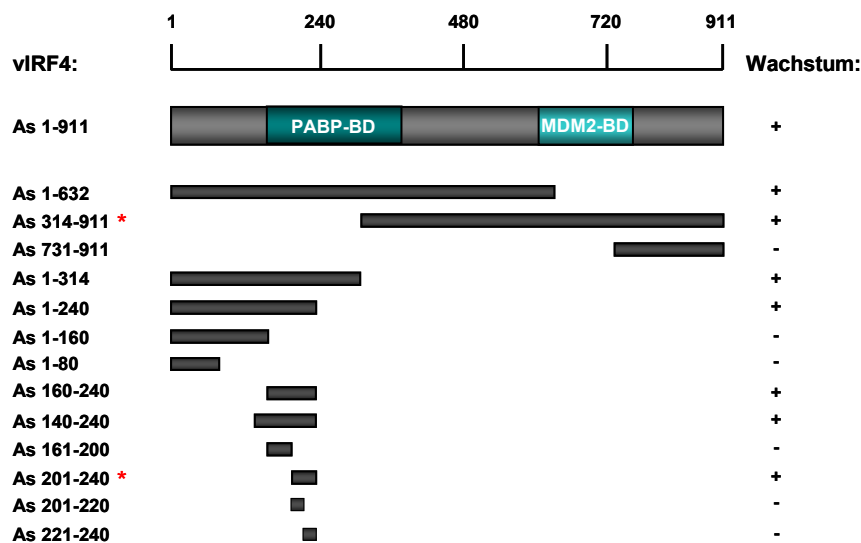
Schematisch dargestellt ist ein Konstrukt eines GAL4-abhängigen Promotors. Dem Promotor ist das Reportergen *HIS3* bzw. *ADE2* nachgeschaltet. Durch Interaktion der Fusionsproteine CBF1-GAL4-DBD und vIRF4-GAL4-AD und Bindung an den Promotor, wird die Transkription der Reportergene *HIS3* und *ADE2* aktiviert.

#### 4.2.1.2 Die Bindung an CBF1 erfolgt in vIRF4 im Aminosäurebereich 201-240

Für die Kartierung von vIRF4 wurde mittels PCR eine Serie von vIRF4-Deletionsfragmenten erstellt, die den N-terminalen, den C-terminalen und den internen Bereich des vIRF4-Proteins umfassen und zur Expression von GAL4-AD-Fusionsproteinen in den Vektor pGADT7 kloniert. Zur Expression von CBF1, fusioniert an die GAL4-DBD, wurde der Vektor pGBKT7 verwendet. Eine Übersicht der vIRF4-Deletionsfragmente zeigt Abb. 4.5. Das Volllängen-vIRF4-Protein, die vIRF4-Fragmente bzw. der Leervektor wurden zusammen mit CBF1 oder dessen Leervektor in Hefezellen des Stammes AH109 exprimiert und auf einer permissiven Platte ohne Leucin und ohne Tryptophan kultiviert. Zur Selektion wurden zwei Transformanten erneut auf einer permissiven Platte ausgestrichen und dann auf histidinfreien Platten mit steigender 3-Aminotriazol (3-AT)-Konzentration und auf adeninfreie Platten replikaplatziert. Ein Wachstum der Hefezellen auf diesen Selektivmedien bedeutet eine Aktivierung der Reportergene und ist somit ein indirekter Nachweis der Interaktion von CBF1 mit vIRF4 oder einem vIRF4-Fragment. Abb. 4.5 zeigt zusammenfassend das Ergebnis der Hefe-Two-Hybrid-Bindungsanalyse. Die Proteinfragmente sind nach dem Aminosäurebereich (As), den sie umfassen, benannt. Positive Interaktionen, d.h. Wachstum auf den Selektivplatten, wurden mit einem (+), keine Interaktion mit einem (-) versehen.

Die vIRF4-Fragmente mit Deletionen ausgehend vom C-Terminus zeigten bis einschließlich dem N-terminalen Fragment As 1-240 eine positive Interaktion. Bei einer weiteren Verkürzung auf As 1-160 blieb die Interaktion aus. Durch weitere Deletionsfragmente von As 160-240 konnte die interagierende Region auf As 201-240 eingengt werden. Zwei weitere Verkürzungen dieses Fragments, von As 201-220 und As 221-240 blieben jedoch ohne Ergebnis. Interessanterweise zeigte ein C-terminales Fragment, das vIRF4-Fragment As 314-911, auch eine positive Interaktion mit CBF1.

Mit Hilfe der Hefe-Two-Hybrid-Bindungsanalyse konnte als minimale Bindestelle ein Fragment im N-Terminus von As 201-240 identifiziert werden. Außerdem lieferte das Experiment Hinweise auf eine zweite Region im C-terminalen Bereich des Proteins.



**Abb. 4.5: Schematische Zusammenfassung aller verwendeten Deletionskonstrukte des vIRF4-Proteins im Hefe-*Two-Hybrid*-System.**

Es wurde eine Serie von vIRF4-Deletionskonstrukten hergestellt, die als GAL4-AD Fusionproteine zusammen mit CBF1, fusioniert an die GAL4-DBD, in dem Hefestamm AH109 koexprimiert wurden. Die Transformanten wurden auf Medium ohne Leucin und Tryptophan ausgestrichen und anschließend auf Selektionsplatten ohne Histidin (His), versetzt mit steigender 3-AT-Konzentration, oder ohne Adenin (Adn) replikaplattiert. Eine CBF1-Interaktion der vIRF4-Fragmente wurde positiv gedeutet (+), wenn die Hefen auf den adeninfreien Platten und bei mindestens 2,5 mM 3-AT der histidinfreien Platten wuchsen. \* markiert das kleinste mit CBF1 interagierende N-terminale vIRF4-Fragment, sowie das mit CBF1 interagierende C-terminale Fragment.

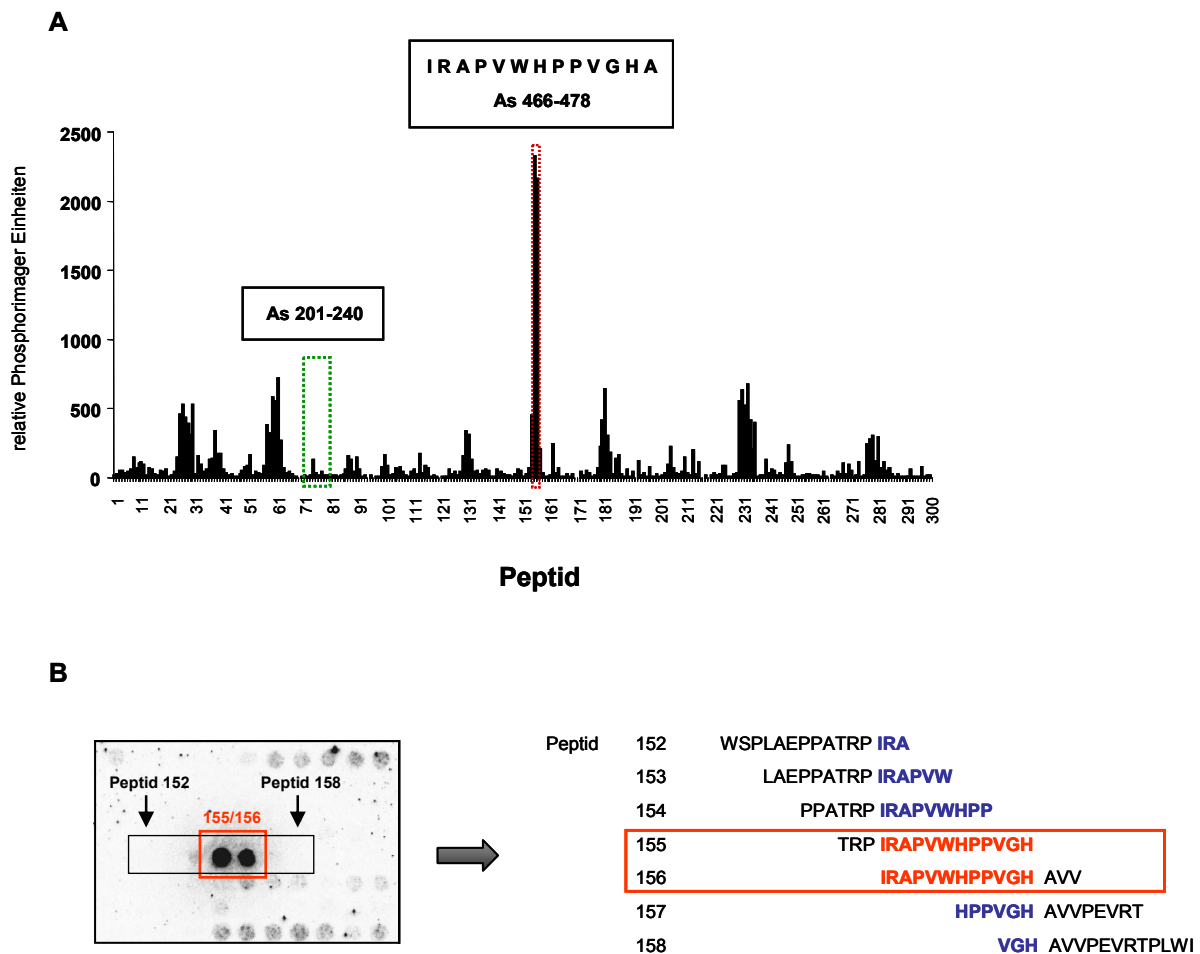
#### 4.2.2 Feinkartierung der CBF1 bindenden Region im vIRF4-Protein durch Peptidblot-Hybridisierung

Parallel zur Kartierung im Hefe-*Two-Hybrid*-System erfolgte eine Feinkartierung der CBF1-Bindestelle im vIRF4-Protein durch Peptidblot-Hybridisierung. Bei dieser Methode werden synthetisch hergestellte Peptide in Einheiten von 15 Aminosäuren auf eine Cellulosemembran aufgebracht. Dabei überlappen jeweils die letzten 12 Aminosäuren mit den ersten 12 des nächsten Peptids. Durch Inkubation des Peptidblots mit einem radioaktiv markierten Protein können so lineare Bindeepitope identifiziert werden.

Die Peptidblot-Hybridisierung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Ronald Frank. In diesem Experiment umfasste der Peptidblot mit 300 Peptiden den gesamten offenen Leserahmen des vIRF4-Proteins. Die Membran wurde mit *in vitro* translatiertem und radioaktiv markiertem CBF1 (<sup>35</sup>S-CBF1) als Sonde hybridisiert und gebundenes Protein durch einen Röntgenfilm detektiert.

In Abb. 4.6 A ist das Ergebnis der Peptid-Bindungsstudie graphisch dargestellt. Die Signale wurden im „Phosphorimager“ quantifiziert und mit Hilfe des AIDA-Programms ausgewertet. Die Werte stellen das Integral über einer vorgegebenen Fläche dar und sind als „Relative Phosphorimager Einheiten“ (RFE) angegeben. Die stärksten Signale wurden für die Peptide

154-156 ermittelt, welche die 13 Aminosäuren IRAPVWHPPVGHA gemeinsam haben. Im vIRF4-Protein entspricht das der Aminosäureposition 466-478. Diese Region ist in einem Auszug des Peptidblots auch in Abb. 4.6 B dargestellt und erklärt, wie mit Hilfe der überlappenden Peptide die Aminosäuresequenz bestimmt werden kann. Das Ergebnis deckt sich mit der Analyse des Hefe-*Two-Hybrid*-Systems: Das Peptidfragment As 466-478 ist Teil des C-terminalen Fragments As 314-911, welches im Hefesystem ebenfalls ein positives Signal gab (siehe 4.2.1.2 und Abb. 4.5). Überraschenderweise zeigte jedoch die in der Hefe-*Two-Hybrid*-Bindungsstudie ermittelte Region von As 201-240 in der Peptidblot-Analyse kein Signal. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass bei der Peptidblot-Hybridisierung nur lineare Epitope auf ihre Interaktion hin untersucht werden. Möglicherweise handelt es sich aber bei der Bindestelle des vIRF4-Fragments As 201 bis 240 um ein Konformationsepitop, das erst nach Faltung des Proteins entsteht. Alle schwächeren Signale, die hier bei ungefähr 500 RFE liegen, können wohl als Hintergrundsignale des Systems eingestuft werden, da eine CBF1-Interaktion für diese Regionen im Hefe-*Two-Hybrid*-System ausgeschlossen werden konnte. Die einzige Ausnahme stellt die Region von As 688-720 (Peptid 230-236) dar, welche nicht weiter untersucht wurde. Eine vollständige Liste mit dem gesamten Ergebnis der Peptidblot-Bindungsstudie findet sich im Anhang unter 8.2 wieder.



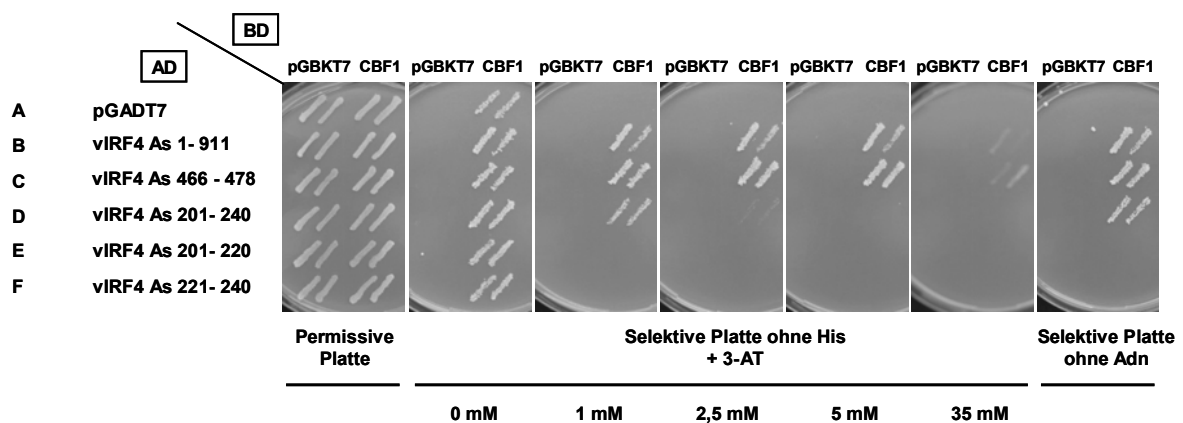
**Abb. 4.6:** Das vIRF4-Peptid von As 466-478 zeigt in der Peptidblot-Hybridisierung eine starke Interaktion mit CBF1.

Auf eine Cellulosemembran wurden 300 15mer-Peptide gespottet, jeweils um drei Aminosäuren versetzt, die das gesamte vIRF4-Protein repräsentieren. Der vIRF4-Peptidblot wurde mit *in vitro* translatiertem 35S-CBF1 inkubiert und gebundenes Protein mit einem Röntgenfilm detektiert. In die *in vitro* Translationsreaktion mit dem „TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System“ von Promega, wurden 10 µg CBF1 zusammen mit 20 µCi [35S]-Methionin eingesetzt. (A) zeigt eine graphische Auswertung der Peptidblot-Hybridisierungsanalyse. Die Signalintensität stellt das Integral über einer vorgegebenen Fläche dar und ist als „relative Phosphorimager Einheit“ (RFE) angegeben. Die As-Position des stärksten Signals (rot markiert) und des Fragments welches im Hefe-Two-Hybrid-System kartiert wurde (grün markiert) ist ebenfalls angegeben. (B) zeigt einen Auszug des Peptidblots auf dem das stärkste Signal zu erkennen ist. Das Signal umfasst die beiden Peptide 155 und 156 (rot umrandet). In der Abbildung rechts ist die Aminosäuresequenz der Peptide gezeigt. Die zwischen den Peptiden überlappenden As-Sequenzen sind fett dargestellt. Die Auswertung stellt die minimale CBF1-Bindestelle von As 466-478 dar.

#### 4.2.3 Bestätigung und Vergleich der Bindungsstärken beider vIRF4-Fragmente im Hefe-*Two-Hybrid*-System

Mit Hilfe zweier experimentell unterschiedlicher Analysen, dem Hefe-*Two-Hybrid*-System und der Peptidblot-Hybridisierung, konnten zwei an der CBF1-Bindung beteiligte vIRF4-Peptide identifiziert werden. Um beide Fragmente in demselben System zu bestätigen und um nach Möglichkeit die Bindungsstärken der beiden Peptide miteinander zu vergleichen, wurde erneut ein Hefe-*Two-Hybrid*-Experiment durchgeführt (Erklärung des Systems unter 4.2.1.1).

Die Stärke der CBF1-Interaktion sollte für das gesamte vIRF4-Protein As 1-911 und die vIRF4-Fragmente As 466-478 und As 201-240 verglichen werden. Zusätzlich wurden erneut die beiden Subfragmente von As 201-240, As 201-220 und As 221-240 untersucht. Für die Bindungsanalyse wurden das vIRF4-Protein und die Proteinfragmente fusioniert an die AD, zusammen mit DBD-CBF1 oder dessen Leervektor in Hefezellen koexprimiert, auf einer permissiven Platte ausgestrichen und die Transformanten auf Selektivplatten replikaplatziert. Das Ergebnis der Analyse ist in Abb. 4.7 dargestellt.



**Abb. 4.7: CBF1 interagiert mit zwei Regionen von vIRF4.**

Der Hefestamm AH109 wurde mit trunktierten vIRF4-Proteinen fusioniert an GAL4-AD und CBF1-DBD kotransformiert. Je zwei Transformanten wurden auf einer permissiven Platte ohne Leucin und Tryptophan ausgestrichen und auf Selektivplatten ohne Adenin (Adn) und ohne Histidin (His) mit steigender 3-AT Konzentration replikaplatziert. Als Kontrolle erfolgte zusätzlich eine Transfektion mit den Hefe-Expressionsvektoren pGBKT7 und pGADT7.

Alle Transformanten wuchsen auf der permissiven Platte. Auf der Selektivplatte ohne Adenin führte nur die Expression von vIRF4 As 1-911 und den Fragmenten As 466-478 und As 201-240 zu einem Hefewachstum (Reihe B bis D). Die Koexpression von vIRF4-Fragment As 466-478 und CBF1 erlaubte ein Hefewachstum auf der histidinfreien Platte ergänzt mit bis zu 35 mM 3-AT (Reihe C). Damit war die CBF1-Interaktion so stark wie die des gesamten vIRF4s. Im Gegensatz dazu führte As 201-240 nur zu einem Hefewachstum auf Platten mit 2,5 mM 3-AT (Reihe D). Die Subfragmente von As 201-240 ermöglichten kein Hefewachstum (Reihe E und F).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Interaktionen für beide Peptide erneut bestätigt werden konnten. Darüber hinaus scheint vIRF4 As 466-478 eine starke CBF1-Bindung zu vermitteln, während As 201-240 deutlich schwächer an CBF1 bindet. Möglicherweise leistet die Region von As 201-240 eine eher unterstützende Funktion in der CBF1-Bindung des Gesamtproteins.

#### 4.2.4 Das vIRF4-Protein bindet über ein Tetrapeptidmotiv an CBF1

Um in späteren Versuchen dieser Arbeit den Beitrag von CBF1 in der vIRF4-Regulation von zellulären Zielgenen abzufragen, sollte eine vIRF4-Mutante generiert werden, die nicht mehr in der Lage ist CBF1 zu binden. Hierfür war zunächst die minimale Bindestelle im vIRF4-Protein kartiert worden. Es wurden zwei CBF1-Bindestellen identifiziert: Eine hochaffine Region von As 466-478 und eine schwächer CBF1-bindende Region von As 201-240. In den Untersuchungen waren nur vIRF4-Fragmente auf ihre Interaktion hin untersucht worden.

Als nächstes wurde versucht, die innerhalb der hochaffinen Region exakt an der CBF1-Bindung beteiligten As zu ermitteln und des Weiteren überprüft, ob die Mutation der Bindestellen im gesamten vIRF4 wirklich zu einem Verlust der Interaktion führt.

Zur Beantwortung der Fragen sollten im vIRF4-Protein Punktmutationen eingeführt werden und die Mutanten dann im Hefe-*Two-Hybrid*-System und in Säugerzellen durch Koimmunpräzipitationen analysiert werden.

##### 4.2.4.1 Herstellung von vIRF4-Punktmutanten

In vorangegangenen Versuchen konnten zwei CBF1-Bindestellen im vIRF4-Protein identifiziert werden. Das kleinere Fragment von 13 Aminosäuren allein zeigte eine ebenso starke Bindung an CBF1 wie der Wildtyp vIRF4. Der darauf folgende Versuch sollte klären, welche Aminosäuren innerhalb des Peptids für die Bindung essentiell sind. Hierfür wurde zunächst eine Peptidblot-Bindungsstudie unter Aminosäureaustausch von vIRF4 As 466-478 durchgeführt, in welchem im Wechsel jede Aminosäure gegen Alanin ersetzt wurde. Basierend auf diesen Daten wurden im Anschluss zur weiteren Analyse gezielt Punktmutationen in die Sequenzen des Peptids und des gesamten vIRF4-Proteins eingeführt.

Die Peptidblot-Bindungsstudie wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Ronald Frank durchgeführt. Es wurden synthetisch Mutanten des Peptids hergestellt, in welchen jede der 13 Aminosäuren einmal gegen Alanin ersetzt wurde. Die mutierten Peptide wurden auf eine Membran aufgebracht und mit *in vitro* translatiertem und radioaktiv markiertem CBF1(<sup>35</sup>S-CBF1) als Sonde hybridisiert. Eine Bindung von CBF1 an eine der Aminosäuren konnte mit einem Röntgenfilm detektiert werden. Die Bindungsstudie führte zu dem Ergebnis, dass ein Alaninaustausch von Tryptophan an Aminosäureposition 471 (W471A) oder von Prolin an Position 473 (P473A) zu einem signifikantem Verlust der CBF1-Bindung führt (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden im Anschluss mittels PCR, Punktmutanten von vIRF4 As 466-478 und des gesamten vIRF4-Proteins As 1-911 kloniert, in welchen Tryptophan und Prolin gegen ein Alanin ersetzt waren: vIRF4 As 466-478<sup>W471A/P473A</sup> und vIRF4 As 1-911<sup>W471A/P473A</sup>.



Die vIRF4-Mutanten wurden dann für weitere Analysen in geeignete Expressionsvektoren für Hefe und Säugerzellen überführt.

#### 4.2.4.2 Die Analyse der vIRF4-Punkt- und -Deletionsmutanten im Hefe-Two-Hybrid-System und in den Säugerzellen HEK293 zeigt eine binäre Interaktion mit CBF1

Bisherige Ergebnisse zeigten, dass vIRF4 mit zwei Regionen an CBF1 bindet. Dabei scheinen innerhalb der kleineren Region vor allem die Aminosäuren Tryptophan und Prolin entscheidend an der Bindung beteiligt zu sein. Im folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob beide identifizierten Binderegionen auch im Kontext des gesamten vIRF4-Proteins eine Rolle spielen und welchen Beitrag jede Region für sich zur CBF1-Interaktion leistet.

Im vorangegangenen Abschnitt wurden dafür die Punktmutanten vIRF4 As 466-478<sup>W471A/P473A</sup> und vRF4 As 1-911<sup>W471A/P473A</sup> generiert. Um die zweite kartierte CBF1-Binderegion zu berücksichtigen, wurden zusätzlich noch eine Mutante mit einer Deletion an Position As 201-240 (vRF4 As 1-911<sup>Δ 201-240</sup>) und eine Doppelmutante mit beiden Mutationen (vRF4 As 1-911<sup>Δ 201-240/W471A/P473A</sup>) hergestellt. Eine Übersicht der verwendeten Mutanten ist in Abb. 4.8 A dargestellt.

Um zu prüfen, ob die Mutanten noch an CBF1 binden können, sollten sie zum einen im Hefe-Two-Hybrid-System untersucht und zum anderen durch Koimmunpräzipitation in Säugerzellen immunbiochemisch überprüft werden.

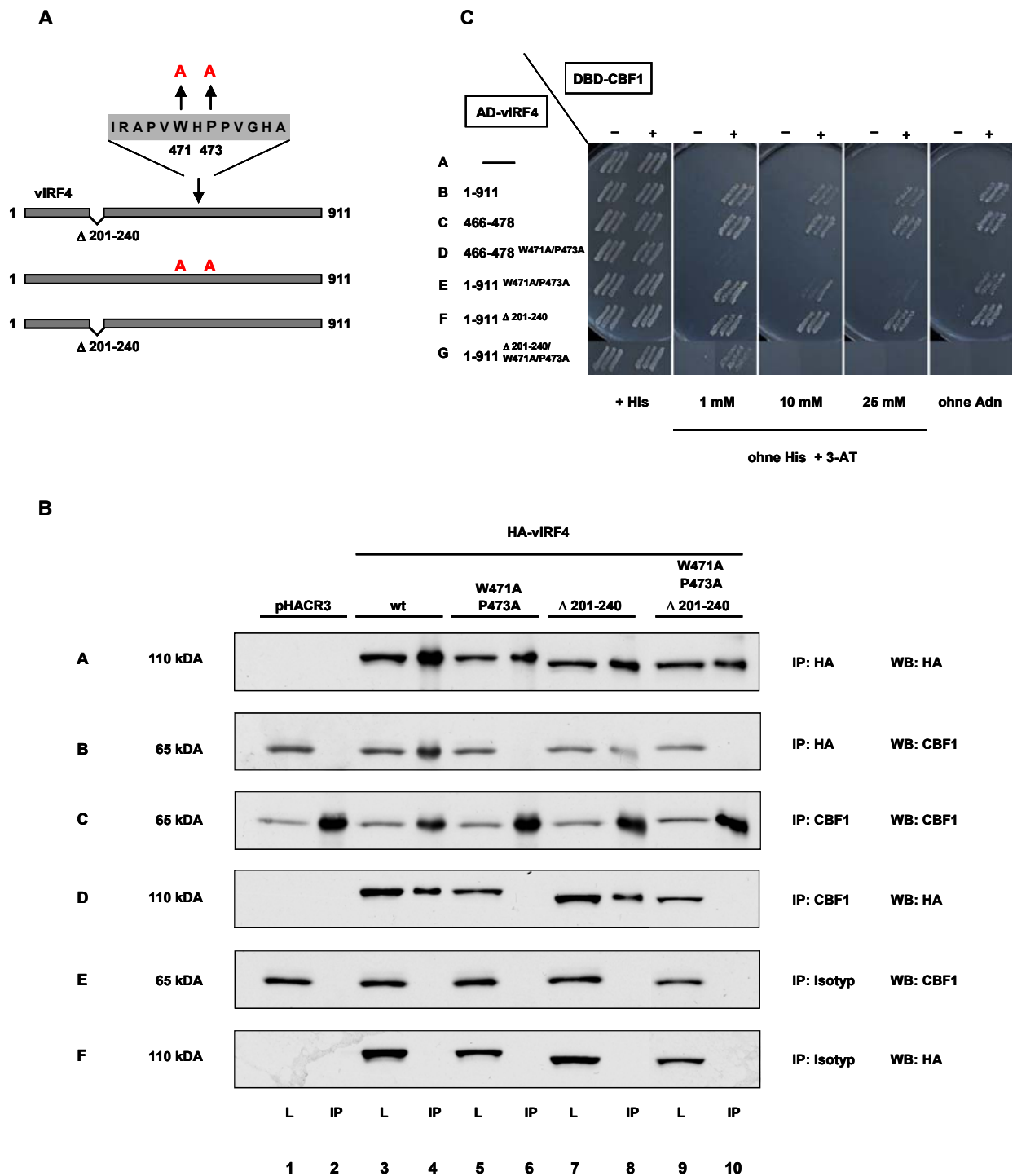
Um die Mutanten auf eine mögliche CBF1-Bindung immunbiochemisch zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit Wildtyp HA-vIRF4 As 1-911, den Mutanten vRF4 As 1-911<sup>Δ 201-240</sup> und vIRF4 As 1-911<sup>W471A/P473A</sup> sowie der Doppelmutante vIRF4 As 1-911<sup>Δ 201-240/W471A/P473A</sup> und als Kontrolle mit dem Leervektor pHACR3 transfiziert, Proteinextrakte hergestellt und diese mit einem spezifischen Antikörper für HA oder CBF1 bzw. als Kontrolle mit entsprechendem Isotyp immunpräzipitiert. Die weitere Analyse der Proteinlysate und -komplexe erfolgte im Westernblot mit einem HA- oder CBF1-spezifischen Antikörper.

Das Ergebnis ist in Abb. 4.8 B dargestellt. Der Wildtyp HA-vIRF4 und alle HA-Mutanten konnten im Proteinlysat nachgewiesen und darüber hinaus auch immunpräzipitiert werden (Reihe A, Spur 3 bis 10). Die Komplexbildung von HA-vIRF4-Wildtyp mit endogenem CBF1 konnte durch Koimmunpräzipitation bestätigt werden. So ist die Expression von CBF1 sowohl im Lysat, als auch in der Immunpräzipitation von HA-vIRF4 im Westernblot darstellbar (Reihe B, Spur 3 und 4). Fehlt jedoch HA-vIRF4 als Interaktionspartner (Reihe A, Spur 1 und 2), kann CBF1 zwar im Gesamtzelllysat nachgewiesen werden, ist aber aufgrund der fehlenden Komplexbildung nicht in der Immunpräzipitation von HA-vIRF4 erfassbar

(Reihe B, Spur 1 und 2). Die Koexpression mit Mutante As 1-911  $\Delta^{201-240}$  (Reihe B, Spur 7) führte zu einer schwächeren Koimmunpräzipitation von CBF1 (Reihe B, Spur 8). Hingegen war mit Mutante As 1-911  $^{W471A/P473A}$  oder mit Doppelmutante vIRF4 As 1-911  $\Delta^{201-240/W471A/P473A}$  keinerlei Koimmunpräzipitation von CBF1 möglich (Reihe B, Spur 6 und 10), auch wenn CBF1 im Gesamtzelllysate durchaus detektiert werden konnte (Reihe B, Spur 5 und 9).

Die Expression von endogenem CBF1 konnte im Gesamtzelllysate und nach Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Reihe C, Spur 1 bis 10). Desweiteren konnten der Wildtyp und die Mutante As 1-911  $\Delta^{201-240}$  gleich stark koimmunpräzipitiert (Reihe D, Spur 4 und 8) und deren Expression auch im Lysate nachgewiesen werden (Reihe D, Spur 3 und 7). Hingegen war auch in dieser Konstellation bei Mutante As 1-911  $^{W471A/P473A}$  und der Doppelmutante vIRF4 As 1-911  $\Delta^{201-240/W471A/P473A}$  keine Komplexbildung mit CBF1 (Reihe D, Spur 6 und 10) nachweisbar. Die Expression von CBF1 im Gesamtzelllysate war aber im Westernblot darstellbar (Reihe D, Spur 5 und 9). Als Kontrolle auf unspezifische Bindung des CBF1-Antikörpers wurde eine Immunpräzipitation mit einem nicht spezifischen Antikörper gleichen Isotyps des Gesamtzelllysats durchgeführt. CBF1 konnte zwar im Proteinlysate detektiert, aber nicht immunpräzipitiert werden (Reihe E, Spur 1-10). Da CBF1 als Interaktionspartner fehlt, konnten HA-vIRF4-Wildtyp und die HA-Mutanten ebenfalls im Lysate nachgewiesen, aber nicht koimmunpräzipitiert werden (Reihe F, Spur 1-10).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in der immunbiochemischen Analyse Mutante As 1-911  $\Delta^{201-240}$  immer noch sehr gut an CBF1 binden kann. Eine leicht abgeschwächte Bindung von CBF1 war nur nach der Immunpräzipitation von Mutante As 1-911  $\Delta^{201-240}$  zu erkennen. Da der Komplex jedoch nach der Immunpräzipitation von CBF1 nicht nachgewiesen werden konnte, kann hier nicht ernsthaft von einer Beeinträchtigung der Interaktion gesprochen werden. Das lässt vermuten, dass die Region von As 201-240 im gesamten Protein bei der Bindung eine untergeordnete Rolle spielt. Im Gegensatz dazu war das Ergebnis für Mutante As 1-911  $^{W471A/P473A}$  und Doppelmutante As 1-911  $\Delta^{201-240/W471A/P473A}$  eindeutig. Eine Komplexbildung von CBF1 war mit keiner der beiden Mutanten mehr möglich.



**Abb. 4.8: Die hochaffine vIRF4-Bindung an CBF1 wird vorwiegend über zwei Aminosäuren eines Tetrapeptidmotivs vermittelt.**

(A) Schematische Darstellung drei verschiedener vIRF4-Mutanten. In dem gesamten vIRF4-Protein wurden die As Tryptophan (W) und Prolin (P) gegen ein Alanin ausgetauscht oder die Region von As 201-240 deletiert oder eine Kombination von beiden durchgeführt. (B) Siebzig % konfluente HEK293-Zellen wurden mit 10 µg der Expressionsplasmide HA-vIRF4 bzw. den unter A genannten Mutanten transfiziert und die Komplexbildung mit CBF1 durch Koimmunpräzipitation mit einem HA- und CBF1 (RBJ-6E7)-Antikörper überprüft. Die Darstellung der Proteine und der Komplexe erfolgte im Westernblot mit Antikörpern spezifisch für HA bzw. CBF1 (RBP-7A11). Gleichzeitig wurden Immunpräzipitationen mit Isotypkontrollen für den RBJ-6E7-Antikörper durchgeführt. Die Proteinmenge des Lysats entspricht 2 % der IP-Probe. (C) In Hefezellen des Stammes AH109 wurden vIRF4-AD oder vIRF4-Mutanten-AD mit CBF1-DBD oder den entsprechenden Leervektoren koexprimiert und das

Wachstum der Hefen auf Selektionsplatten ohne Adenin und ohne Histidin mit zunehmender Konzentration an 3-AT untersucht.

Zur weiteren Bestätigung und um eine etwaige Restbindung beurteilen zu können, wurde das Experiment auch im Hefe-*Two-Hybrid*-System durchgeführt.

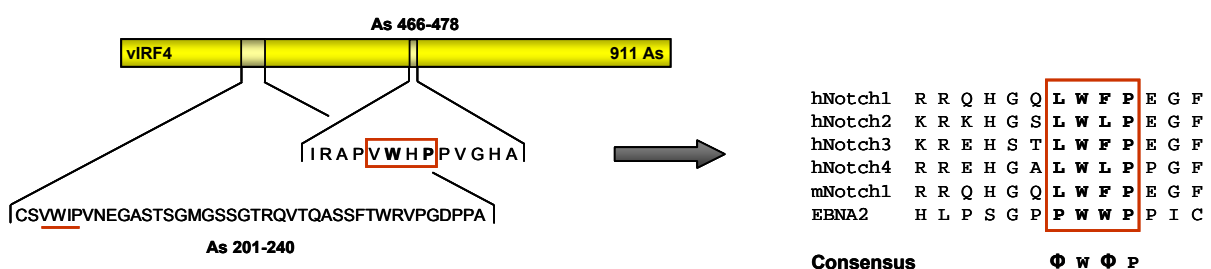
Für die Hefe-*Two-Hybrid*-Analyse wurde das gesamte vIRF4 As 1-911, das Fragment As 466-478 oder die Mutanten, jeweils fusioniert an GAL4-AD, oder der Leervektor, zusammen mit DBD-CBF1 oder dem entsprechenden Leervektor in Hefezellen koexprimiert, auf permissive Platten ohne Tryptophan und Leucin kultiviert und anschließend auf Selektivplatten ohne Adenin und ohne Histidin mit steigender Konzentration an 3-AT replikaplattiert.

Wie das Ergebnis in Abb. 4.8 C zeigt, führt die Expression des Wildtyps vIRF4 As 1-911, des Fragments As 466-478 und der Mutante vIRF4 As 1-911<sup>Δ 201-240</sup> zu einem gleichstarken Wachstum der Hefezellen auf der adeninfreien Platte (Reihe B, C und F). Für die Mutante As 466-478<sup>W471A/P473A</sup> ist kein Hefewachstum zu beobachten, ebenso für die Doppelmutation As 1-911<sup>Δ 201-240/W471A/P473A</sup> (Reihe D und G). Hingegen führt die Punktmutation im gesamten vIRF4 As 1-911<sup>W471A/P473A</sup> (Reihe E) noch zu einem schwachen Wachstum der Hefezellen. Auf den histidinfreien Platten wachsen die Hefen von As 1-911, As 466-478 und auch von Mutante 1-911<sup>Δ 201-240</sup> bis zu einer Konzentration von 25 mM 3-AT (Reihe B, C und F). Hingegen wachsen Hefen des mutierten Fragments As 466-478<sup>W471A/P473A</sup> schon nicht mehr auf der 1 mM 3-AT-Platte (Reihe D). Betrachtet man die Mutationen im gesamten vIRF4-Protein, bewirkt Mutante As 1-911<sup>W471A/P473A</sup> (Reihe E) noch ein schwaches Wachstum auf der 10 mM Platte. Dies ist erst durch die Doppelmutante As 1-911<sup>Δ 201-240/W471A/P473A</sup> (Reihe G) nicht mehr möglich.

Der Versuch zeigt, dass die Deletion von As 201-240 im gesamten vIRF4-Protein keine nachweisbare Einschränkung in Bezug auf die CBF1-Bindung zur Folge hat. Allerdings führt die Punktmutation von Tryptophan und Prolin allein nicht zu einem vollständigen Verlust der CBF1-Interaktion. Erst die Doppelmutation beider CBF1-Bindestellen verhindert die Komplexbildung von CBF1 und vIRF4. Der Unterschied zwischen Mutante As 1-911<sup>W471A/P473A</sup> und Doppelmutante As 1-911<sup>Δ 201-240/W471A/P473A</sup> in der CBF1-Bindung war im Westernblot nicht zu erkennen. Erst die Analyse im Hefe-*Two-Hybrid*-System machte den Unterschied deutlich. Die Feinheiten der Bindungsstärke konnten in diesem Fall im Hefe-*Two-Hybrid*-System besser dargestellt werden. Für die CBF1-Bindung sind demnach beide Regionen wichtig, wobei As 466-478 für die Bindung essentiell zu sein scheint und As 201-240 vermutlich eine unterstützende Funktion hat.

4.2.4.3 Die Aminosäuren Tryptophan und Prolin sind Teil eines Tetrapeptidmotivs ähnlich dem von Notch und EBNA2

Wie in dem Versuch unter 4.2.4.2 gezeigt, wird die CBF1-Bindung im Wesentlichen über ein Peptid von As 466-478 mit der Sequenz IRAPVWHPPVGHHA vermittelt. Dabei erfolgt die hochaffine Bindung des Peptids an CBF1 durch die Aminosäuren Tryptophan und Prolin. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Interaktion viraler Proteine des EBV und von Notch mit CBF1 schon seit geraumer Zeit bekannt. Für EBNA2 und Notch ist auch die CBF-Binderegion bereits kartiert worden. Bei näherer Betrachtung der vIRF4-Peptidsequenz As 466-478 fällt auf, dass diese Sequenz stark den konservierten Sequenzen der Notch-RAM-Domäne und der EBNA2-Region ähnelt, welche entscheidend an der CBF1-Bindung beteiligt sind (siehe Abb. 4.9). Notch und EBNA2 binden beide über ein Tetrapeptidmotiv mit dem Consensus  $\Phi$ W $\Phi$ P an CBF1. Dabei kann es sich bei  $\Phi$  um eine beliebige hydrophobe Aminosäure handeln, wie aus der Sequenzliste zu ersehen ist. Das vIRF4-Tetrapeptid stimmt mit Tryptophan und Prolin mit dem Motiv überein. Dennoch deckt es sich nicht vollständig mit dem Consensus von Notch und EBNA2, da sich an dritter Position mit Histidin keine hydrophobe, sondern eine positiv geladene Aminosäure befindet. Interessanterweise findet sich auch in der weniger affinen Binderegion von vIRF4 As 201-240 ein Tetrapeptidmotiv welches genau dem Consensus von Notch und EBNA2 entspricht. Neben den übereinstimmenden As Tryptophan und Prolin, handelt es sich bei Valin und Isoleucin um hydrophobe Aminosäuren, wodurch es sich hier um denselben Consensus handelt. Für eine Beurteilung dieser Beobachtung soll an dieser Stelle auf Abschnitt 5.2.2 verwiesen werden, in welchem beide Tetrapeptide genauer diskutiert werden.



**Abb. 4.9: Das hochaffine CBF1-Bindemotiv in vIRF4 ähnelt stark dem Bindemotiv von Notch und EBNA2.** Gezeigt ist eine schematische Darstellung des vIRF4-Proteins mit beiden identifizierten CBF1-Bindestellen. Das hochaffine Tetrapeptidmotiv in vIRF4 ist mit einem roten Kasten markiert. Das Tetrapeptidmotiv in dem weniger affinen Peptid wurde rot unterstrichen. Im Vergleich dazu sind in der Abbildung rechts die konservierten Bindemotive von humanem Notch (hNotch 1-4), murinem Notch (mNotch1) und EBNA2 aufgelistet. Der Consensus der Tetrapeptide ist ebenfalls dargestellt, wobei  $\Phi$  für eine beliebige hydrophobe As steht.

Wiederum ist bekannt, dass die  $\Phi W\Phi P$  Motive von Notch und EBNA2 mit der hydrophoben Tasche von CBF1-BTD interagieren (siehe CBF1-Struktur in der Einleitung). Das führte zu der Frage, ob vIRF4 mit seinem  $\Phi WHP$  Motiv ebenfalls in der hydrophoben Tasche an die BTD-Region von CBF1 bindet. Diese Frage wurde in dem Projekt meiner Kollegin Barbara Scholz beantwortet. Die Ergebnisse sind in der gemeinsamen Publikation genau beschrieben (Heinzelmann et al., 2010). Die Untersuchungen bestätigen die Vermutung, dass vIRF4 über die hydrophobe Tasche in BTD an CBF1 bindet. Darüber hinaus konnte Barbara Scholz zeigen, dass Notch und vIRF4 möglicherweise um die CBF1-Bindung konkurrieren.

## B) Identifizierung von zellulären Zielgenen des vIRF4-Proteins

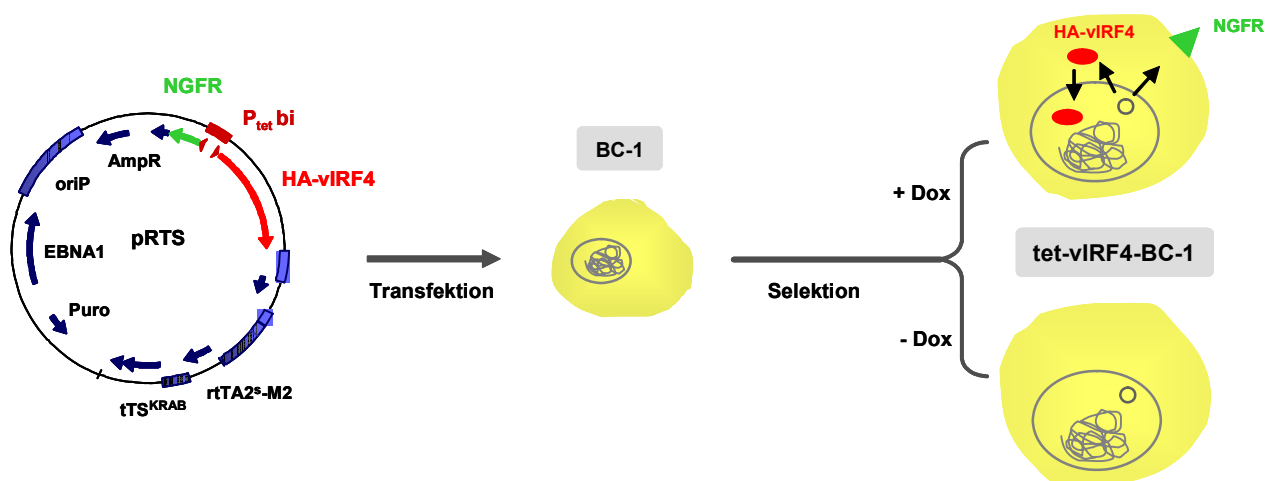
Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Interaktion eines weiteren KSHV-Proteins, dem vIRF4, mit CBF1 beschrieben und diese Interaktion auch näher charakterisiert. Zelluläre Zielgene von vIRF4 sind bislang nicht beschrieben worden. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe durch Barbara Scholz konnte jedoch gezeigt werden, dass vIRF4 in einem GAL4-abhängigen Reportersystem als Repressor wirkt. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte nun die Frage geklärt werden, welche zellulären Zielgene durch vIRF4 reguliert werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Regulation CBF1-abhängig verläuft und vIRF4 über CBF1 in den Notch-Signalweg eingreift und sich diesen zu Nutze macht.

Zum Nachweis vIRF4-regulierter Zielgene sollte eine Genexpressionsanalyse des humanen Genoms in An- und Abwesenheit von vIRF4 durchgeführt werden. Dies sollte Aufschluss geben, in wie weit eine Modulation des zellulären Genexpressionsmusters vorliegt. Dazu wurden Genexpressionsarrays mit Hilfe der Affymetrix-Technologie durchgeführt. Das hierfür verwendete zelluläre System wird unter 4.3 beschrieben und näher charakterisiert.

### 4.3 Identifizierung von zellulären Zielgenen unter Verwendung eines konditionalen Zellsystems

Um vIRF4-bedingte Unterschiede in der Genexpression zu untersuchen, hatte ich mich für ein zelluläres System entschieden, das von meiner Kollegin Barbara Scholz etabliert worden war. Das Zellsystem ermöglicht in den Zellen BC-1 die konditionale Expression von vIRF4. Dafür wurde von Barbara Scholz die cDNA von vIRF4 an einen HA-tag fusioniert und in den Tetracyclin-regulierbaren Expressionsvektor pRTS-1 kloniert. Anschließend wurde damit die KSHV- und EBV-positive Zelllinie BC-1 transfiziert. Das ursprüngliche Vektorsystem wurde von Prof. Georg Bornkamm entwickelt (Bornkamm et al., 2005). Der episomal replizierende

Vektor pRTS-1 führt zur konstitutiven Expression des Tetracyclin-sensitiven Transaktivators  $\text{rtTAS}^{\text{S-M2}}$  und des *Silencers*  $\text{tTS}^{\text{KRAB}}$ . Die Expression des Fremdgens, hier HA-vIRF4, und die simultane Expression des Reportergens stehen unter Kontrolle des bidirektionalen Promotors  $\text{P}_{\text{tet,bi}}$  (Abb. 4.10). Das Reportergen kodiert für den funktionell inaktiven NGF-Rezeptor (NGFR, *Nerve Growth Factor Receptor*). In Abwesenheit von Tetracyclin bindet  $\text{tTS}^{\text{KRAB}}$  an den Promotor, wodurch die Expression der Gene unterbunden wird. Durch Zugabe von Tetracyclin oder seinem Derivat Doxycyclin ins Zellkulturmedium, kann die Repression aufgehoben werden. Dabei kommt es durch Bindung von  $\text{rtTAS}^{\text{S-M2}}$  zur Aktivierung von  $\text{P}_{\text{tet,bi}}$  und Verdrängung von  $\text{tTS}^{\text{KRAB}}$ . Die Frequenz induzierter Zellen kann anhand der NGFR-Expression auf der Zelloberfläche mit Hilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper im FACS nachgewiesen werden. Nach Transfektion von BC-1-Zellen wurden diese von Barbara Scholz durch Puromycin selektioniert und so eine stabile konditional vIRF4-exprimierende Zelllinie etabliert. Die Zelllinie wird im Folgenden als tet-vIRF4-BC-1 bezeichnet. Des Weiteren wurde als Kontrolle der Leervektor ohne HA-vIRF4 Fragment in BC-1-Zellen transfiziert. Durch Selektion mit Puromycin wurde ebenfalls eine stabile Linie etabliert, die tet-leer-BC-1 genannt wird.



**Abb. 4.10: Etablierung einer konditional vIRF4 exprimierenden Zelllinie.**

Gezeigt ist eine vereinfachte Karte des episomalen Vektors pRTS-1 zur konditionalen Expression von vIRF4. Die Expression von HA-vIRF4 und dem NGFR wird durch einen bidirektionalen, Dox-abhängigen Promotor ( $\text{P}_{\text{tet,bi}}$ ) koreguliert. BC-1-Zellen wurden mit dem Vektor transfiziert und die Zellen mittels Puromycin (Puro) selektioniert. Die simultane Expression von HA-vIRF4 und dem NGFR ist durch Zugabe von Dox ins Zellkulturmedium induzierbar. Auf demselben Weg wurde die Zelllinie tet-vIRF4 mt-BC-1 zur konditionalen Expression der nicht mehr CBF1-bindenden Mutante vIRF4 hergestellt. EBNA1 (Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen 1) bewerkstelligt durch Bindung an oriP (*origin of plasmid replication*) die Replikation des Vektors. AmpR, Ampicillinresistenz;  $\text{rtTAS}^{\text{S-M2}}$ , Transaktivator;  $\text{tTS}^{\text{KRAB}}$ , *Silencer*;

Das System bietet den Vorteil, im genetischen Hintergrund einer KSHV- und EBV-infizierten B-Zelle, vIRF4-Zielgene zu identifizieren. Durch die tetracyclininduzierbare vIRF4-Expression können Modulationen des Genexpressionsprofils eindeutig auf vIRF4, auch ohne Induktion des lytischen Zyklus, zurückgeführt werden. Darüber hinaus sind aufgrund der vIRF4-Überexpression auch stärkere Effekte zu erwarten. Der Vorteil der hier verwendeten Linie

BC-1 ist, dass diese im Vergleich zur nur mit KSHV infizierten Linie BCBL-1, ein wenig stabiler ist. Wie unter 4.1.2 erläutert, kommt es hier in der latenten Phase nicht zu einer spontanen Reaktivierung des lytischen Zyklus und der damit verbundenen endogenen Expression von vIRF4.

Neben der Identifikation von vIRF4-Zielgenen soll das System auch dazu verwendet werden, in späteren Versuchen eine CBF1-abhängige Zielgenregulation zu untersuchen. Dafür soll das zelluläre Genexpressionsprofil einer BC-1 Zelle nach konditionaler Expression der vIRF4-Mutante (mt), welche nicht mehr an CBF1 binden kann, bestimmt werden. In den zuvor beschriebenen Vektor pRTS-1 habe ich deshalb die von mir unter Abschnitt 4.2.4 hergestellte und beschriebene Mutante vIRF4 As 1-911 <sup>Δ201-240/W471A/P473A</sup> kloniert, BC-1-Zellen transfiziert und durch Selektion eine stabile Linie etabliert. Die Zelllinie wird im Folgenden tet-vIRF4 mt-BC-1 genannt.

#### **4.4 Charakterisierung der Zelllinien tet-vIRF4-BC-1 und tet-vIRF4 mt-BC-1**

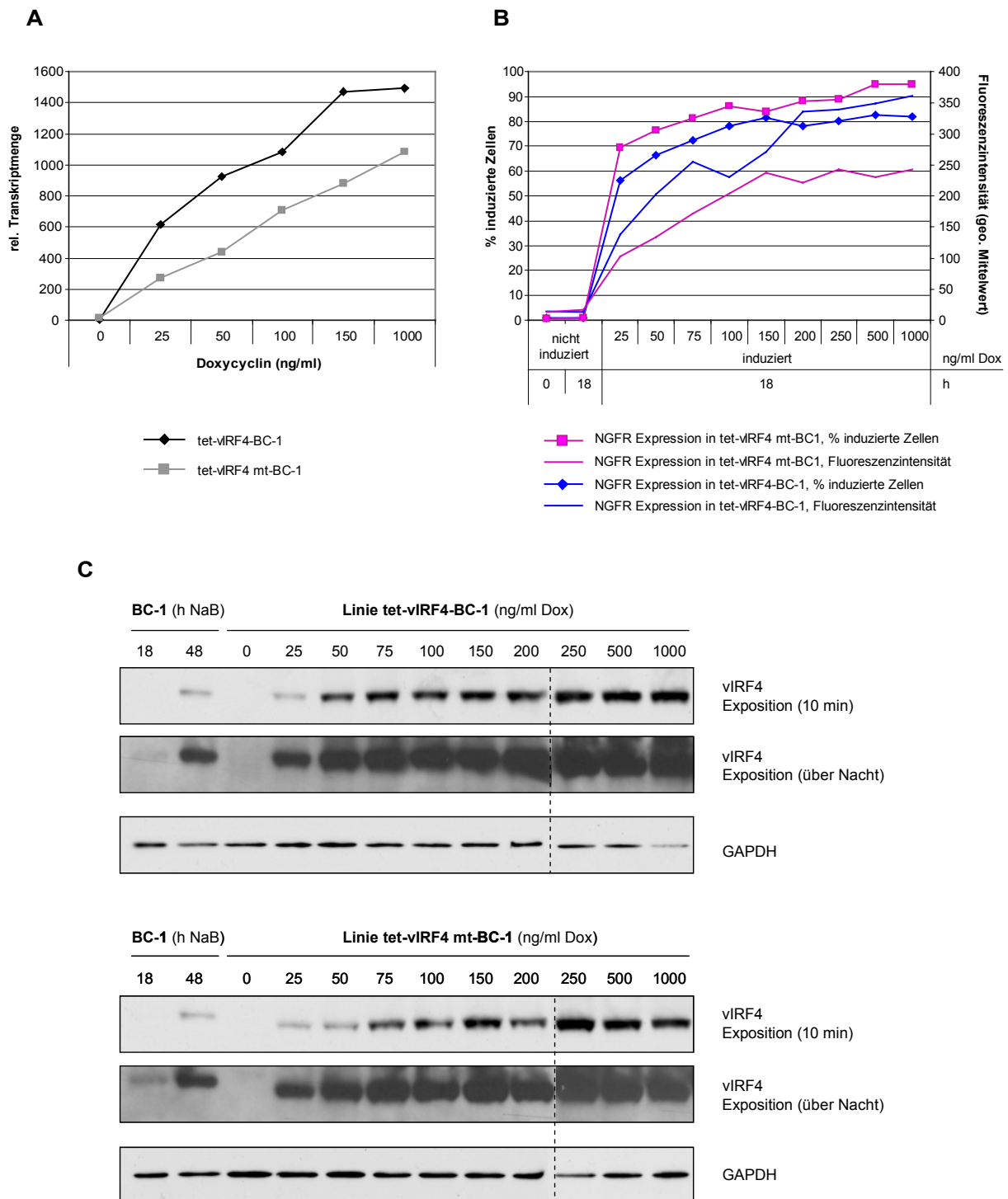
##### **4.4.1 Doxycyclin-Titration zur Induktion von vIRF4 wt und vIRF4 mt**

Um die beiden in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien in späteren Versuchen sinnvoll einsetzen zu können, musste zunächst die Frequenz induzierter Zellen und das Expressionsverhalten von vIRF4-Wildtyp (vIRF4 wt) bzw. vIRF4-Mutante (vIRF4 mt) in den beiden Linien näher charakterisiert werden.

Entschieden werden sollte, mit welcher Dox-Konzentration zum einen noch eine Überexpression von vIRF4 gegeben ist, und zum anderen die Konzentration hoch genug ist, um möglichst viele Zellen induzieren zu können.

Um dies zu klären, wurden die beiden Zelllinien tet-vIRF4-BC-1 und tet-vIRF4 mt-BC-1 mit verschiedenen Konzentrationen an Dox für 18 h induziert und die vIRF4-Expression auf RNA- und Proteinebene untersucht. Die Frequenz induzierter Zellen wurde indirekt über den Nachweis des NGFR im FACS analysiert.





**Abb. 4.11: Dox-Titration zur Induktion von vIRF4 wt und vIRF4 mt.**

In den Zelllinien tet-vIRF4-BC-1 und tet-vIRF4 mt-BC-1 wurde die Expression von vIRF4 wt bzw. vIRF4 mt mit steigenden Konzentrationen an Dox induziert (A-C). (A) Zur Darstellung der Expression auf Transkriptebene wurde eine *Real-time* PCR mit transkriptspezifischen vIRF4-Primern durchgeführt. Die Transkriptmenge wurde relativ zu einer Kalibratorprobe bestimmt und gegen G6PD normalisiert. (B) Die Induktion der vIRF4-Expression kann indirekt anhand der NGFR-Expression auf Einzelzellebene detektiert werden. Hierfür wurden die Zellen mit einem NGFR-spezifischen AK und Cy5-gekoppeltem sekundärem AK inkubiert und der Anteil an NGFR-positiven Zellen sowie die Fluoreszenzintensität im FACS ermittelt. (C) Zum Vergleich ist das endogene Expressionslevel von vIRF4 nach Induktion des lytischen Zyklus durch NaB-Behandlung der Zelllinie BC-1 dargestellt. Je 30 µg Gesamtproteinextrakt, bzw. 50 µg der Linie BC-1, wurden auf einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetragen und die Expression von vIRF4 bzw. vIRF4 mt in einem Westernblot mit dem vIRF4-spezifischen AK vIRF-8F8 ermittelt. Die Expression von GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert.

Für die Analyse auf RNA-Ebene wurde Gesamt-RNA isoliert, eine eventuelle DNA-Kontamination durch DNase Verdau entfernt und eine reverse Transkription in cDNA unter Verwendung von *random* Primern durchgeführt. Die cDNA wurde in eine *Real-time* PCR-Analyse eingesetzt und die Transkriptmenge von vIRF4 mit transkriptspezifischen Primern bestimmt. Die Transkriptmenge in einer cDNA-Probe wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Amplifikationseffizienz des verwendeten Primerpaares relativ zu einer Kalibratorprobe berechnet und auf die Abundanz von G6PD (Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase) normalisiert, um Schwankungen in der eingesetzten RNA-Menge zu korrigieren. Die Qualität der PCR-Produkte wurde durch Schmelzkurvenanalyse und Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Nach Induktion der vIRF4-Expression in den konditionalen Zelllinien für 18 h, kann mit steigenden Konzentrationen an Dox auch eine Zunahme der Transkriptmenge von vIRF4 wt und vIRF4 mt verzeichnet werden, die im Wildtyp bei 150 ng/ml Dox in eine Sättigung übergeht. Die Mutante hingegen zeigt bei 1000 ng/ml Dox den höchsten Transkriptwert (Abb. 4.11 A).

Durch eine FACS-Analyse des NGFR kann die Frequenz induzierter Zellen bestimmt werden. Gleichzeitig kann die Fluoreszenzintensität Auskunft darüber geben, wie die Stärke der NGFR-Expression innerhalb der Population NGFR-positiver Zellen verteilt ist. Die Fluoreszenzintensität wird als geometrischer Mittelwert angegeben und gibt den logarithmischen Durchschnitt der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zellen in einer Messung wieder. Die FACS-Analyse des NGFR (B) zeigt deutlich, dass bei einer Reduktion der Dox-Konzentration der Anteil an induzierten Zellen kontinuierlich zurückgeht. Da anhand der gewählten Dox-Konzentration auf Transkriptebeine keine Sättigung mehr für die Linie tet-vIRF4 mt-BC-1 zu beobachten war, wurden für die FACS-Analyse zusätzliche Konzentrationen an Dox mit eingesetzt. Der höchste Anteil an induzierten Zellen reicht bei einer Dox-Konzentration von 500 bis 1000 ng/ml Dox von über 80 % in der Linie tet-vIRF4-BC-1 und bis 95 % in tet-vIRF4 mt-BC-1. Bei 25 ng/ml Dox reduziert sich der Anteil an positiven Zellen in beiden Linien um 25 %. Auch die Fluoreszenzintensität nimmt mit steigenden Dox-Konzentrationen kontinuierlich zu und zeigt in der Linie tet-vIRF4-BC-1 das höchste Signal von 361, bei einer Konzentration von 1000 ng/ml Dox, während die Fluoreszenzintensität mit 25 ng/ml deutlich schwächer ist und nur einen Wert von 138 erreicht. In der Zelllinie tet-vIRF4 mt-BC-1 ist bei einer Konzentration von 25 ng/ml Dox eine Fluoreszenzintensität von 103 zu beobachten, die sich mit zunehmender Dox-Konzentration weiter erhöht. Das stärkste Fluoreszenzsignal mit dem Wert von 243 wird mit einer Dox-Konzentration von 1000 ng/ml erzielt, wobei der weitere Anstieg ab 150 ng/ml Dox gering ist. Somit wird durch eine Erhöhung der Dox-Konzentration nicht nur in mehr Zellen die NGFR-Expression induziert, sondern auch eine Zunahme der Expressionsstärke erreicht.

Die Proteinexpression von vIRF4 wurde in einem Westernblot analysiert. Dazu wurden, wie auch für die FACS-Analyse, Zellen der Linie tet-vIRF4-BC-1 und der Linie tet-vIRF4 mt-BC-1 mit verschiedenen Dox-Konzentrationen kultiviert, nach 18 h geerntet und Proteinextrakte hergestellt. Um einschätzen zu können wie stark die Überexpression von vIRF4 in den konditionalen Linien ist, wurde sie mit der endogenen vIRF4-Expression in Bezug gesetzt. Dafür wurde in BC-1-Zellen der lytische Zyklus mit Hilfe von NaB induziert, nach 18 und 48 h Proteinextrakte erstellt und diese ebenfalls im Westernblot auf die Expression von vIRF4 untersucht.

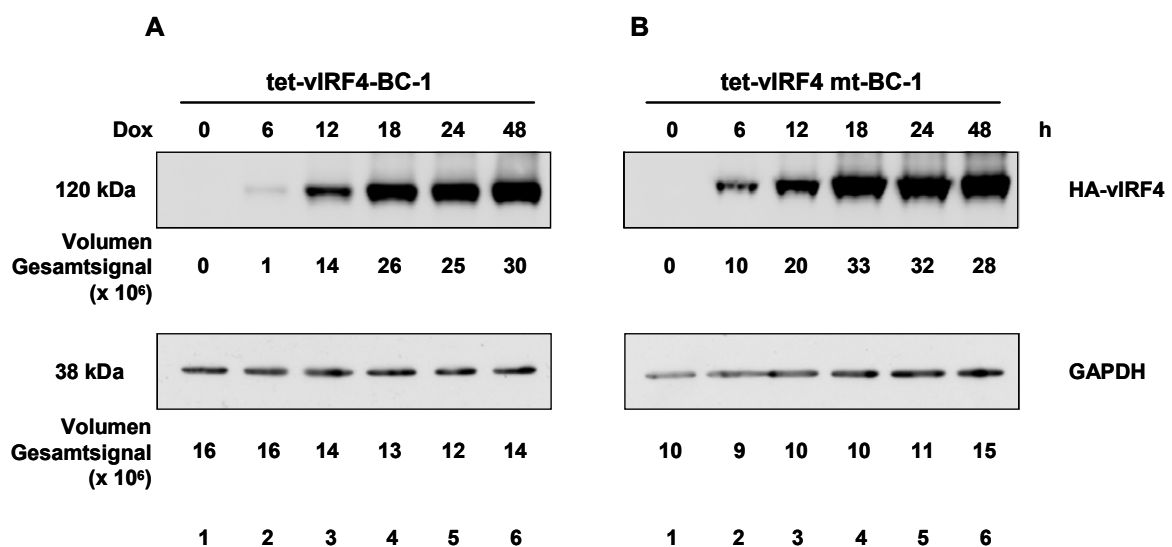
Auf Proteinebene korreliert in beiden Linien eine steigende Dox-Konzentration mit einer Zunahme der vIRF4-Expression (C). In der Abbildung sind zwei Expositionszeiten der Filme gezeigt. Die Über-Nacht-Exposition zeigt deutlich, dass die Expression von vIRF4 wt bzw. vIRF4 mt erst nach Induktion durch Dox erfolgt. Auch die endogene vIRF4-Expression in der Linie BC-1 ist nach dieser Expositionszeit deutlich zu erkennen. Die kürzere Expositionszeit von 10 min ermöglicht in den beiden konditionalen Linien eine feinere Darstellung der vIRF4-Banden nach Dox-Induktion. Die Expression von vIRF4 geht bei einer Dox-Konzentration von 500 bis 1000 ng/ml in eine Sättigung über. Für die vIRF4-Mutante ist ab 250 ng/ml Dox keine weitere Zunahme der Expression mehr zu beobachten.

Das Expressionslevel von vIRF4 wt in der Linie tet-vIRF4-BC-1 und von vIRF4 mt in der Linie tet-vIRF4 mt-BC-1, entspricht schon bei einer Kultivierung mit 25 ng/ml Dox für 18 h dem Expressionslevel von vIRF4, welches erst nach 48 h endogener Expression in BC-1-Zellen erreicht ist. Der korrespondierende 18 h Wert der vIRF4-Expression in BC-1-Zellen ist um einiges schwächer. Das bedeutet, dass in dem konditionalen System bei einer Konzentration von 25 ng/ml schon eine Überexpression gegeben ist. Eine Quantifizierung der Proteinmengen mit dem „Fusion FX7“-Gerät der Firma Peqlab, wie sie in späteren Experimenten vorgenommen wurde, war aufgrund der Neuanschaffung des Gerätes nicht zu jedem Zeitpunkt meiner Doktorarbeit möglich.

Die Untersuchungen zeigen insgesamt, dass die vIRF4-Expression in dem konditionalen System in Abwesenheit von Dox einer strikten Repression unterliegt und erst durch Zugabe von Dox induziert wird. Somit kann eine Hintergrundaktivität des Vektorsystems ausgeschlossen werden (B, Über-Nacht-Exposition). Gleichzeitig ist zu erkennen, dass schon bei einer geringeren Dox-Konzentration von 25 ng/ml Dox eine Überexpression von vIRF4 gegeben ist. Hingegen war in der FACS-Analyse deutlich zu sehen, dass erst mit einer hohen Konzentration ca. 90 % der Zellen induziert werden können. Aus diesem Grund habe ich mich dafür entschieden, für alle Versuche 1 µg/ml Dox zur Induktion von vIRF4 zu verwenden.

#### 4.4.2 Kinetik der vIRF4-Expression in den konditionalen Zelllinien

Neben der Identifizierung von Zielgenen soll auch der zeitliche Verlauf der Genregulation untersucht werden. Um das Expressionslevel von vIRF4-Wildtyp und vIRF4-Mutante auf Proteinebene genau beurteilen zu können, sollte die vIRF4-Expression nach Dox-Induktion in einer Zeitreihe dargestellt werden. Dazu wurden Zellen der Linie tet-vIRF4-BC-1 und tet-vIRF4 mt-BC-1 mit 1 µg/ml Dox induziert und 6, 12, 18, 24 und 48 h nach Induktion geerntet und die Proteinextrakte im Westernblot analysiert. Darüber hinaus war es notwendig zu überprüfen, ob die vIRF4-Mutante und der -Wildtyp zu den verschiedenen Zeitpunkten gleich stark exprimiert werden. Nur so kann im Hinblick auf eine CBF1-abhängige Zielgenregulation das Ergebnis der vIRF4-Mutante richtig beurteilt werden. Deshalb wird das Expressionsniveau vom vIRF4-Wildtyp und der vIRF4-Mutante auf Proteinebene quantifiziert. Möglich ist dies mit Hilfe des Chemilumineszenzsystems „Fusion FX7“ der Firma Peqlab. Im Vergleich zu bisherigen Geräten, bei denen durch Bildanalyse die Bandenintensität auf einem Chemilumineszenz-sensitiven Film ermittelt wird, werden hier die abgegebenen Photonen während der Chemilumineszenzreaktion detektiert und verrechnet. Dadurch ist eine genauere Aussage über die relative Proteinmenge möglich. Diese wird vom Gerät als Integral über einer vorgegebenen Fläche, hier als „Volumen“ bezeichnet, ausgegeben.



**Abb. 4.12: Quantifizierung der Proteinmengen von vIRF4 wt und vIRF4 mt.**

Zur Bestimmung der Expressionseffizienz von vIRF4 wt (A) und vIRF4 mt (B) über 48 Stunden, wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit 1 µg/ml Dox induziert, zu sechs verschiedenen Zeitpunkten geerntet und Proteinextrakte erstellt. Für die weitere Analyse wurden 30 µg des Gesamtproteinextrakts auf ein 8%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und die vIRF4-Expression im Westernblot detektiert. Zusätzlich wurden die Proteinmengen im System „Fusion FX7“ quantifiziert. Die Proteinmenge wird hier als Volumen (das Integral über einer vorgegebenen Fläche) wiedergegeben. Die Expression von GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert. Für (A) und (B) sind gleich lange Expositionszeiten der Filme dargestellt.

Abb. 4.12 zeigt das Ergebnis der Zeitreihenanalyse. Sowohl für den Wildtyp (A), als auch für die Mutante (mt) (B) zeigt sich über die Zeit eine kontinuierliche Zunahme der vIRF4-Expression. In der Linie tet-vIRF4-BC-1 ist vIRF4 das erste Mal nach 6 h Dox-Zugabe schwach zu detektieren und steigt bis 48 h weiter an (A). Für die Linie tet-vIRF4 mt-BC-1 ist innerhalb der untersuchten Zeitreihe die höchste Expression der vIRF4 mt ebenfalls nach 48 h zu erkennen (B). Allerdings zeigt hier die optische Detektion schon nach sechs h eine deutliche Bande für vIRF4 mt, was in der Quantifizierung der Proteinmenge bestätigt wird (Spur 2, Blot B). Auch für die Zeitpunkte 12, 18 und 24 können für die Mutante (Spur 3, 4 und 5, Blot B) höhere Proteinmengen als für den Wildtyp (Spur 3, 4 und 5, Blot A) detektiert werden. Nach 48 h wiederum können für vIRF4 wt und vIRF4 mt in etwa gleich große Proteinmengen quantifiziert werden (Spur 6, Blot A und B).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Expression von vIRF4 wt und vIRF4 mt innerhalb von 48 h gleichmäßig zunimmt. Ein drastischer Unterschied zwischen den Proteinmengen von Mutante und Wildtyp ist nicht zu erkennen.

#### **4.5 Vergleich der subzellulären Lokalisation des vIRF4-Wildtyps und der vIRF4-Mutante**

Für vIRF4 ist beschrieben, dass das Protein sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden kann. Kanno und Kollegen konnten vIRF4 sowohl nach endogener Expression, wie auch nach Transfektion, vorwiegend im Kern nachweisen (Kanno et al. 2006; Sander et al. 2008). Im Hinblick auf weitere Versuche, in denen die vIRF4-Mutante eingesetzt werden soll, stellte sich die Frage, ob die Mutante eine vom Wildtyp abweichende subzelluläre Lokalisation zeigt und ob Mutante und Wildtyp in den verschiedenen Kompartimenten gleich stark exprimiert werden.

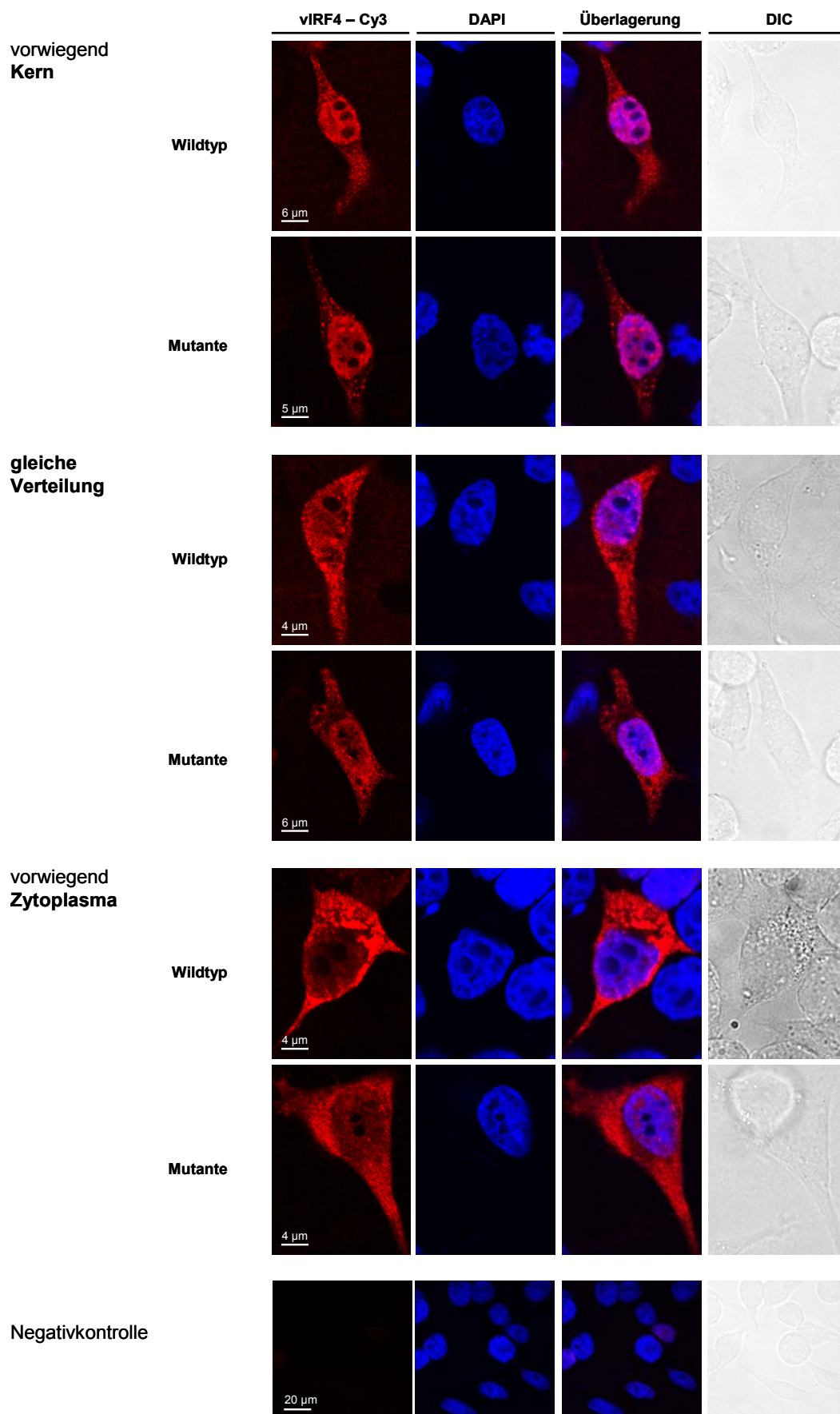
Zur Beantwortung dieser Frage führte ich zwei Experimente durch: Immunfluoreszenzfärbungen für eine Einzelzellanalyse im Konfokalmikroskop und eine Zellfraktionierung mit weiterer Analyse der Fraktionen im Westernblot.

#### 4.5.1 Einzelzellanalyse mit Hilfe der Konfokalmikroskopie

Um die subzelluläre Lokalisation von vIRF4 wt und vIRF4 mt innerhalb einer Zelle zu definieren, sollte die vIRF4-Verteilung in einer Vielzahl von Einzelzellen untersucht werden. Dazu wurden Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem vIRF4-spezifischen Antikörper unterzogen und eine Einzelzellanalyse mittels Konfokalmikroskopie durchgeführt. Im Gegensatz zu einem Lichtmikroskop wird hier das Anregungslicht in das Präparat hineinfokussiert und das reflektierte Licht durch das gleiche Objektiv auf einer Lochblende abgebildet. Anregungs- und Detektionsfokus liegen konfokal, also in einer Ebene. Das in diesem Versuch verwendete Konfokalmikroskop ist ein konfokales Laserscan-Mikroskop. Dabei rastert ein Laserstrahl in einer Fokusebene ein Objekt punktweise und maximal fokussiert ab. Dadurch kommt es zur Anregung von Fluoreszenzmolekülen, die sich im Lichtweg des fokussierten Laserstrahls befinden. Die Fluoreszenzsignale werden auf einer Bildebene abgebildet, in der sich eine Lochblende befindet. Hinter der Lochblende liegt ein lichtempfindlicher Detektor. Die dort einfallenden Signale werden mit Hilfe eines Computerprogramms punktweise zu einem vollständigen Bild zusammengesetzt. Nur Signale, die aus der Fokusebene kommen, fallen exakt in die Lochblende. Es wird daher nur eine Fokusebene abgebildet - eine so genannte Schichtaufnahme entsteht.

Die in der Literatur beschriebenen Experimente zur subzellulären Lokalisation von vIRF4 wurden nach Transfektion von HeLa-Zellen durchgeführt. HeLa-Zellen bieten im Vergleich zu B-Zellen den Vorteil, dass sich Kern und Zytoplasma bei diesen deutlich voneinander unterscheiden lassen. Dies erleichtert die Untersuchung im Konfokalmikroskop. Untersuchungen von Sander und Kollegen zur Lokalisation von vIRF4 zeigten außerdem, dass die subzelluläre Lokalisation von vIRF4 von seinem viralen Interaktionspartner abhängt (Sander et al., 2008). Um allein die Lokalisation von vIRF4 wt und vIRF4 mt ohne den Einfluss viraler Proteine vergleichen zu können, wurden auch meine Experimente in KSHV-negativen Zellen durchgeführt.

Zunächst folgte eine Transfektion von HeLa-Zellen mit 10 µg der Fusionsproteine HA-vIRF4 oder HA-vIRF4 mt bzw. mit dem Leervektor pHACR3. Nach Expression der Proteine, wurden die Zellen auf einem Objektträger fixiert und anschließend eine spezifische Antikörperfärbung gegen vIRF4 vorgenommen. Der Sekundärantikörper ist an das Fluorochrom Cy3 gekoppelt, wodurch eine Analyse im Laserscan-Konfokalmikroskop möglich wird. Zu diesem Zeitpunkt war nicht bekannt, an welches Epitop des vIRF4-Proteins der vIRF4-spezifische Antikörper bindet. Allerdings ist das Antigen, das zur Immunisierung verwendet wurde, nicht von den Mutationen betroffen. Deshalb sollte hinsichtlich der spezifischen Bindung des Antikörpers an vIRF4 wt und vIRF4 mt kein Unterschied bestehen. Abb. 4.13 zeigt das Ergebnis.



**Abb. 4.13: Einzelzellanalyse der subzellulären Lokalisation von vIRF4 wt und vIRF4 mt.**

Je 10 µg HA-vIRF4 wt und HA-vIRF4 mt wurden in HeLa-Zellen transfiziert, auf Deckgläschen kultiviert und mit 2 % PFA fixiert. Die Expression von vIRF4 bzw. vIRF4 mt kann auf Einzelzellebene im Konfokalmikroskop detektiert werden. Hierzu wurden die fixierten Zellen mit einem vIRF4-spezifischen Antikörper (vIRF-1B6) und sekundärem, Cy3-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die vIRF4 wt-Cy3 bzw. vIRF4 mt-Cy3 Färbung ist in rot dargestellt. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Der differentielle Interferenzkontrast wird als DIC bezeichnet. Der weiße Balken mit einer Länge von 5 µm dient der Größenabschätzung. Um die spezifische Bindung des vIRF4-Antikörpers zu überprüfen, wurden HeLa-Zellen mit dem Leervektor pHACR3 transfiziert und, wie oben beschrieben, weiter behandelt (Negativkontrolle).

Die Einzelzellanalyse ergab, dass für vIRF4 wt und vIRF4 mt zunächst kein Unterschied in der subzellulären Lokalisation besteht. Wildtyp und Mutante können sowohl im Kern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurden HeLa-Zellen mit dem Leervektor transfiziert und nach Fixierung der Zellen ebenfalls einer Antikörperfärbung unterzogen. Wie die Negativkontrolle zeigt, bindet der Antikörper nur spezifisch an vIRF4. Nach Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von vIRF4 von Kanno und Kollegen können insgesamt drei Zustände der vIRF4-Verteilung unterschieden werden: (i) Das vIRF4-Protein ist vorwiegend im Kern (30 %) oder (ii) vorwiegend im Zytoplasma (10 %) lokalisiert oder (iii) nahezu gleich auf beide Kompartimente verteilt (60 %) (Kanno et al., 2006). Alle drei Zustände sind auch in meinen Untersuchungen sowohl für den Wildtyp, als auch für die Mutante zu finden. Um die Häufigkeit der drei Zustände zu bestimmen, wurden Zellen mit HA-vIRF4 bzw. HA-vIRF4 mt transfiziert und deren Expression und Verteilung innerhalb der Zelle in je 110 Zellen mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Die Verteilung ist in Tab. 4.1 festgehalten und zeigt, dass vIRF4 wt in 58 % der Zellen vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist, in 31 % der Zellen kein Lokalisationsunterschied zwischen den Kompartimenten zu erkennen ist und in 11 % ist vIRF4 vorwiegend im Kern zu finden. Die vIRF4 mt hingegen, zeigt in 46 % der Zellen keine spezifische Lokalisation für Kern oder Zytoplasma und ist in beiden Kompartimenten gleich verteilt. Der Anteil der Zellen, in denen sich vIRF4 mt vorwiegend im Zytoplasma findet, entspricht mit 29 % in etwa dem Anteil an Zellen mit vorwiegender Kern-Lokalisation von 25 %. Eine strikte Lokalisation in nur einem der Kompartimente war weder für den Wildtyp noch für die Mutante zu beobachten. Die Mutante zeigt eine vom Wildtyp abweichende Häufigkeit der Lokalisation. Jedoch kann mit der Einzelzellanalyse sichergestellt werden, dass die Mutante auch im Kern lokalisiert ist. Vermutlich beruht der Unterschied zwischen den von mir ermittelten Daten und denen der Arbeitsgruppe Katano auf experimentellen Randbedingungen, wie z.B. der Auswahl der transfizierten Zelllinie, dem Expressionsniveau oder Ähnlichem. Es bleibt festzuhalten, dass eine quantitative Einschätzung mit dieser Methode kaum möglich ist, da die Unterschiede zwischen den drei Zuständen zu gering sind.



Zellzahl %		
Subzelluläre Lokalisation	Wildtyp	Mutante
vorwiegend Kern	11	25
vorwiegend Zytoplasma	58	29
in beiden Kompartimenten gleich verteilt	31	46

**Tab. 4.1: Vergleich der subzellulären Lokalisation von vIRF4 wt und vIRF4 mt innerhalb einer Zellpopulation.**

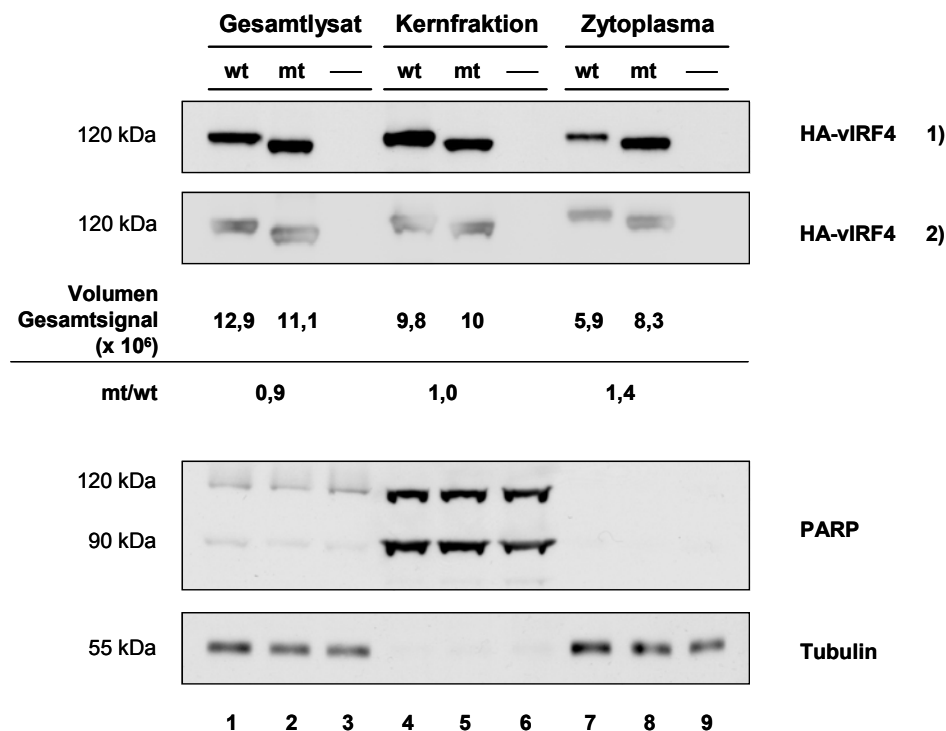
Für je 110 Zellen wurde die subzelluläre Verteilung von vIRF4-Wildtyp und vIRF4-Mutante bestimmt. Die prozentuale Verteilung ist in dieser Tabelle wiedergegeben. Dafür wurden je 10 µg HA-vIRF4 wt und HA-vIRF4 mt in HeLa-Zellen transfiziert, auf Deckgläschen kultiviert und mit 2 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem spezifischen vIRF4 Antikörper (vIRF-1B6) und sekundärem, Cy3-gekoppelten Antikörper inkubiert und die Expression von vIRF4 wt bzw. vIRF4 mt auf Einzelzellebene im Konfokalmikroskop detektiert.

#### 4.5.2 Zellfraktionierung zur Quantifizierung des Expressionslevels

Eine Quantifizierung der Proteinmengen von vIRF4 wt und mt erwies sich in der Einzelzellanalyse als schwierig. Im nächsten Schritt wurde deshalb eine Zellfraktionierung durchgeführt. Dafür wurden HeLa-Zellen mit 10 µg der Fusionsproteine HA-vIRF4 oder HA-vIRF4 mt oder dem Leervektor pHACR3 transfiziert, Zellfraktionen hergestellt und die Kern- und Zytoplasmafraktionen bzw. Gesamtzelllysate im Westernblot analysiert. Gleichzeitig erfolgte eine quantitative Bestimmung der Proteinmengen in den einzelnen Fraktionen durch Detektion und Auswertung der Chemilumineszenzreaktion im System „Fusion FX7“. Um zu kontrollieren, ob saubere Zellfraktionen hergestellt wurden, erfolgte die Detektion spezifischer Markerproteine der verschiedenen Fraktionen. Dabei wurde PARP als Markerprotein für die Kernfraktion und Tubulin als Markerprotein für die Zytoplasmafraktion herangezogen. Die Detektion von HA-vIRF4 im Westernblot erfolgte über einen HA-spezifischen Antikörper. Das Ergebnis ist in Abb. 4.14 dargestellt. Unter HA-vIRF4 1) ist die Detektion von HA-vIRF4 auf einem Chemilumineszenz-sensitiven Film dargestellt und HA-vIRF4 2) zeigt die elektronische Bildaufnahme der Westernblotmembran im „Fusion“-Gerät, welches für die Quantifizierung herangezogen wurde.

Wie erwartet, kann sowohl der Wildtyp, als auch die Mutante im Gesamtlysate und in den einzelnen Fraktionen nachgewiesen werden. Auf den ersten Blick besteht zwischen vIRF4 wt und vIRF4 mt im Proteingehalt kein Unterschied hinsichtlich des Gesamtzelllysats und der Kernfraktion. Lediglich in der Zytoplasmafraktion scheint die Bande des Wildtyps schwächer zu sein als die der Mutante. Da eine Einschätzung der Bandenintensität per Auge sehr schwierig ist, wurden die Proteinmengen im System „Fusion FX7“ quantifiziert (Erklärung siehe 4.4.2). Auffallend ist, dass die Qualität zwischen der elektronischen Bildaufnahme und der Film-Detektion in diesem Versuch stark variiert, weshalb in der Abbildung beide

Aufnahmen dargestellt sind. Sowohl für die Detektion mit dem „Fusion“-Gerät, als auch für die Filmdetektion wurde dieselbe Westernblotmembran herangezogen. Vorhergehende Versuche zeigten solche Schwierigkeiten nicht. Die relativen Proteinmengen sind als Volumen des Gesamtsignals (Integral über einer vorgegebenen Fläche) wiedergegeben. Daraus wurde in den einzelnen Fraktionen auch das Verhältnis von Mutante zu Wildtyp berechnet. Für das Gesamtlysate ergibt sich so ein 0,9-facher Expressionsunterschied (Spur 1 und 2), was bedeutet, dass sich die Expression zwischen Wildtyp und Mutante kaum unterscheidet. Ebenso lassen sich in der Kernfraktion mit dem Faktor 1 gleichgroße Proteinmengen von Wildtyp und Mutante messen (Spur 4 und 5). Dies ist verwunderlich, da in der Film-Detektion (HA-vIRF4 1) die Expression des Wildtyps stärker erscheint als die Expression der Mutante. Betrachtet man die Proteinbanden in der elektronischen Bildaufnahme des „Fusion“ genauer, so hat es den Anschein, dass das für die Chemilumineszenzreaktion notwendige Substrat hier nicht gleichmäßig verteilt war, was der Schatten an der Bande des Wildtyps vermuten lässt (HA-vIRF4 2) Spur 4). Demnach kann es sein, dass das Gerät hier nicht das volle Signal detektieren konnte. Es ist daher möglich, dass die Expression des Wildtyps in der Kernfraktion minimal höher liegt. In der Zytoplasmafraktion besteht zwischen Mutante und Wildtyp ein 1,4-facher Unterschied und es lässt sich hier mehr Protein von der Mutante detektieren (Spur 7 und 8). Das wiederum spricht dafür, dass in der Kernfraktion mehr Protein von vIRF4 wt als von vIRF4 mt vorliegt und das Verhältnis von Wildtyp und Mutante im Kern nicht 1 ist. Die einzelnen Fraktionen zeigen keine Verunreinigung im Westernblot mit PARP und Tubulin. Die Doppelbande von PARP lässt sich durch die proteolytische Spaltung von PARP durch Caspase-3 erklären, welche während der Apoptose auftritt. Grund hierfür kann Zellstress durch die Transfektion oder eine zu hohe Zelldichte nach Transfektion der Zellen sein. Das Ergebnis zeigt, dass für die Gesamtexpression von Wildtyp und Mutante kein Unterschied besteht und Wildtyp und Mutante sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma lokalisiert sind. Möglicherweise ist die Verteilung innerhalb der Zelle verschieden und der Proteinanteil von vIRF4-Wildtyp ist im Kern minimal höher als der von der Mutante. Dies muss bei späteren Versuchen bezüglich der CBF1-abhängigen Regulation von Zielgenen mit Hilfe der Mutante berücksichtigt werden.



**Abb. 4.14: Zellfraktionierung zur subzellulären Lokalisation von vIRF4 wt und vIRF4 mt.**

Je 10 µg HA-vIRF4 wt und HA-vIRF4 mt bzw. Leervektor (—) wurden in HeLa-Zellen transfiziert und Zellfraktionen hergestellt. Zur Detektion von vIRF4 und PARP wurden je 20 µg und von Tubulin 5 µg des Gesamtlysats sowie der Kern- und Zytoplasmafraktion geladen und diese auf einem 8%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der vIRF4-Nachweis im Westernblot erfolgte mit einem Antikörper gegen HA. PARP diente zum Nachweis der Kernfraktion, Tubulin zum Nachweis der Zytoplasmafraktion. Unter 1) ist die Detektion von HA-vIRF4 mit einem Chemilumineszenz-sensitiven Film und unter 2) die Detektion von HA-vIRF4 durch elektronische Bildaufnahme im System „Fusion FX7“ dargestellt. In demselben System erfolgte die Quantifizierung der Proteinmengen, welche hier als Volumen (das Integral über einer vorgegebenen Fläche) wiedergegeben wird. Zusätzlich sind die vIRF4-Proteingehalte der jeweiligen Fraktionen als x-faches Verhältnis von Mutante (mt) zu Wildtyp (wt) dargestellt.

#### 4.6 Genomweite Identifizierung zellulärer Zielgene des vIRF4

Bis zu Beginn meiner Arbeit waren keine zellulären Zielgene von vIRF4 bekannt. Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollten erstmals genomweit zelluläre Zielgene von vIRF4 identifiziert werden. Für die Genexpressionsanalyse in An- und Abwesenheit von vIRF4 wurde die konditionale Zelllinie tet-vIRF4-BC-1 verwendet. Auch wenn BC-1-Zellen latent mit KSHV infiziert sind, habe ich mich entschieden, das Genexpressionsprofil nicht nach endogener Expression von vIRF4 im lytischen Zustand zu untersuchen. Der Grund hierfür ist, dass für die lytische Phase von KSHV ein *host shut-off* publiziert ist, in dem es zu einer Transkriptabnahme verschiedener zellulärer Gene kommt (Covarrubias et al., 2009; Glausinger and Ganem, 2006). Unter solchen Bedingungen gestaltet es sich als schwierig, einen transkriptregulatorischen vIRF4-Effekt klar zu definieren, weshalb die vIRF4-Expression in meinem Versuch doxycyclinabhängig induziert wurde. Für die

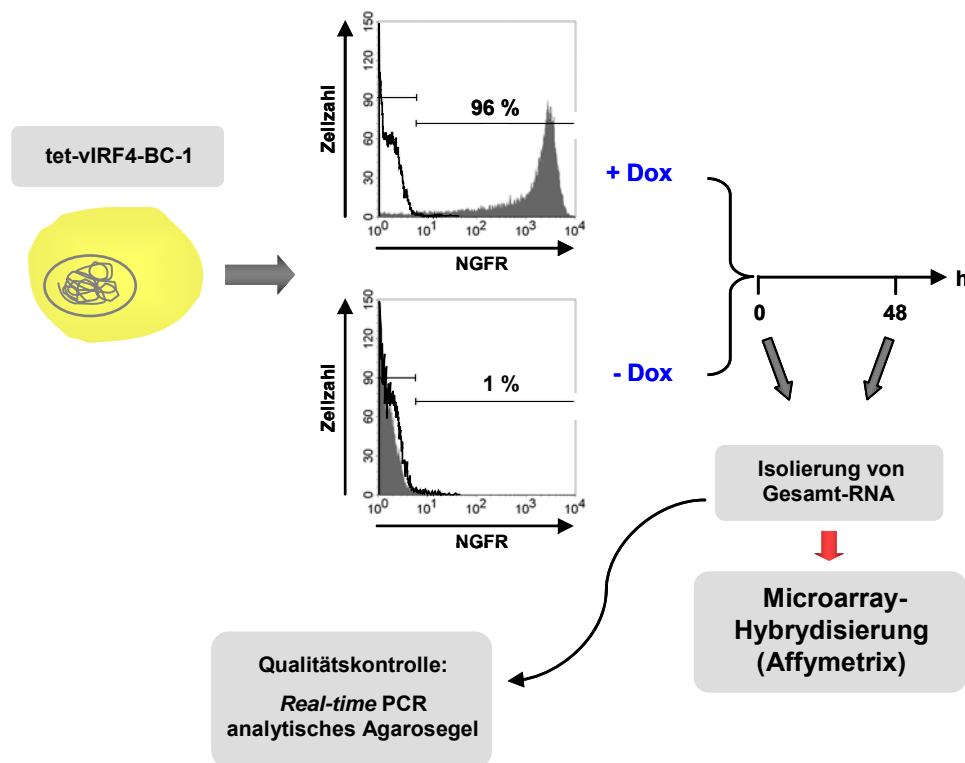
Genexpressionsanalyse wurden Microarrays der Firma Affymetrix mit Gesamt-RNA (GeRNA) und nascenter RNA (NaRNA) hybridisiert. Die Versuche und Ergebnisse werden auf den folgenden Seiten detailliert beschrieben.

#### 4.6.1 Durchführung von Genexpressionsarrays unter Verwendung von Gesamt-RNA

Zur Identifizierung von vIRF4-Zielgenen wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Reinhard Hoffman ein Microarray-Screen der Firma Affymetrix („Affymetrix-Screen“) mit der oben beschriebenen Zelllinie tet-vIRF4-BC-1 durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist unter Abb. 4.15 erklärt.

Für die Analyse der Genexpression wurden die Zellen auf eine Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Dox induziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für jede Bedingung in Duplikaten. Die Zahl der induzierten Zellen wurde vor Beginn des Versuchs durch Nachweis des NGFR im FACS untersucht. Zum Zeitpunkt 0 und nach 48 h wurden die Zellen geerntet und daraus Gesamt-RNA isoliert. Um beurteilen zu können, ob eine differentielle Genexpression ursächlich auf vIRF4 zurückzuführen ist und nicht durch zelluläre Veränderungen aufgrund der Zelldichte entsteht, wurden parallel auch Zellen ohne Dox-Induktion für weitere 48 h kultiviert und geerntet. Um sicher zu stellen, dass die Qualität der RNA-Proben in Ordnung ist, wurde die isolierte RNA für jeden Zustand in einer analytischen Gelelektrophorese auf Degradation hin untersucht. Darüberhinaus wurde ein Teil der RNA in cDNA umgeschrieben und in einer *Real-time* PCR mit spezifischen Primern die Expression von vIRF4 und dem NGFR untersucht. Die Transkriptwerte wurden auf die Abundanz der 18S rRNA normalisiert und bestätigten die Induktion der Zellen ohne weitere Auffälligkeiten. Zusätzlich wurde die Stabilität des Cp-Werts (*Crossing point*) der beiden Haushaltsgene 18S rRNA und GAPDH über 48 h beobachtet. Auch hier konnten keine kritischen Schwankungen festgestellt werden. Eine Zusammenfassung der Qualitätskontrollen ist in Abb. 4.16 dargestellt. Für den Affymetrix-Screen wurde in der Arbeitsgruppe Hoffmann die RNA zunächst revers in cDNA umgeschrieben und zu dsDNA synthetisiert. Anschließend folgte eine *in vitro* Transkription in cRNA. Komplementär zu der cRNA Sequenz folgte die Synthese von ssDNA (engl. single strand DNA, Einzelstrang-DNA) bei gleichzeitigem Einbau von Thio-UTP. Nach Abbau des RNA-Strangs wurde die ssDNA fragmentiert, mit Biotin markiert und dann auf einen Microarray hybridisiert. An die Sonden der Arrays gebundene ssDNA wurde mit Streptavidin-Phycoerythrin Konjugaten detektiert und die Fluoreszenzintensität mit einem Array-Scanner gemessen. Die Hybridisierung von Sonde und ssDNA führt zu DNA-DNA Duplexen, die nach Angaben der Firma Affymetrix im Gegensatz zu RNA-DNA Duplexen spezifischer sind. Je mehr zelluläres Transkript in den Proben enthalten ist, desto stärker bindet dieses an die Sonden auf dem Array und desto stärker ist das Fluoreszenzsignal. Durch Abgleich der Signalstärken von Proben vor vIRF4-

Expression mit denen nach vIRF4-Expression, können differentiell regulierte Gene identifiziert werden.

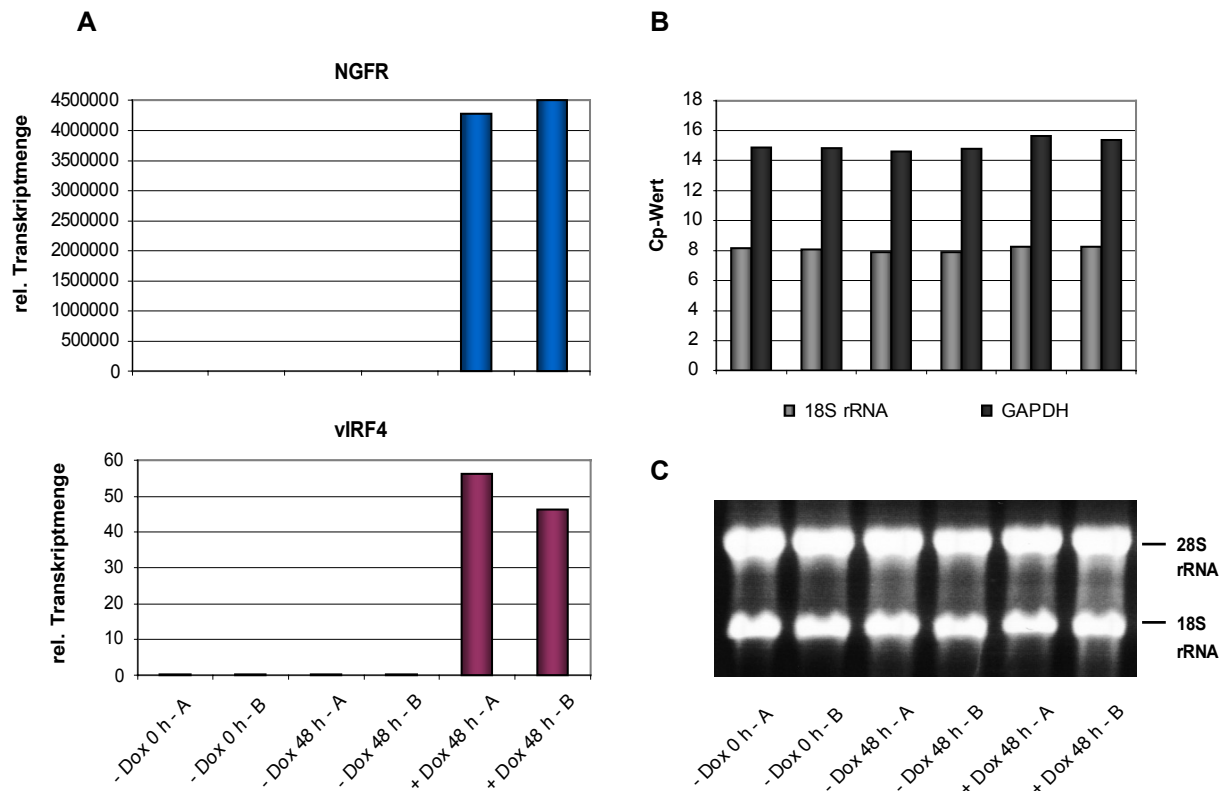


**Abb. 4.15: Schematischer Versuchsaufbau zur Identifizierung differentiell regulierter Gene.**

Die konditionale Zelllinie tet-vIRF4-BC1 wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn auf die Induktion der vIRF4-Expression indirekt, anhand der NGFR-Expression, im FACS untersucht und der Anteil NGFR-positiver Zellen bestimmt. Für den Versuch wurden die Zellen anschließend für 0 und 48 h ohne Dox, sowie 48 h mit Dox (1 µg/ml) in Duplikaten kultiviert, zum entsprechenden Zeitpunkt geerntet und jeweils die Gesamt-RNA isoliert. Bevor diese im Affymetrix-Screen eingesetzt wurde, folgte zunächst eine Qualitätskontrolle der Proben. Die RNA wurde in einem analytischen Agarosegel auf Degradation untersucht. Zusätzlich wurde ein Teil der RNA revers in cDNA transkribiert und für alle Proben in einer *Real-time* PCR mit spezifischen Primern die Transkriptmenge von GAPDH, vIRF4 und des NGFR bestimmt. Da keine Schwankungen oder Auffälligkeiten zu erkennen waren, wurden die Proben für die Hybridisierung der Affymetrix-Microarrays Human Gene ST 1.0 eingesetzt.

Die Analyse wurde mit dem Affymetrix-Array Human Gene ST 1.0 durchgeführt. Mit dem Array können 28.869 annotierte Gene, 19.734 davon mit voller Transkriptinformation, mit 764.885 Sonden (engl. *probes*, Oligonukleotiden) abgefragt werden. Jedes Gen wird durch ein *Probeset* repräsentiert, welches wiederum im Schnitt aus 26 Sonden, d.h. Oligonukleotide besteht. Die Sonden sind sogenannte *perfect match* (PM-) Oligonukleotide, d.h. sie sind zu einem spezifischen Transkript komplementär. Nach Angaben der Firma Affymetrix verteilen sich die Oligonukleotide über die gesamte Länge des Gens und fragen so verschiedene Exons des Gens ab. Die Daten wurden nach der RMA-Methode normalisiert, um Unterschiede in der Signalstärke zu korrigieren, welche durch Probenmarkierung oder Hybridisierungseffekte entstehen. Die normalisierten

Expressionswerte aller *Probesets* sind im Anhang in Form einer Exceltabelle auf CD-ROM hinterlegt.



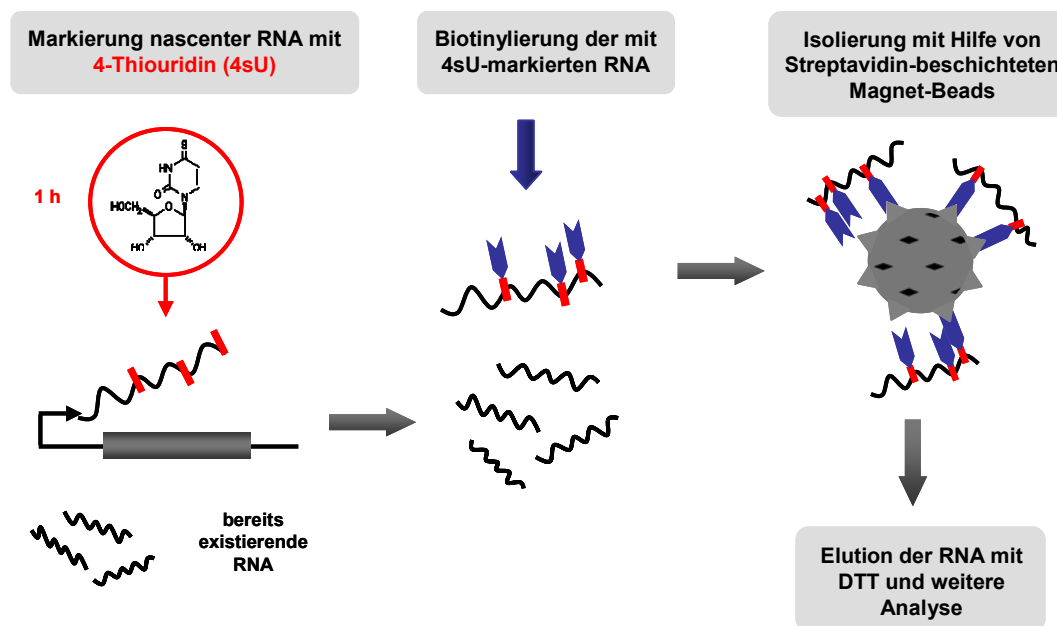
**Abb. 4.16: Zusammenfassung der Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA-Proben.**

Ein Teil jeder RNA-Probe wurde revers in cDNA transkribiert und in einer *Real-time* PCR mit spezifischen Primern die Transkriptmenge von vIRF4 und des NGFR (A) bestimmt. Die Transkriptwerte wurden auf die Abundanz der 18S rRNA normalisiert. Zusätzlich angegeben für jede Probe ist der Cp-Wert (*Crossing point*) der 18S rRNA und von GAPDH. Der Cp-Wert gibt das Maximum der zweiten Ableitung der während der Amplifikation aufgezeichneten Fluoreszenzkurve wieder. Die Cp-Werte zeigten für alle Proben keine kritischen Schwankungen (B). Die RNA wurde in einem analytischen Agarosegel auf Degradation untersucht (C). Die Probenmarkierung A und B sind bezeichnend für die Doppelwerte, die zu jedem Zeitpunkt und jeder Kulturbedingung erstellt wurden.

#### 4.6.2 Genexpressionsanalyse unter Verwendung nascenter RNA

Die Transkriptmenge in einer Zelle hängt von Synthese und Abbauraten der RNA ab. Eine Microarrayanalyse von Gesamt-RNA kann Unterschiede in der Transkriptmenge aufzeigen. Dabei kann jedoch nicht unterschieden werden, welche Prozesse für diese Unterschiede verantwortlich sind, d.h. ob die Veränderungen aus steigender RNA-Synthese oder -Zerfall resultieren. Bei langer Halbwertszeit der mRNA kann sich die Repression eines Gens unter Umständen erst nach langer Zeit in der Abnahme seines Transkriptlevels bemerkbar machen (Dölken et al., 2008). Umgekehrt kann die Induktion eines Gens, d.h. die Induktion der

Transkription für ein seltenes Gen erst nach längerer Zeit einen deutlichen Unterschied in der Transkriptmenge zeigen. Das hängt von der Balance von Synthese und Zerfallsrate ab.

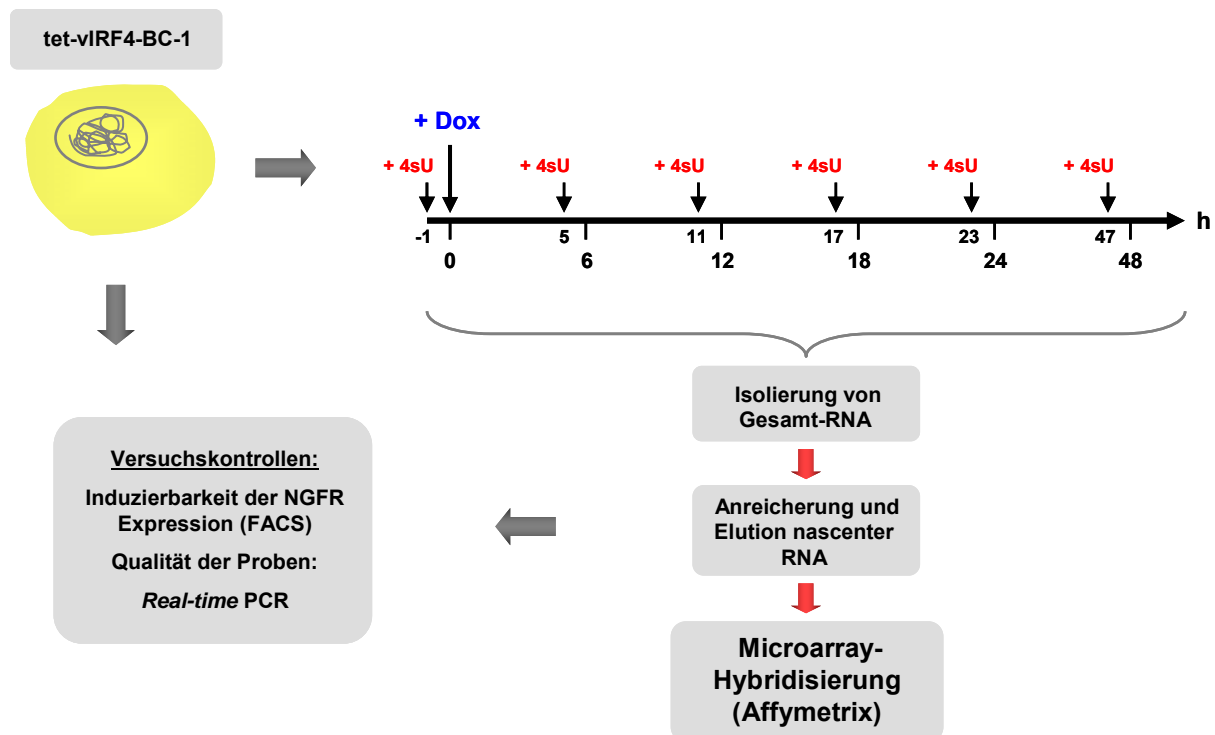


**Abb. 4.17: Schematische Darstellung zur Anreicherung nascenter RNA durch 4sU-Markierung.**

Durch Zugabe von 4-Thiouridin (4sU) ins Zellkulturmedium und einstündige Kultivierung der Zellen wurde die neu synthetisierte RNA mit 4sU markiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA präpariert. Die 4sU-markierte RNA wurde Thiol-spezifisch biotinyliert. Mit dem verwendeten EZ-Link Biotin-HPDP wird dabei eine Disulfidbrücke ausgebildet, die durch reduzierende Agenzien wie DTT wieder gespalten werden kann. Mit Hilfe Streptavidin-beschichteter Beads wurde die biotinylierte, 4sU-markierte RNA von der bereits vor Induktion vorhandenen, nicht markierten RNA abgetrennt. Die 4sU-markierte RNA wurde durch DTT von den Beads eluiert und konnte für die Analyse im Affymetrix-Screen eingesetzt werden. (Abb. modifiziert nach Dissertation, Marie Hertle)

Es besteht experimentell die Möglichkeit nur das Transkriptlevel *de novo*-synthetisierter RNA zellulärer Zielgene zu untersuchen, um gezielt nach Induktion und reprimierenden Effekten suchen zu können. Durch den Einbau von 4-Thiouridin (4sU) in neu synthetisierte RNA kann im Anschluss durch eine Thiol vermittelte Isolierung die nascente RNA angereichert (siehe Abb. 4.17) und zur Quantifizierung in weitere Analysen eingesetzt werden (Melvin et al., 1978; Woodford et al., 1988; Cleary et al., 2005; Kenzelmann et al., 2007; Dölken et al., 2008). Gerade für die Suche nach vIRF4-regulierten Zielgenen ist das von besonderem Interesse. Denn wie in der Einleitung erwähnt, ist für vIRF4 die Interaktion mit dem Poly-A Bindeprotein (PABP) und deren Lokalisation im Kern beschrieben (Kanno et al., 2006). Das PABP übernimmt in der Zelle verschiedene Funktionen und stabilisiert unter anderem mRNA. Deshalb wurde von Kanno und Kollegen postuliert, dass vIRF4 möglicherweise die Stabilität von mRNA beeinflusst (Kanno et al., 2006). Weitere Untersuchungen dazu liegen bislang nicht vor. Um eindeutig transkriptregulatorische Effekte des vIRF4 zu untersuchen, wurde deshalb parallel zu der unter 4.6.1 beschriebenen Genexpressionsanalyse mit

Gesamt-RNA zusätzlich ein Microarray-Screen der Firma Affymetrix zur Genexpressionsanalyse nascenter RNA durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 4.18 näher erläutert. Um abzuklären, ob vIRF4 ein bestimmtes zeitliches Fenster zur Regulation seiner Zielgene nutzt, wird das Genexpressionsmuster zusätzlich in einer Zeitreihe von 48 h untersucht.



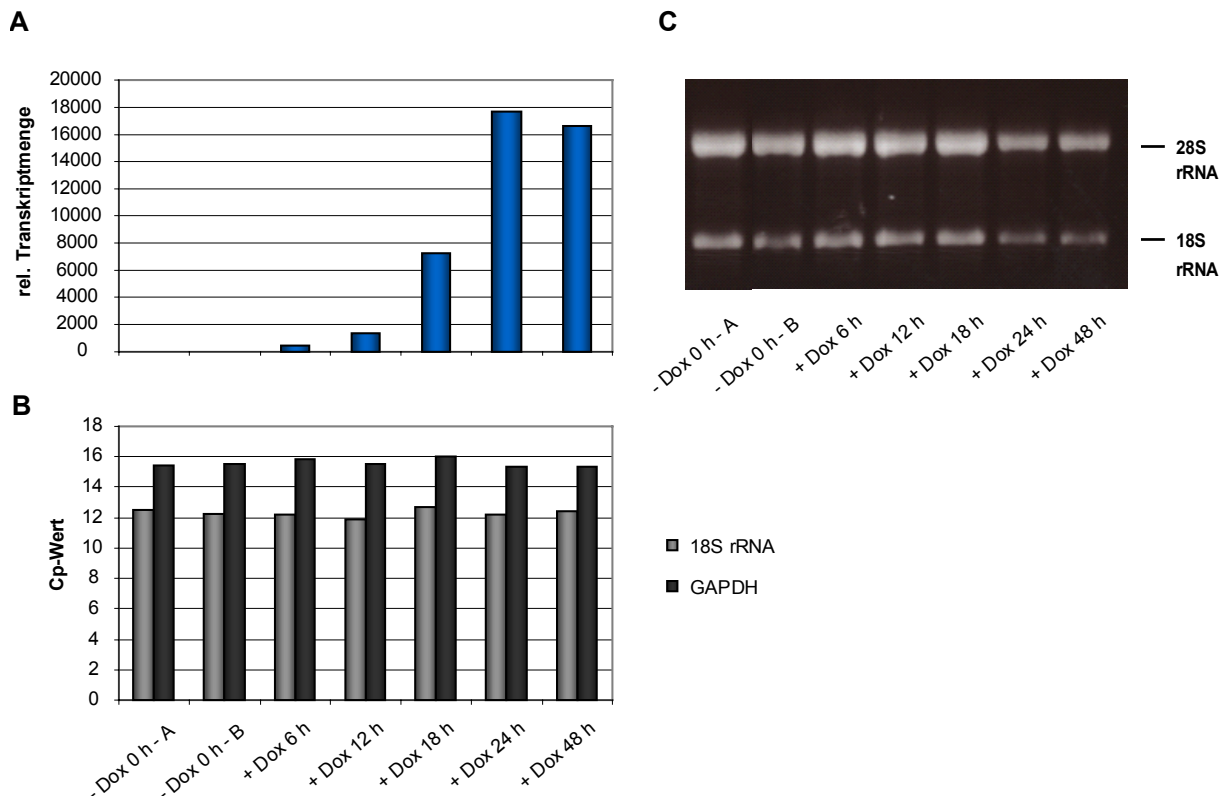
**Abb. 4.18: Schematischer Versuchsaufbau zur Identifizierung differenziell regulierter Gene durch vIRF4 unter Verwendung nascenter RNA.**

Die konditionale Zelllinie tet-vIRF4-BC-1 wurde in Unikaten für eine Zeitdauer von 0, 6, 12, 18, 24 und 48 h mit 1 µg/ml Dox kultiviert. Jeweils 1 h vor Ernte der Zellen wurde 4sU zur Markierung der nascenter RNA zugegeben. Nach Isolierung der Gesamt-RNA konnte daraus, wie in Abb. 4.17 beschrieben, neu transkribierte RNA angereichert und eluiert werden. Die Induktion der vIRF4-Expression wurde indirekt anhand der NGFR-Expression im FACS kontrolliert und der Anteil NGFR-positiver Zellen bestimmt. Außerdem wurde zur Überprüfung der Probenqualität ein Teil der angereicherten RNA revers in cDNA transkribiert und in einer Real-time PCR mit spezifischen Primern die Transkriptmenge von GAPDH bestimmt. Da zwischen den Proben keine Schwankungen oder Abweichungen zu erkennen waren, wurden sie für die weitere Hybridisierung der Affymetrix-Microarrays Human Gene ST 1.0 eingesetzt.

Dazu wurde in der Zelllinie tet-vIRF4-BC-1 die Expression von vIRF4 mit 1 µg/ml Dox induziert und die Zellen nach 0, 6, 12, 18, 24 und 48 h geerntet. Die 4sU-Markierung und Isolierung der nascenter RNA wurde anhand des optimierten Protokolls von Herrn Dr. Lars Dölken (Max von Pettenkofer Institut, LMU, München) durchgeführt. Jeweils eine Stunde vor Ernte der Zellen erfolgte durch Zugabe von 100 µm 4sU ins Zellkulturmedium die Markierung der neu synthetisierten RNA. Nach Ernte der Zellen und Präparation der RNA konnten wiederum aus 60 µg Gesamt-RNA die neu synthetisierte markierte RNA und die bereits vor



Induktion vorhandene nicht-markierte RNA separat isoliert werden. Die nascente RNA wurde ebenfalls einer Qualitätskontrolle unterzogen (siehe Abb. 4.19) und konnte dann in die Microarrayanalyse eingesetzt werden. Dafür folgte im Anschluss die weitere Aufarbeitung der RNA-Proben, wie unter 4.6.1 beschrieben, und letztlich die Hybridisierung auf den Affymetrix-Array Human Gene ST 1.0. Der Affymetrix-Screen wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Dietmar Martin (Genzentrum, LMU München) durchgeführt. Die normalisierten Expressionswerte sind im Anhang in Form einer Exceltabelle auf CD-ROM hinterlegt.



**Abb. 4.19: Zusammenfassung der Qualitätskontrolle von Proben nascenter RNA.**

Nach Isolierung der nascenten RNA wurde von jeder RNA-Probe ein Teil abgenommen und revers in cDNA transkribiert und in einer *Real-time* PCR mit spezifischen Primern die Transkriptmenge des NGFR bestimmt (A). Die Transkriptwerte wurden auf 18S rRNA normalisiert. Zusätzlich angegeben für jede Probe ist der Cp-Wert (*Crossing point*) der 18S rRNA und von GAPDH (B). Vor Isolierung der nascenten RNA wurde die Gesamt-RNA in einem analytischen Agarosegel auf Degradation untersucht (C).

### 4.6.3 Ergebnis der Zielgensuche

Zur leichteren Unterscheidung beider durchgeführter Affymetrix-Screens wird im Folgenden der mit Gesamt-RNA als „GeRNA-Screen“ und die Zeitreihe mit nascenter RNA als „NaRNA-Screen“ bezeichnet.

Im GeRNA-Screen wurde das Genexpressionsprofil der Zelle nach 48 h vIRF4-Expression untersucht. Dafür wurde Gesamt-RNA analysiert. Um zu berücksichtigen, dass Effekte im

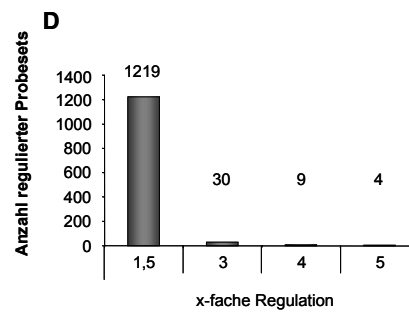
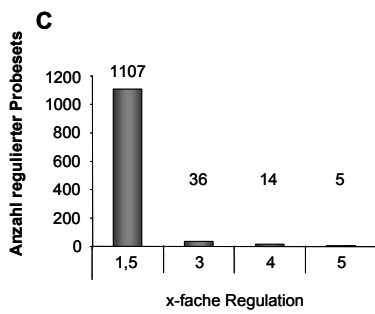
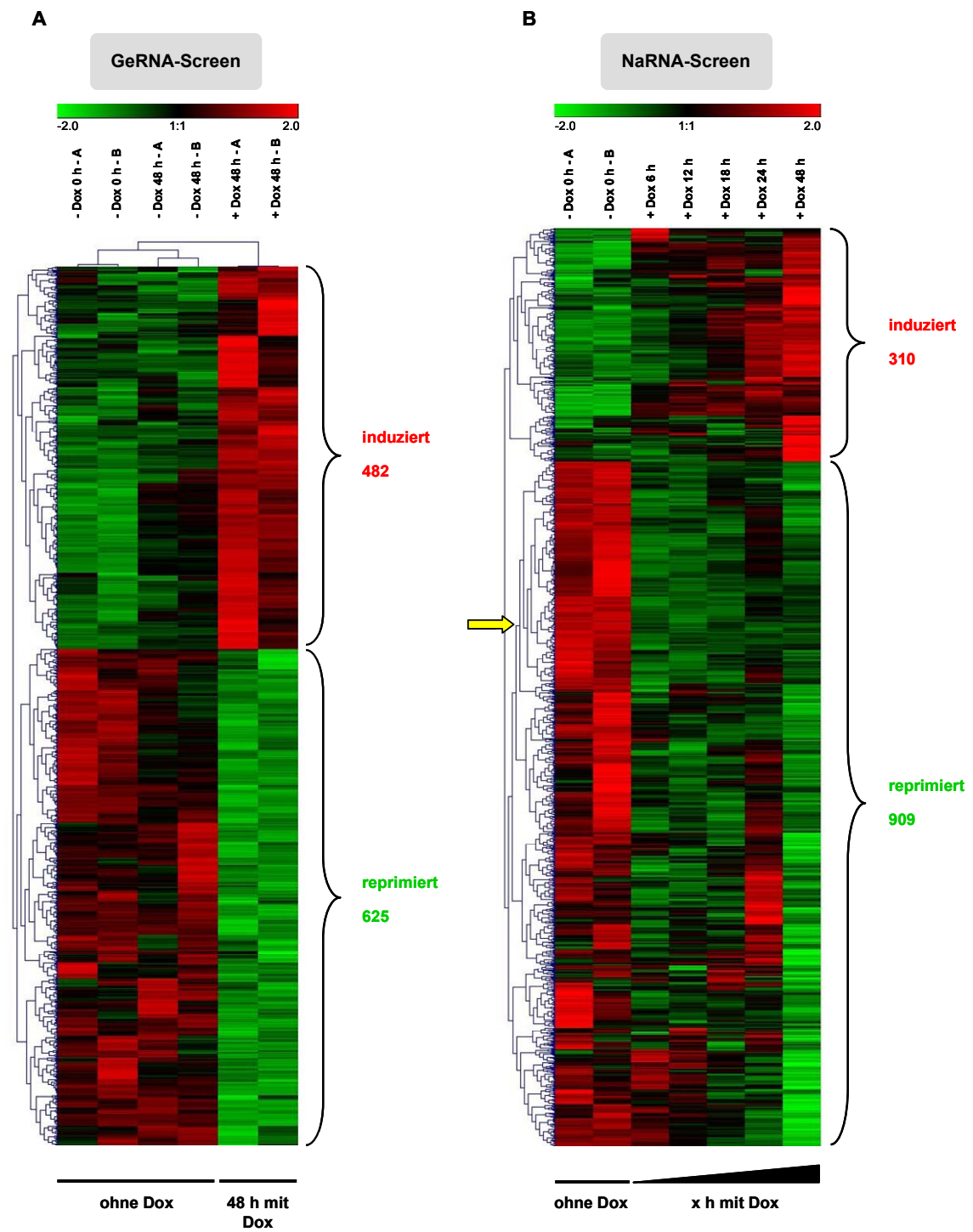
Genexpressionsmuster auch durch längere Kultivierung der Zellen entstehen können, wurde als Referenz zur vIRF4-regulierten Expression nicht nur der Zustand der Zellen zum Zeitpunkt 0, sondern auch nach 48 h ohne vIRF4-Expression miteinbezogen. Aus den Einzelwerten zum Zeitpunkt 0 und nach 48 h ohne Dox-Induktion (- 48 Dox) wurde der Mittelwert gebildet und dieser gegen den Mittelwert nach 48 h Dox-Induktion (+ 48 Dox) verrechnet. Damit konnte sichergestellt werden, dass nur Gene in Betracht kommen, die auch nach längerer Kultivierung eindeutig vIRF4-reguliert sind. Für die Ermittlung differentiell regulierter Gene wurde festgesetzt, dass sich die Mittelwerte der Expressionswerte eines *Probesets* zwischen den beiden Gruppen (ohne Dox vs. mit Dox) mindestens 1,5-fach auf einem Signifikanzniveau kleiner 5 % ( $p < 0,05$ ) unterscheiden müssen. Die Grenze wurde deshalb bei 1,5 gesetzt, da biologische Prozesse oftmals schon durch geringe Expressionsunterschiede beeinflusst werden. Unter diesen Bedingungen wurden 1107 *Probesets* differentiell reguliert, wovon 738 *Probesets* eine Annotation zugewiesen werden konnte. In einem *unsupervised hierarchical clustering* mit den Expressionswerten der 1107 *Probesets* wurden die Arrays in zwei Hauptcluster gruppiert – ohne Dox- und mit Dox-Behandlung, d.h. ohne und mit vIRF4-Expression. Die Gruppe ohne Dox konnte wiederum in die zwei Cluster, 0 h und 48 h kultiviert, unterteilt werden. Die *Probesets* wurden in zwei Hauptcluster separiert, die 625 vIRF4-reprimierte und 482 vIRF4-induzierte *Probesets* enthielten (Abb. 4.20 A). Die Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Marie Hertle vorgenommen.

Der NaRNA-Screen spiegelt das Genexpressionsmuster nascenter RNA wieder. Auftretende Effekte sind hier auf eine transkriptregulatorische Ursache zurückzuführen, und nicht etwa auf Transkriptstabilität, sofern die Halbwertszeit der RNA mehr als eine Stunde beträgt. Aufgrund der Zeitreihenanalyse kann außerdem eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Regulation getroffen werden. Eine differentielle Regulation war gegeben, wenn der Mittelwert der Nullwerte, im Vergleich zum 48 h Einzelwert nach Dox-Behandlung (+ 48 Dox) der verschiedenen *Probesets*, einen mindestens 1,5-fachen Unterschied betrug. Der Bezug von 0 zu + 48 Dox der Zeitreihe, ermöglicht den direkten Vergleich beider Screens. Im Gegensatz zum GeRNA-Screen war jedoch in der Zeitreihenanalyse des NaRNA-Screens, aufgrund der Verwendung von Unikaten des jeweiligen Zeitpunkts, eine statistische Bewertung der Ergebnisse nicht möglich. Unter diesen Bedingungen wurden 1219 *Probesets* reguliert, wovon 407 *Probesets* eine Annotation zugewiesen werden konnte. In einem *unsupervised hierarchical clustering* mit den Expressionswerten der *Probesets* der Zeitreihe, konnten die 1219 *Probesets* in zwei Hauptcluster unterteilt werden, die 909 vIRF4-reprimierte und 310 vIRF4-induzierte Gene enthalten. Die geclusterten Expressionswerte der 1,5-fach regulierten *Probesets* sind in einem Rot/Grün-Bild dargestellt (Abb. 4.20 B). Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Regulation, so scheinen die induzierten Gene

kontinuierlich reguliert zu werden, wobei eine deutliche Induktion erst gegen Ende der Zeitreihe nach 24 bis 48 h ersichtlich ist. Für den Großteil der reprimierten Gene scheint die Repression zu einem frühen Zeitpunkt, nach bereits 6 h, abrupt zu erfolgen, wohingegen nur ein kleiner Teil sukzessiv reguliert wird. Allerdings zeigen sich unter den reprimierten Genen auch mehr Schwankungen. So war für einige *Probesets* innerhalb der Zeitreihe ein stetiger Wechsel von Repression und Induktion zu beobachten. Auch waren in diesen *Probesets* vermehrt Expressionsunterschiede zwischen den Einzelwerten zum Zeitpunkt Null zu erkennen.

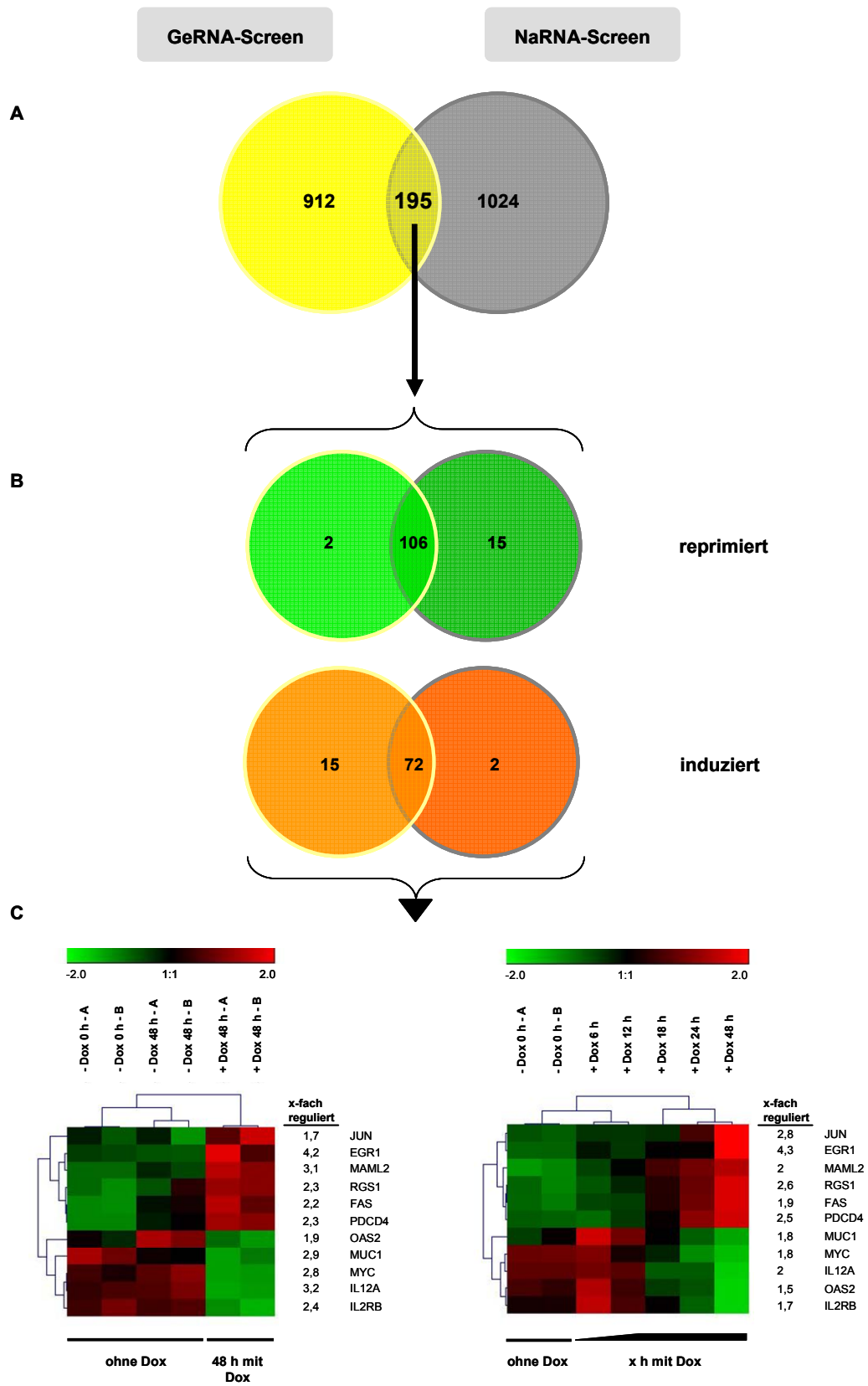
**Abb. 4.20 (Folgende Seite): Darstellung vIRF4 differentiell regulierter Gene im Clusterbaum.**

Für jedes *Probeset* wurden die Expressionswerte des GeRNA-Screens (A) und des NaRNA-Screens (B) mit der Software *Genesis* auf eine Skala von -2 bis +2 normalisiert. Das *unsupervised hierarchical clustering* erfolgte unter Verwendung der Pearson Korrelation als Distanzmaß und des agglomerativen *complete linkage* Algorithmus. Horizontale Reihen repräsentieren die Expressionsdaten aller Gruppen (ohne und mit Dox) für ein bestimmtes *Probeset*. Vertikale Spalten repräsentieren die Expressionsdaten der *Probesets* innerhalb einer Gruppe (ohne bzw. mit Dox). Hohe Expressionswerte sind rot, mittlere schwarz und niedrige grün dargestellt. Der Bereich vIRF4-induzierter bzw. -reprimierter *Probesets* ist mit geschweiften Klammern gekennzeichnet und mit der zugehörigen Zahl regulierter *Probesets* versehen. Die Clusterstruktur für die Gruppen und *Probesets* ist jeweils als Dendrogramm gezeigt. (A) Die Clusteranalyse wurde basierend auf den 1107 *Probesets* durchgeführt, die zwischen den Gruppen „ohne Dox vs. mit Dox“ einen mindestens 1,5 fachen ( $p < 0,05$ ) Expressionsunterschied aufwiesen. Die Abbildung gibt alle Expressionswerte der Gruppen 0 h Dox, -48 h Dox und +48 h Dox wieder, die im GeRNA-Screen unter Verwendung von Gesamt-RNA in Duplikaten (A und B) analysiert wurden. (B) Die Abbildung gibt die Expressionswerte der Zeitreihe wieder, die im NaRNA-Screen unter Verwendung nascenter RNA analysiert wurden. Die Clusteranalyse wurde basierend auf den 1219 *Probesets* durchgeführt, die zwischen den Gruppen „0 h Dox“ vs. „48 h Dox“ einen mindestens 1,5 fachen Expressionsunterschied aufwiesen. Die Zeitreihe wurde in Einzelwerten erstellt und analysiert, mit Ausnahme des Nullwerts, der als Doppelwert vorliegt. Der gelbe Pfeil markiert den Knotenpunkt des Dendrogramms, welches die reprimierten Gene enthält, die weitgehend geordnet und stimmig reguliert werden. Die Amplitude der x-fachen Regulation für die *Probesets* des GeRNA-Screens ist in (C), für die des NaRNA-Screens in (D) angegeben.



In beiden Screens war in etwa die gleiche Zahl an *Probesets* reguliert. Im GeRNA-Screen spalteten sich die regulierten *Probesets* in Induzierte und Reprimierte ungefähr im Verhältnis eins zu eins auf. Hingegen waren im NaRNA-Screen ca. zwei Drittel der regulierten *Probesets* reprimiert und ein Drittel induziert. Die Amplitude der x-fachen Genregulation ist für den GeRNA-Screen in Abbildung C und für den NaRNA-Screen in Abbildung D dargestellt. Wie daraus zu ersehen ist, werden in beiden Screens nur wenige *Probesets* stark reguliert. Die höchste Regulation ist in beiden Screens 5-fach, mit fünf regulierten Genen im GeRNA-Screen und vier Genen im NaRNA-Screen.

Beide durchgeführten Screens basieren auf unterschiedlichen experimentellen Ansätzen. Um eine weitere Auswertung unter Berücksichtigung beider Screens vorzunehmen, wurde die Schnittmenge der in beiden Screens regulierten *Probesets* bestimmt. Für die Analyse wurden die 1107 *Probesets*, die im GeRNA-Screen 1,5-fach mit  $p < 0,05$  reguliert waren und die 1,5-fach regulierten 1219 *Probesets* des NaRNA-Screens, herangezogen. Unter diesen Bedingungen ergab sich eine Schnittmenge von 195 *Probesets*, wovon 112 annotiert sind (Abb. 4.21 A). Da die beiden Screens getrennt betrachtet eine unterschiedliche Verteilung ihrer regulierten *Probesets* in die Gruppen induziert und reprimiert aufwies, sollte nun untersucht werden, wie hoch die Schnittmenge bei weiterer Unterteilung der 195 *Probesets* in reprimierte und induzierte *Probesets* ist. Wie in Abb. 4.21 B zu sehen, werden von den 195 *Probesets* in beiden Screens 106 reprimiert und 72 induziert. Die verbleibenden 17 *Probesets* wurden gegenläufig reguliert. Die Tendenz der überlappenden *Probesets* beider Screens, bezüglich Repression und Induktion durch vIRF4, verläuft in derselben Richtung. Aus diesem kleineren Satz regulierter Zielgene wurden Gene zur Validierung der Microarray-Daten ausgewählt: EGR1, FAS, JUN, MAML2, PDCD4, RGS1 und IL12A, IL2RB, MUC1, MYC und OAS2. Das Expressionsmuster dieser Gene ist für beide Screens in Abb. 4.21 C dargestellt.

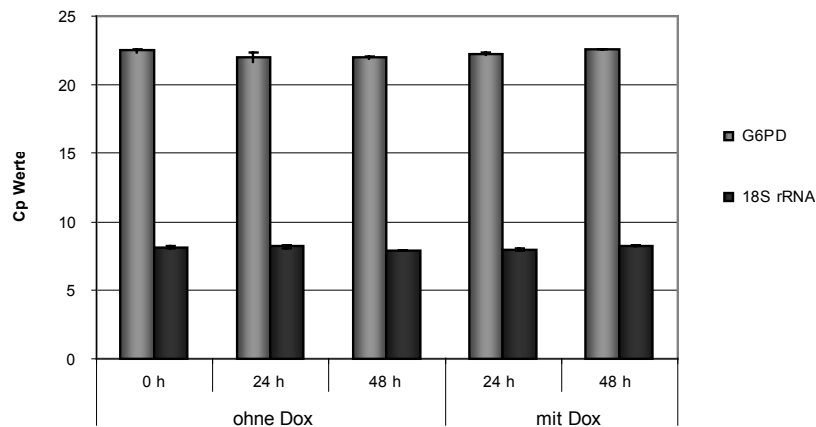


**Abb. 4.21: Auswertung der Microarrays unter Berücksichtigung beider Affymetrix-Screens.**

(A) Aus den 1107 durch vIRF4-regulierten *Probesets* des GeRNA-Screens (ohne Dox vs. mit Dox 1,5 fach reguliert,  $p < 0,05$ ) und der 1219 regulierten *Probesets* des NaRNA-Screens (0 h Dox vs. 48 h Dox 1,5 fach reguliert) wurde die Schnittmenge von 195 *Probesets* ermittelt und im Venn-Diagramm dargestellt. (B) Die Schnittmenge wurde nach überlappenden reprimierten und induzierten *Probesets* weiter aufgeschlüsselt. Der im Venn-Diagramm dargestellte GeRNA-Anteil ist gelb umrandet und der NaRNA-Anteil grau umrandet. (C) Aus den überlappenden reprimierten und induzierten *Probesets* wurden zur weiteren Bestätigung Gene ausgewählt. Deren Expressionsdaten aus dem GeRNA-Screen (links) und aus dem NaRNA-Screen (rechts) wurden mit der Software *Genesis* auf eine Skala von -2 bis +2 normalisiert und unter Verwendung der Pearson Korrelation und des *complete linkage* Algorithmus 2-dimensional geclustert. Hohe Expressionswerte sind rot, mittlere schwarz und niedrige grün dargestellt. In der Abbildung mit angegeben sind Gensymbol und die x-fache Regulation der ausgewählten Gene im GeRNA-Screen und im NaRNA-Screen.

#### 4.7 Bestätigung ausgewählter Zielgene durch *Real-time* PCR

Zur Bestätigung der Daten der Genexpressionsanalyse sollte in einem experimentell unabhängigen Experiment die relative Transkriptmenge ausgewählter Zielgene in An- und Abwesenheit von vIRF4 durch *Real-time* PCR bestimmt werden. Die Auswahl der Gene erfolgte aufgrund der starken differentiellen Regulation in beiden Screens. Es wurde dann eine differentielle Regulation angenommen, wenn sich der Mittelwert der Affymetrix-Expressionsdaten eines *Probesets* der nicht-induzierten mit dem der induzierten Gruppe im GeRNA-Screen mindestens 1,5-fach mit  $p < 0,05$  und im NaRNA-Screen der Mittelwert der Expressionswerte der nicht-induzierten Gruppe mit dem Wert nach 48 h vIRF4-Induktion mindestens 1,5-fach unterschied (siehe Abb. 4.21). Darauf basierend wurden die durch vIRF4-induzierten Gene EGR1, FAS, JUN, MAML2, PDCD4 und RGS1, sowie die reprimierten Gene IL12A, IL2RB, MUC1, MYC und OAS2 ausgewählt. Für die Analyse in der *Real-time* PCR wurden für die Gene transkriptspezifische Primer etabliert. Die Primer wurden nach Möglichkeit so gewählt, dass alle Transkripte des Gens erfasst werden, die Amplifikation des PCR-Produkts über ein Intron hinweg stattfindet und sich PCR-Produkte der cDNA und einer eventuell verbliebenen DNA-Kontamination daher in ihrer Größe unterscheiden. Lediglich für JUN musste darauf verzichtet werden, da dieses Gen kein Intron enthält. Die Transkriptmenge in einer cDNA-Probe wurde dann unter Berücksichtigung der jeweiligen Amplifikationseffizienz des verwendeten Primerpaares relativ zu einer Kalibratorprobe quantifiziert und auf G6PD (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) normalisiert. Die Wahl des Referenzgens zur Normalisierung der Transkriptmengen erfolgte anhand von Angaben in der Literatur und der Arraydaten. Als Referenzgen geeignet sind Gene, meist Haushaltsgene, die unter den verschiedenen Bedingungen keine Regulation zeigen und somit stabil exprimiert werden. In die nähere Auswahl kamen G6PD und 18S rRNA. Wie in Abb. 4.22 zu sehen ist, zeigten beide Gene keine Regulation durch Dox. Da die Expression von G6PD in einem ähnlichen Bereich wie die der potentiellen Zielgene liegt, wurde für die Bestätigung der Zielgene G6PD zur Normalisierung der Transkriptmengen herangezogen.



**Abb. 4.22: Vergleich der Expression der Referenzgene G6PD und 18S rRNA.**

Basierend auf Literaturangaben und den Arraydaten erschienen die beiden Gene G6PD und 18S RNA aufgrund ihrer stabilen Expression zur Normalisierung in *Real-time* PCR-Experimenten geeignet. Um beide Referenzgene vergleichen zu können, wurden Zellen der Linie tet-vIRF4-BC-1 ohne und mit Dox in Duplikaten kultiviert und nach 0, 24 und 48 h geerntet. Nach Präparation der RNA wurde diese in cDNA umgeschrieben und in die *Real-time* PCR-Analyse eingesetzt. Für beide Gene sind die Mittelwerte der Cp-Werte (*Crossing-point*) ( $\pm$ SD) aus den zwei Einzelwerten des jeweiligen Zeitpunkts dargestellt. Der Cp-Wert gibt das Maximum der zweiten Ableitung der während der Amplifikation aufgezeichneten Fluoreszenzkurve wieder. Beide Gene zeigen stabile Cp-Werte und werden somit nicht durch Dox reguliert. Ein Unterschied besteht jedoch in ihren Expressionswerten. Wie anhand der Cp-Werte zu erkennen ist, liegt in den Zellen die Signalstärke von G6PD in demselben Bereich wie die der potentiellen Zielgene, weshalb in allen fortführenden *Real-time* PCR-Experimenten G6PD zur Normalisierung der Transkriptmengen herangezogen wurde.

#### 4.7.1 vIRF4 induziert zelluläre Gene

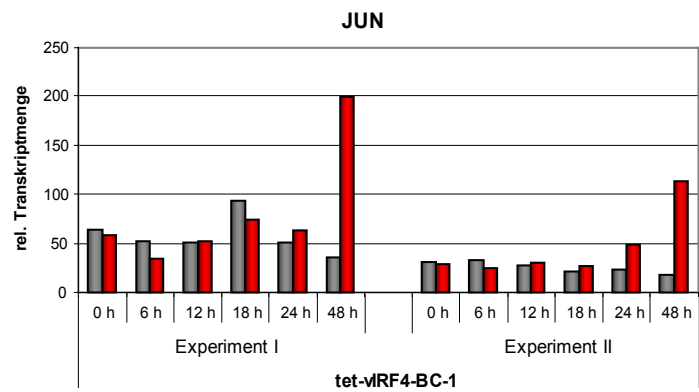
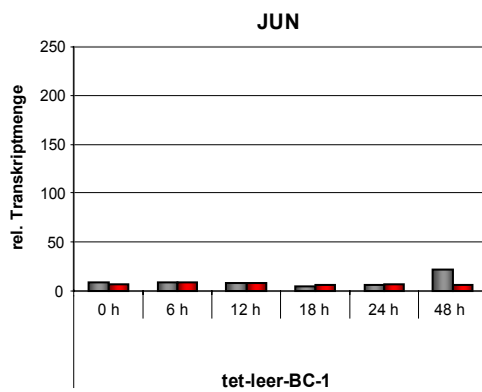
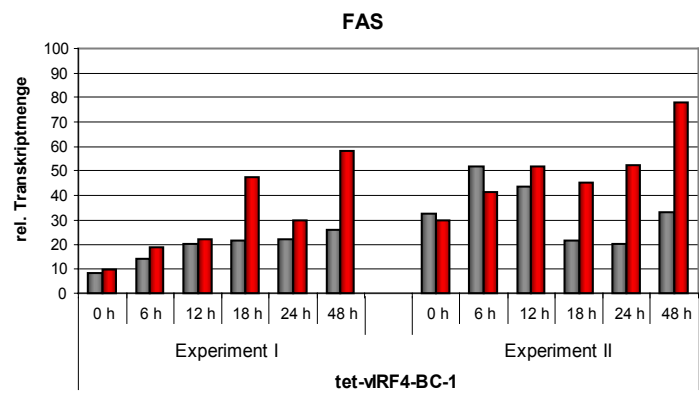
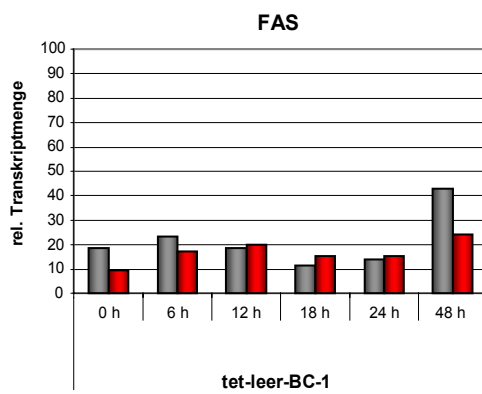
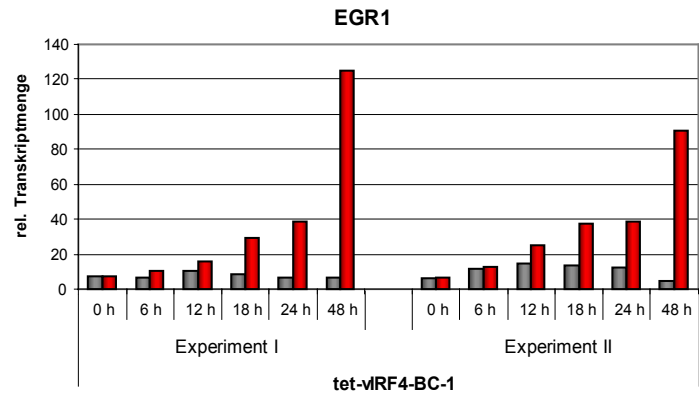
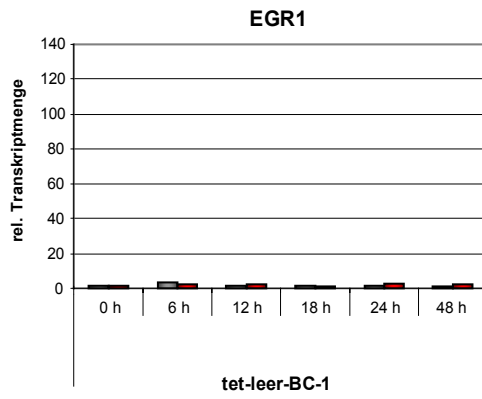
Für die Expressionsanalyse der induzierten Gene in der *Real-time* PCR sollte in der Zelllinie tet-vIRF4-BC-1 das Genexpressionsprofil der Zelle vor und nach Expression von vIRF4 miteinander verglichen werden. Zur Bestätigung der Gene sollten die experimentellen Ansätze und Kulturbedingungen beider Affymetrix-Genexpressionsanalysen berücksichtigt werden. Dazu wurde die Expression von vIRF4 mit 1  $\mu$ g/ml Dox induziert und in einer Zeitreihe zu sechs verschiedenen Zeitpunkten Zellen geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Parallel dazu erfolgte eine Kultivierung der Zellen über denselben Zeitraum ohne Dox-Induktion. So sollten Änderungen im Genexpressionsmuster eindeutig auf vIRF4 zurückführbar sein können und nicht etwa Resultat einer zu hohen Zelldichte sein. Nach reverser Transkription der RNA wurde die cDNA in eine *Real-time* PCR mit spezifischen Primern komplementär zum Zielgen eingesetzt. Um ausschließen zu können, dass die Modulation der Genexpression kein Dox bedingter Effekt ist, wurde als Kontrolle die Linie tet-leer-BC-1 für dieselbe Zeitreihe mit Dox kultiviert, zu denselben Zeitpunkten RNA isoliert und in der *Real-time* PCR weiter analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 4.23 dargestellt. Gezeigt sind zwei unabhängige Zeitserien. Die Beurteilung der differentiellen Regulation sollte hier



vorwiegend im zeitlichen Verlauf erfolgen und so auch Aufschluss über den Zeitpunkt der Regulation geben. Von jedem gewählten Zeitpunkt wurden Einzelwerte erstellt.

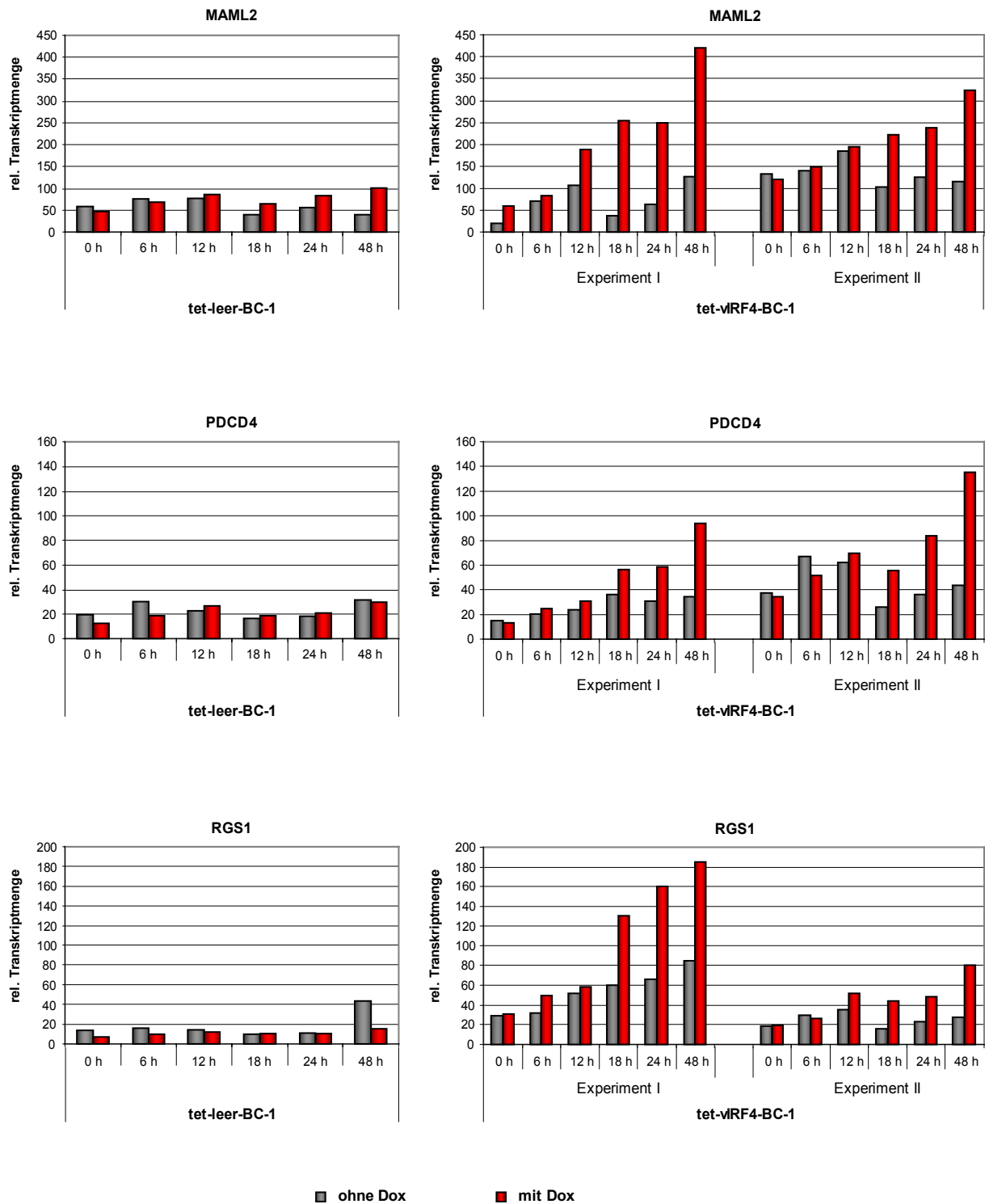
Zunächst ist zu beobachten, dass sich die Linien tet-vIRF4-BC-1 und tet-leer-BC-1 generell im Basiswert der Transkriptmengen der zellulären Gene unterscheiden. In der Linie tet-vIRF4-BC-1 zeigen sich im zeitlichen Verlauf von 48 h auch in Abwesenheit von vIRF4 Abweichungen im Basiswert der relativen Transkriptmengen der Gene, die je nach Experiment bzw. Gen stärker oder schwächer ausfallen. Unter Berücksichtigung dessen erscheint es im Folgenden am sinnvollsten, eine vIRF4-bedingte Veränderung im Genexpressionsmuster bezogen auf den Zustand ohne Dox vs. mit Dox, d.h. ohne vs. mit vIRF4-Expression, für den jeweiligen Zeitpunkt zu beurteilen. Gleichzeitig gestaltet sich so die Bestätigung, wie auch den Zeitpunkt der Induktion zu definieren, als schwierig. Die Expression von vIRF4 führt zur Induktion der EGR1-, FAS-, MAML2- und PDCD4-Expression nach etwa 18 h, die für alle Gene und in allen Einzelexperimenten bis 48 h kontinuierlich zunimmt. Das Gen RGS1 wird erst nach 48 h deutlich induziert. Alle sechs Gene zeigen in der Linie tet-vIRF4-BC-1 eine stetige Transkriptzunahme bis 48 h und beide Experimente zeigen bezüglich der Induktion dieselbe Tendenz. Nur für JUN und RGS1 ist zu beobachten, dass der Wertebereich der beiden Zeitserien nach Expression von vIRF4 verschieden ist. Die Induktion der beiden Gene kann dennoch in jedem Experiment in sich reproduziert werden. Der Mittelwert der beiden Experimente in der PCR-Analyse zeigt nach 48 h die mit Abstand stärkste Induktion für EGR1, mit einer 19-fachen Induktion. Auch JUN zeigt in der Bestätigung eine starke 6-fache Induktion. MAML2, PDCD4 und RGS1 werden in etwa 3-fach induziert und für FAS ergibt sich eine 2-fache Induktion. Die stärkste Induktion aller Gene zum Ende der Zeitreihe, deckt sich mit dem der Affymetrix-Microarrayanalyse des NaRNA-Screens. Die Zelllinie tet-leer-BC-1 zeigt nach Zugabe von Dox keine Induktion der Gene EGR1, FAS, JUN, PDCD4 und RGS1. Lediglich für MAML2 ist ein in etwa 2-facher Anstieg zu beobachten, der jedoch im Vergleich immer noch niedriger ist als in Anwesenheit von vIRF4.

In Tab. 4.2 sind für die sechs induzierten Gene die Affymetrix-Daten zusammen mit den Daten der *Real-time* PCR aufgelistet. Es zeigt sich, dass in der *Real-time* PCR die Affymetrix-Daten der sechs Gene in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert werden können und für die meisten Gene eine stärkere differentielle Regulation als im Affymetrix-Screen zu beobachten ist.



■ ohne Dox

■ mit Dox



**Abb. 4.23: Bestätigung der Affymetrix-Daten für vIRF4-induzierte Gene durch *Real-time* PCR.**

Die differentielle Expression der ausgewählten Gene, die in beiden Affymetrix-Screens durch vIRF4 induziert waren, konnten in *Real-time* PCR-Analysen verifiziert werden. Die Bestätigung erfolgte in Form zwei parallel angesetzter Zeitreihen mit den Zelllinien tet-leer-BC-1 und tet-vIRF4-BC1. In der einen Zeitreihe wurden Zellen ohne Dox und in der anderen mit Dox (1 µg/ml), d.h. unter vIRF4-Expression, kultiviert, zu sechs verschiedenen Zeitpunkten geerntet und RNA präpariert. Für die Quantifizierung der Transkripte wurde eine *Real-time* PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Die Transkriptmenge wurde relativ zu einer Kalibratorprobe bestimmt und gegen das Gen G6PD normalisiert. Für die Linie tet-vIRF4-BC-1 sind zwei Einzelexperimente (I und II) gezeigt.

Gensymbol (Entrez Gene ID) <sup>1)</sup>	Genname	Molekulare oder biologische Funktion	NaRNA-Screen		GeRNA-Screen		Real-time PCR	
			+48/0 <sup>2)</sup>	+48/(0 plus - 48) <sup>3)</sup>	+48/0 <sup>4)</sup>	+48/- 48 <sup>5)</sup>	+48/0 <sup>6)</sup>	+48/- 48 <sup>7)</sup>
EGR1 (1958)	<i>early growth response 1</i>	Transkriptionsregulator; Zelldifferenzierung und Mitogenese	4,3	4,2	3,7	4,8	14,9	19,2
FAS (355)	<i>Fas (TNF receptor superfamily, member 6)</i>	Mitglied der TNF Rezeptor Superfamilie; Signaltransduktion; Apoptose	1,9	2,2	3,6	1,6	4,2	2,3
JUN (3725)	<i>jun oncogene</i>	Proto-Onkogen; Transkriptregulator; Zelldifferenzierung	2,8	1,7	1,6	1,8	3,7	6,1
MAML2 (84441)	<i>mastermind-like 2 (Drosophila)</i>	Transkriptionsregulator; Notchsignalweg	2	3,1	4	2,6	4,8	3,1
PDCD4 (27250)	<i>programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)</i>	Tumorsuppressor; Apoptose	2,5	2,3	3,7	1,7	5,4	2,9
RGS1 (5996)	<i>regulator of G-protein signaling 1</i>	Mitglied der Familie von Regulatoren der G-Protein Signalgebung; Signaltransduktion; Immunantwort	2,6	2,3	3,3	1,8	5,1	2,6

x-fach induziert

**Tab. 4.2: Bestätigung der Affymetrix-Daten für vIRF4-induzierte Gene durch Real-time PCR.**

Die Tabelle gibt eine Datenzusammenfassung sowie eine kurze Beschreibung der durch vIRF4-induzierten Gene wieder.

Die x-fache Regulation wurde für den NaRNA-Screen (Screen mit nascenter RNA) und für den GeRNA-Screen (Screen mit Gesamt-RNA) so angegeben, wie sie auch als Basis für die Auswertung der Microarrays diente. Das bedeutet für den NaRNA-Screen die Gruppenkombination +48/0 und für den GeRNA-Screen die Gruppenkombination +48/(0 plus - 48). Um die Affymetrix-Daten mit den ermittelten Daten der Real-time PCR vergleichen zu können, ist für den GeRNA-Screen zusätzlich die Gruppenkombination +48/0 und +48/- 48 angegeben. Um in der Auswertung der Real-time PCR beiden Screens gerecht zu werden, wurden hier die Gruppenkombinationen +48/0 und +48/- 48 angegeben. Die Versuche wurden in der Zelllinie tet-vIRF4-BC-1 durchgeführt.

1) eindeutige Gen-Identifikationsnummer (ID) gemäß dem National Center for Biotechnology Information (NCBI)  
 2) die x-fache Induktion wurde berechnet, durch Bilden des Quotienten aus dem Einzel-Expressionswert nach 48 h Dox-Induktion, zu dem Mittelwert der Expressionswerte ohne Dox-Induktion zum Zeitpunkt 0, die im NaRNA-Screen ermittelt wurden.  
 3) die x-fache Induktion wurde aus dem Mittelwert der Expressionswerte zum Zeitpunkt 0 und 48 h ohne Dox-Induktion, und den Werten nach 48 h mit Dox-Induktion berechnet, die im GeRNA-Screen ermittelt wurden.  
 4) die x-fache Induktion wurde aus dem Mittelwert der Expressionswerte zum Zeitpunkt 0 ohne Dox-Induktion, und den Werten nach 48 h mit Dox-Induktion berechnet, die im GeRNA-Screen ermittelt wurden.  
 5) die x-fache Induktion wurde aus dem Mittelwert der Expressionswerte nach 48 h ohne Dox-Induktion, und den Werten nach 48 h mit Dox-Induktion berechnet, die im GeRNA-Screen ermittelt wurden.

6) Mittelwert der x-fachen Induktion aus zwei unabhängigen Experimenten; die x-fache Induktion entspricht dem Quotienten der relativen Transkriptmengen bestimmt aus Zellen induziert mit Dox für 48 h, zu Zellen ohne Dox-Induktion zum Zeitpunkt 0;

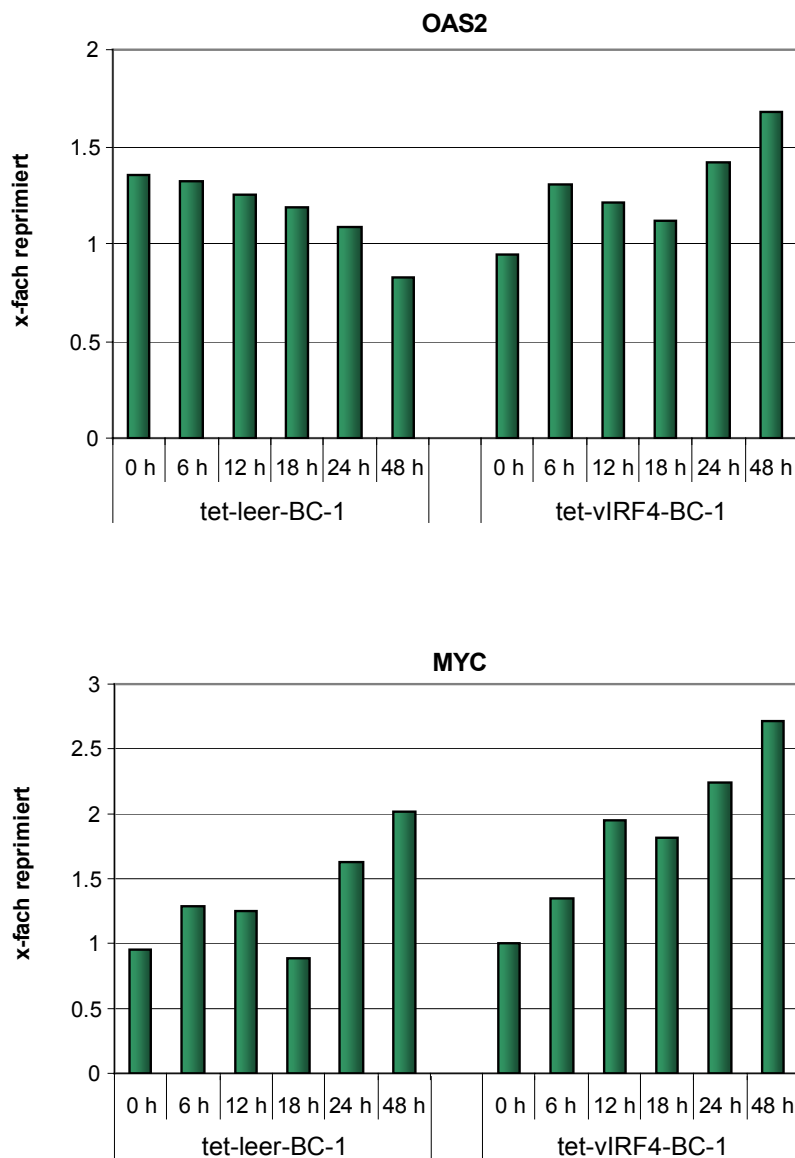
7) Mittelwert der x-fachen Induktion aus zwei unabhängigen Experimenten; die x-fache Induktion entspricht dem Quotienten der relativen Transkriptmengen bestimmt aus Zellen induziert mit Dox für 48 h, zu Zellen ohne Dox-Induktion nach 48 h;

mit Dox für 48 h = +48; ohne Dox für 0 h = 0; ohne Dox für 48 h = - 48;

#### 4.7.2 Fungiert vIRF4 als Repressor?

Die Verifizierung der reprimierten Gene sollte zunächst für die Gene MYC und OAS2 erfolgen. OAS2 wurde im Affymetrix-Screen stark reguliert. Als interessantester Kandidat der ausgewählten reprimierten Zielgene erwies sich MYC, da es bereits als Zielgen von Notch und EBNA2 publiziert ist. Es war deshalb von besonderem Interesse zu klären, ob die Regulation von MYC durch vIRF4 verifiziert werden könne und so möglicherweise ein Modulationsmechanismus des Notch-Signalweges auf Transkriptebene durch vIRF4 vorläge. Die experimentelle Bestätigung erfolgte wie für die vIRF4-induzierten Gene auch in den Zelllinien tet-vIRF4-BC-1 und tet-leer-BC-1. Die Zellen wurden ohne und mit 1 µg/ml Dox für eine Zeitreihe über 48 h kultiviert und zu sechs verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Nach Präparation der RNA wurde diese revers transkribiert und die cDNA in *Real-time* PCR-Analysen eingesetzt. In Abb. 4.24 ist der Quotient der relativen Transkriptwerte ohne Dox/mit Dox (x-fache Repression) dargestellt. Wie das Ergebnis zeigt, nimmt die Repression von OAS2 im zeitlichen Verlauf zu. Allerdings liegt erst nach 48 h eine 1,7-fache Repression vor, die damit nur knapp über der 1,5-fachen Regulation, dem Auswahlkriterium der Affymetrix-Analyse, liegt. Auch die Repression von MYC nimmt über einen Zeitraum von 48 h kontinuierlich zu. Entgegen der Erwartung ist auch in der Zelllinie tet-leer-BC-1, in welcher keine vIRF4-Expression möglich ist, eine Veränderung der MYC-Expression mit selber Tendenz zu verzeichnen. Hier zeigt sich nach 24 h eine 1,6-fache und nach 48 h sogar eine 2-fache Repression.

Bei Bestätigung der induzierten Gene waren solche Schwankungen in der Kontrolllinie nicht bemerkt worden. Verglichen mit den Affymetrix-Daten lag der Wert der x-fachen Regulation der induzierten Gene in den *Real-time* PCR-Experimenten auch deutlich höher. Die schwache Repression von OAS2 und die Auffälligkeiten in der Bestätigung von MYC führten deshalb zu der Frage, ob hier tatsächlich eine vIRF4-bedingte Repression vorliegt oder ob die Transkriptabnahme ursächlich auf einem toxischen Effekt von Dox beruht.



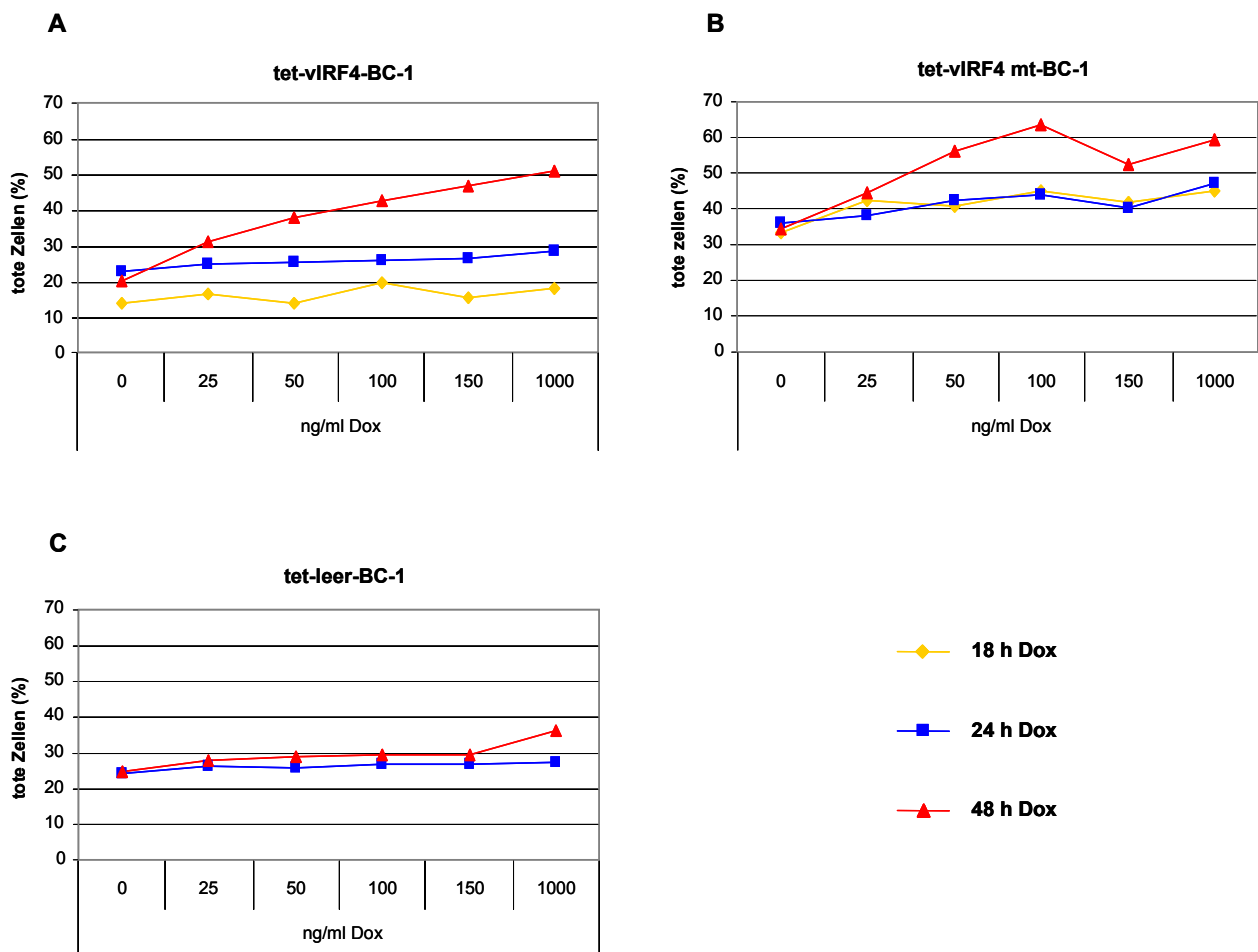
**Abb. 4.24: Untersuchung der vIRF4-vermittelten Repression ausgewählter Gene durch *Real-time* PCR.**

Untersucht wurde die Expression der Gene MYC und OAS2 in An- und Abwesenheit von vIRF4, d.h. mit und ohne Dox. Das Experiment erfolgte in Form zwei parallel angesetzter Zeitreihen mit den Zelllinien tet-leer-BC-1 und tet-vIRF4-BC1. In der einen Zeitreihe wurden Zellen ohne Dox und in der anderen mit Dox (1 µg/ml) kultiviert, zu sechs verschiedenen Zeitpunkten geerntet und RNA präpariert. Für die Quantifizierung der Transkripte wurde eine *Real-time* PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Die Transkriptmenge wurde relativ zu einer Kalibratorprobe bestimmt und gegen das Gen G6PD normalisiert. Dargestellt ist jeweils der Quotient der relativen Transkriptmengen für Zellen, kultiviert ohne Dox/mit Dox (x-fache Repression), des jeweiligen Zeitpunkts für die gesamte Zeitreihe.

#### 4.7.3 Weitere Untersuchungen zur Repression von Zielgenen

In dem vorherigen Versuch konnte auch in der Kontrolllinie tet-leer-BC-1 nach Dox-Zugabe eine MYC-Regulation verzeichnet werden. Dies führte zu der Befürchtung, dass Dox allein einen toxischen Effekt auf die Zellen hat. Um eine mögliche Toxizität von Dox zu untersuchen, wurde eine lebend/tot-Analyse der Zellen durch Propidiumiodidfärbung

vorgenommen. Propidiumiodid (PI) kann eine intakte Zellmembran lebender Zellen nicht passieren. Bei toten Zellen erhöht sich die Membranpermeabilität, wodurch PI in die Zelle und den Zellkern gelangt und dort in DNA interkaliert. Da PI ein fluoreszierendes Molekül ist, kann es im FACS nachgewiesen werden. Für die Analyse wurden Zellen der Linie tet-vIRF4-BC-1 und der Linie tet-vIRF4 mt-BC-1 mit steigenden Konzentrationen an Dox induziert, für jeweils 18, 24 und 48 h kultiviert und anschließend einer Propidiumiodidfärbung unterzogen. Die Auswertung der lebend/tot-Färbungen erfolgte im FACS (Abb. 4.25).



**Abb. 4.25: Toxizitätstest durch Propidiumiodidfärbung.**

Zellen der Linie tet-vIRF4-BC-1 (A), tet-vIRF4 mt-BC-1 (B) und tet-leer-BC-1 (C) wurden ohne bzw. nach Dox-Induktion einer lebend/tot-Färbung mit Propidiumiodid (PI) unterzogen und im FACS analysiert. Dafür wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit steigenden Konzentrationen an Dox induziert und für 18, 24 und 48 h (tet-vIRF4-BC-1 und tet-vIRF4 mt-BC-1) bzw. 24 und 48 h (tet-leer-BC-1) kultiviert. Die Zellen wurden anschließend geerntet, in FACS-Puffer aufgenommen und unmittelbar vor Messung der Proben mit PI versetzt.

Während nach 18 h kein Dox-Effekt auf die Zellen der Linie tet-vIRF4-BC-1 nachgewiesen werden konnte, zeigte sich nach 24 h auch ohne Dox ein um fast 10 % höherer Anteil toter Zellen. Eine zunehmende Dox-Konzentration führte zu einem geringen Anstieg an toten Zellen um insgesamt 5 %. Nach 48 h lag dann für die geringste Konzentration von 25 ng/ml

die Zahl toter Zellen schon um 10 % höher als ohne Dox und stieg mit zunehmender Konzentration kontinuierlich stark an. So konnten mit 1000 ng/ml Dox 30 % mehr tote Zellen detektiert werden. In der Linie tet-vIRF4 mt-BC-1 zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Nach 18 und 24 h war parallel mit dem Anstieg der Dox-Konzentration ein kontinuierlicher Anstieg toter Zellen um insgesamt 10 % zu verzeichnen. Nach 48 h führte die Dox-Konzentration schon bei 25 ng/ml zu einem knapp 10 % höheren Wert toter Zellen, der weiter rasch anstieg, und bei einer Konzentration von 100 ng/ml 30 % erreichte. Nach einer Abnahme der toten Zellen um knapp 10 % bei 150 ng/ml Dox, lagen bei 1000 ng/ml Dox 25 % mehr tote Zellen vor, verglichen mit einer Kultivierung ohne Dox-Zugabe. Da die Zunahme toter Zellen mit steigenden Konzentrationen an Dox in beiden Linien beobachtet werden konnte, kann ausgeschlossen werden, dass der Effekt in Verbindung mit dem Notch-Signalweg steht. Um zu zeigen, dass der Effekt Dox-bedingt ist, wurde die Kontrolllinie tet-leer-BC-1 unter denselben Versuchsbedingungen für 24 und 48 h kultiviert. Erstaunlicherweise waren hier nur minimale Effekte zu beobachten. Lediglich nach 48 h zeigte sich bei Erhöhung der Dox-Konzentration auf 150 ng/ml eine Zunahme um 5 % die sich bei 1000 ng/ml Dox auf 10 % erhöhte. Demnach scheint nicht die hohe Dox-Konzentration von 1 µg/ml das Problem zu sein, sondern sich vielmehr die Überexpression von vIRF4 toxisch auf die Zellen auszuwirken.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass auch eine längere Kultivierung der Zellen in Gegenwart von Dox, wenn überhaupt, nur einen minimal toxischen Effekt auf die Zellen hat. Allerdings wirkt sich die mit ansteigender Dox-Konzentration zunehmende Überexpression von vIRF4 toxisch auf die Zellen aus und führt zu einem deutlichen Anstieg toter Zellen.

Die beobachteten Effekte auf die Transkription von MYC in der Linie tet-leer-BC-1 lassen sich mit diesem Versuch nicht eindeutig erklären. Es kann sein, dass die Transkriptabnahme in der Linie tet-leer-BC-1 bedingt aus dem minimalen Dox-Effekt resultiert. Vielleicht ist es auch ein genspezifischer Effekt, der durch ganz andere Stimuli ausgelöst wird oder vielleicht sogar durch Dox indirekt beeinflusst wird. Dennoch führt die Toxizität der vIRF4-Überexpression zu einem großen Problem bei der Bestätigung reprimierter Gene. Es kann so nie eindeutig gesagt werden, ob die Transkriptabnahme ein Resultat der vIRF4-Repression oder ein indirekter Effekt von sterbenden Zellen ist.

Der toxische Effekt ist zwar bei einer niedrigen Dox-Konzentration geringer, es konnte jedoch unter 4.4.1 gezeigt werden, dass auch die Zahl induzierter Zellen stark zurückgeht. Da die Toxizität aber ein weitaus größeres Problem als die Frequenz induzierter Zellen darstellt, sollte untersucht werden, ob in einer Serie mit einer Dox-Konzentration von 25 ng/ml auch noch ein regulatorischer vIRF4 Effekt zu erkennen ist. Es wurde wie im vorigen Versuch auch, eine Zeitreihe über 48 h angesetzt, RNA isoliert und die Transkriptmenge der reprimierten Zielgene in der *Real-time* PCR bestimmt. Wie aus Tab. 4.3 zu entnehmen ist,



ließ sich eine durch vIRF4 verminderte Expression für keines der reprimierten Zielgene eindeutig bestätigen. MYC zeigt zwar nach 48 h eine 1,6-fache Abnahme der Transkriptmenge, jedoch ist bis 24 h keinerlei Abnahme zu erkennen. Die in der *Real-time* PCR ermittelte 1,6-fach verminderte Expression ist dabei auch niedriger als die der Microarrayanalyse (GeRNA-Screen 1,8-fach, NaRNA-Screen 2,8-fach; siehe Abb. 4.21). Insgesamt ist das Ergebnis für MYC nicht überzeugend. Ein Grund für das Ergebnis dieses Versuchs ist sicher, dass die Frequenz induzierter Zellen um 25 % niedriger ist und so die auch mit hoher Konzentration mäßigen Effekte nicht reproduzierbar sind. Das hier verwendete Zellsystem kann zur Bestätigung der reprimierten Zielgene leider nicht verwendet werden. Es bleibt daher offen, ob vIRF4 auch als Repressor fungiert. Aus zeitlichen Gründen war es mir nicht möglich, die Repression der Zielgene in einem anderen System zu untersuchen.

Gen	Linie		Zeit (h Dox)					
			0	6	12	18	24	48
IL2 RB	tet-leer-BC-1	x-fach reprimiert	1,18	1,03	1,07	0,89	1	0,91
	tet-vIRF4-BC-1		0,93	1,01	1,12	1,16	1,14	1,27
IL12A	tet-leer-BC-1		1,77	1,3	1,33	0,89	0,94	1,1
	tet-vIRF4-BC-1		1,61	1,47	0,9	1,19	0,97	1,18
MUC1	tet-leer-BC-1		1,26	1,07	1,22	0,84	1,07	1,11
	tet-vIRF4-BC-1		0,86	1,11	0,98	1,25	1,13	1,36
MYC	tet-leer-BC-1		1,09	1,07	1,08	0,62	1,25	1,17
	tet-vIRF4-BC-1		0,95	1,16	1,17	1,16	0,98	1,64
OAS2	tet-leer-BC-1		1,15	0,94	1,03	1,06	0,96	0,9
	tet-vIRF4-BC-1		0,98	0,98	0,84	0,81	0,95	0,99

**Tab. 4.3: Analyse der relativen Transkriptmengen potentiell vIRF4-reprimierter Gene durch *Real-time* PCR.** Das Experiment erfolgte in Form zwei parallel angesetzter Zeitreihen mit den Zelllinien tet-leer-BC-1 und tet-vIRF4-BC1. In der einen Zeitreihe wurden Zellen ohne Dox und in der anderen mit 25 ng/ml Dox kultiviert und zu sechs verschiedenen Zeitpunkten geerntet und RNA präpariert. Für die Quantifizierung der Transkripte wurde eine *Real-time* PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Die Transkriptmenge wurde relativ zu einer Kalibratorprobe bestimmt und gegen das Gen G6PD normalisiert. Dargestellt ist jeweils der Quotient der Transkriptmengen für Zellen, kultiviert ohne Dox/mit Dox- (x-fache Repression), des jeweiligen Zeitpunkts für die gesamte Zeitreihe.

#### 4.8 Untersuchung der CBF1-abhängigen Induktion von vIRF4-Zielgenen

In Abschnitt 4.7.1 konnte die Induktion der Gene EGR1, FAS, JUN, MAML2, PDCD4 und RGS1 durch vIRF4 in der Linie tet-vIRF4-BC-1 verifiziert werden. Bislang liegen keine Ergebnisse vor, ob vIRF4 an DNA binden kann. Aufgrund seiner Interaktion mit dem DNA-bindenden Faktor CBF1, besteht die Möglichkeit, dass vIRF4 so an die Promotoren seiner Zielgene rekrutiert wird. Deshalb wollte ich anschließend überprüfen, in wie weit diese Gene CBF1-abhängig reguliert werden.

### 4.8.1 Bioinformatische Promotoranalyse auf potentielle CBF1-Bindestellen

Bevor eine experimentelle Untersuchung der CBF1-abhängigen Regulation erfolgt, sollten zunächst die Promotoren der Gene EGR1, FAS, JUN, MAML2, PDCD4 und RGS1 auf potentielle CBF1-Bindestellen überprüft werden. Anhand dessen kann beurteilt werden, ob in der experimentellen Analyse mit einer CBF1-abhängigen Regulation zu rechnen ist. Sollte dann das experimentelle Ergebnis eine CBF1-abhängige Regulation für Gene aufzeigen, wäre die Vorhersage potentieller CBF1-Bindestellen ein Anhaltspunkt, welcher Promotorbereich und welche Sequenzen für die Regulation wichtig sind.

Die Analyse erfolgte in einem Promotorbereich von 1000 bp aufwärts des Transkriptionsstarts (TSS), bezeichnet als -1000 bp. Es gibt jedoch auch Gene, bei denen Bindestellen von Transkriptionsfaktoren nicht stromaufwärts, sondern innerhalb der kodierenden Sequenz liegen. Um dies zu berücksichtigen wurde auch im ersten Intron und im ersten Exon des Gens nach CBF1-Bindestellen gesucht. Die Vorhersage erfolgte mit Hilfe der Genomatix-Software *MatInspector*. Das Ergebnis ist in Tab. 4.4 zusammengefasst.

Für die Gene EGR1, FAS, MAML2, PDCD4 und RGS1 konnten mit Hilfe des Programms im Bereich -1000 bp Bindestellen für CBF1 identifiziert werden. Darüber hinaus fanden sich für alle Gene auch CBF1-Bindestellen stromabwärts des TSS. Für JUN, dessen Gen kein Intron enthält, wurde ausschließlich im Exon eine CBF1-Bindestelle gefunden. Diese befindet sich stromabwärts der proteinkodierenden Sequenz.

Gen	1 kb str.aufwärts TSS		Seq.	Matrix <i>similarity</i>	1. Intron bzw. im Exon*	
	Pos.				Treffer	Introngröße
EGR1	- 812		tcgc <b>TGGGaa</b> att	0,960	----	
FAS	- 507		aacc <b>TGGGaa</b> ggt	0,950	7 x	12 kbp
JUN	----		---	----	*1 x	
MAML2	TSS A	- 691	ttcc <b>TGGGaa</b> ttc	0,946	80 x	100 kbp
		- 245	ctca <b>TGGGaa</b> cca	0,894		
	TSS B	----	---	----	195 x	248 kbp
PDCD4	TSS A	- 871	cgcc <b>TGGGaa</b> cac	0,946	3 x	4 kbp
		- 593	gaaa <b>TGGGaa</b> tta	0,894		
	TSS B	----	---	----	1 x	178 bp
RGS1	- 527		ggag <b>TGGGaa</b> aat	0,985	----	

**Tab. 4.4: Zusammenfassung potentieller CBF1-Bindestellen für die vIRF4-induzierten Gene.**

Mit Hilfe der Genomatix-Software *MatInspector* wurde der Promotorbereich 1 kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts (TSS) nach potentiellen CBF1-Bindestellen durchsucht und die Position bezogen auf den TSS des jeweiligen Gens angegeben. Zusätzlich wurde im ersten Intron bzw. für JUN im Exon (gekennzeichnet mit \*) nach CBF1-Bindestellen gesucht und die Anzahl der Treffer, sowie die Introngröße vermerkt. Alle Treffer wurden mit der Matrix V\$RBPJK.02 erzielt. Der *re-value* (*random expectation*) für diese Matrix liegt bei 0,66. Er gibt an, wie häufig für diese Matrix ein Treffer pro 1000 bp zu erwarten ist. Anhand der Matrix *similarity* kann die Übereinstimmung zwischen der gefundenen Sequenz und der Matrix beurteilt werden. Ein Wert > 0,8 (1,0 = vollständige Übereinstimmung) weist auf eine hohe Übereinstimmung hin. In der Sequenz sind die vier

konsekutiven Positionen der Matrix, die den höchsten Konservierungsgrad aufweisen in Großbuchstaben angegeben. Matrixpositionen mit einem Konservierungsgrad  $> 60$  (0 = nicht konserviert; 100 = absolut konserviert) sind durch rote Buchstaben gekennzeichnet. (k)bp, (Kilo)basenpaare;

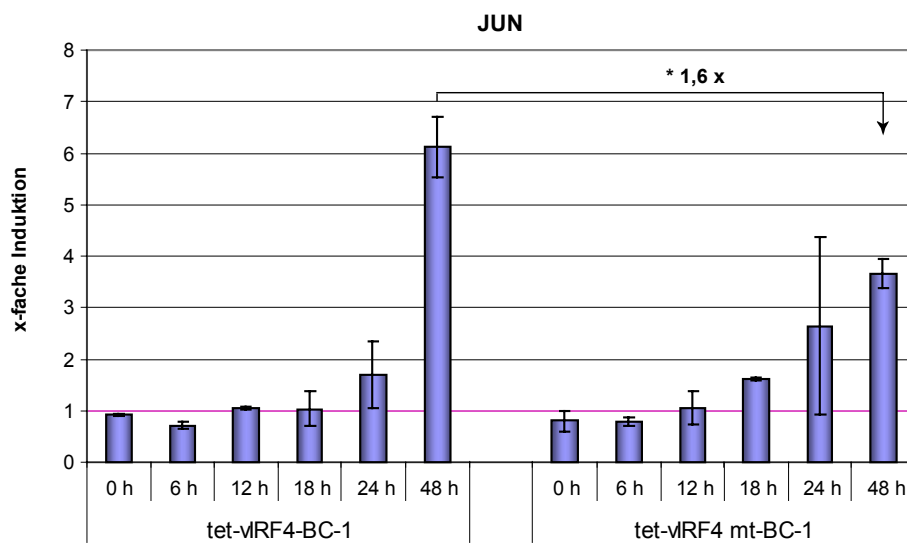
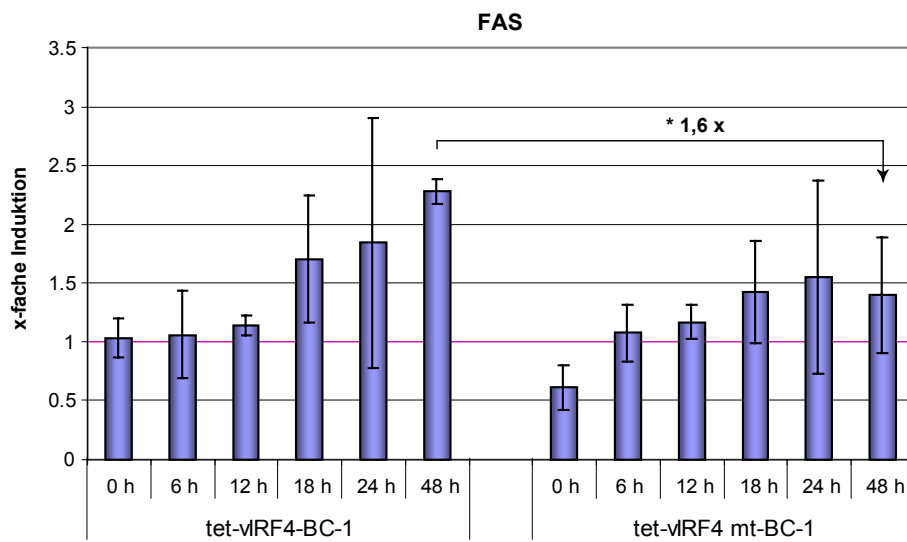
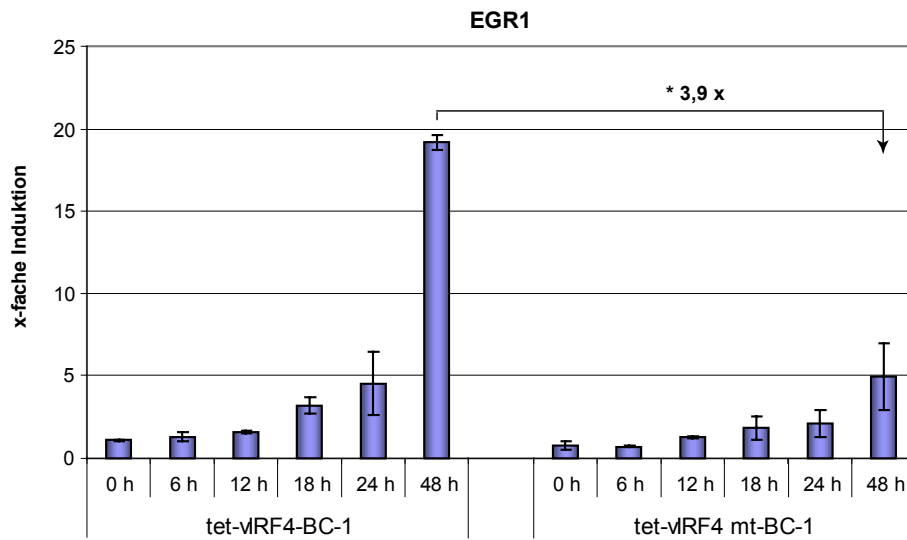
#### 4.8.2 vIRF4 reguliert EGR1 CBF1-abhängig

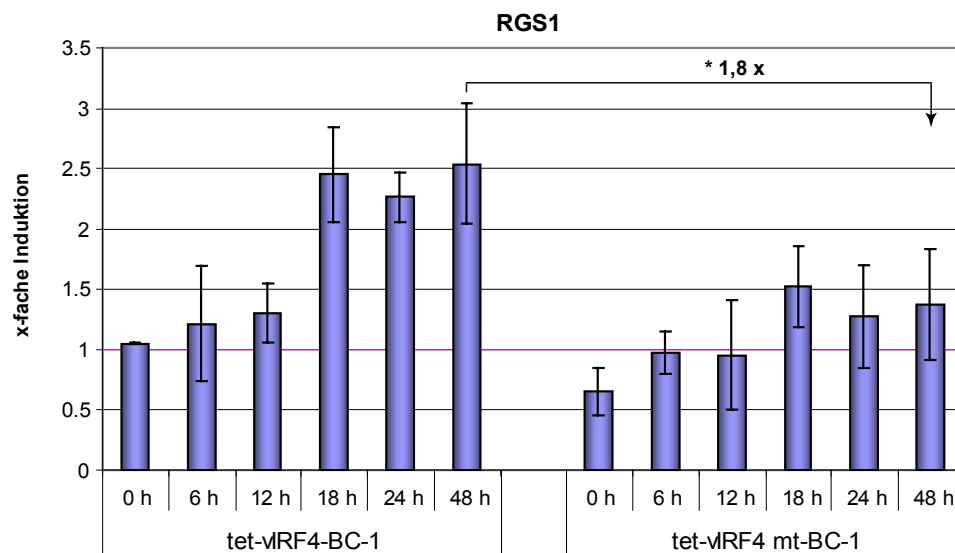
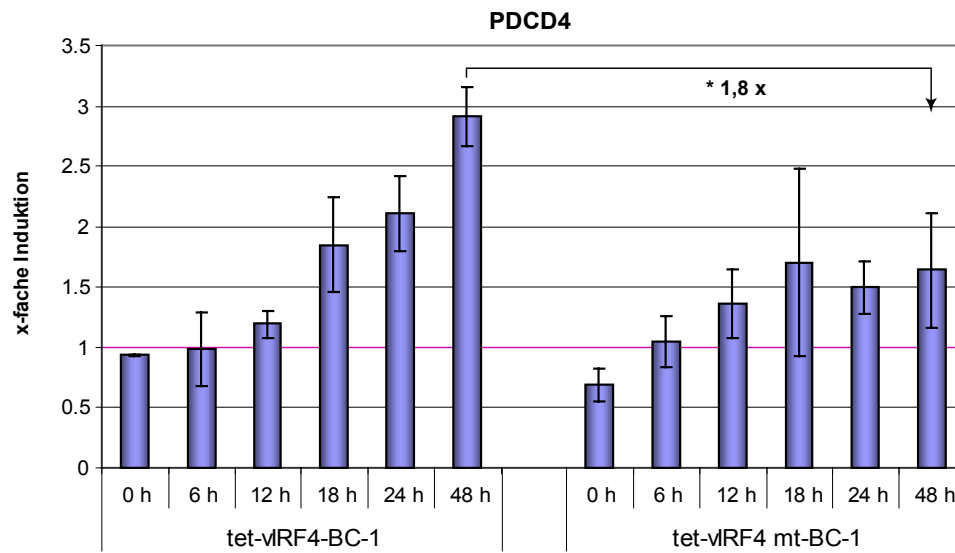
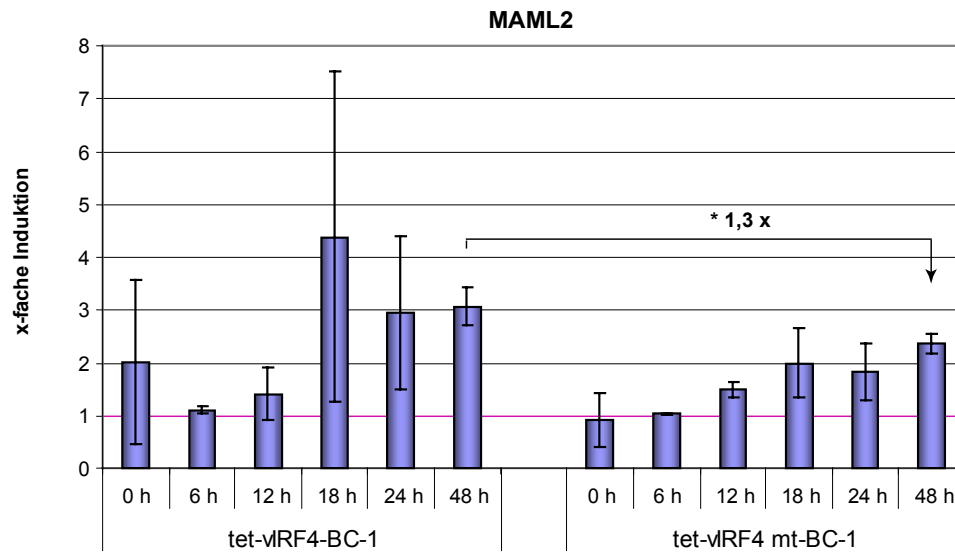
Anhand der Sequenzanalyse der Zielgenpromotoren konnten für alle Gene potentielle CBF1-Bindestellen gefunden werden. Es käme daher für alle Gene in Betracht, dass die vIRF4-Regulation über das CBF1-Protein erfolgt. Zur experimentellen Beantwortung dieser Frage sollte das Expressionsprofil der Gene in An- und Abwesenheit der nicht mehr CBF1 bindenden vIRF4-Mutante bestimmt werden. So konnte untersucht werden, ob auch ohne CBF1-Bindung nach wie vor eine differentielle Regulation der Genexpression vorliegt.

Dafür wurde die von mir etablierte Linie tet-vIRF4 mt-BC-1 mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Dox induziert, zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen geerntet und die relative Transkriptmenge in der *Real-time* PCR bestimmt. Parallel dazu wurden Zellen der gleichen Linie ohne Zugabe von Dox kultiviert, zu denselben Zeitpunkten Zellen geerntet und ebenfalls die Transkriptmenge der Zielgene bestimmt. Wie in Abb. 4.23 zu beobachten war, schwankt die Grundexpression der Gene innerhalb der Zeitreihe, weshalb das folgende Ergebnis in Abb. 4.26 als x-fache Induktion für jeden Zeitpunkt der Zeitreihe dargestellt ist. Zum Vergleich ist die x-fache Regulation des vIRF4-Wildtyps mit abgebildet. Für Wildtyp und Mutante sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

**Abb. 4.26 (Folgende Seiten): vIRF4 reguliert EGR1 CBF1-abhängig.**

Untersucht wurde die CBF1-abhängige Regulation der durch vIRF4 induzierten Zielgene. Dazu wurde das Expressionsverhalten der Gene nach Expression einer nicht mehr CBF1-bindenden vIRF4-Mutante in der Zelllinie tet-vIRF4 mt-BC-1 dargestellt und mit dem Genexpressionsmuster des vIRF4-Wildtyps verglichen. Das Experiment erfolgte für jede Zelllinie in Form zwei parallel angesetzter Zeitreihen. In der einen Zeitreihe wurden Zellen ohne Dox und in der anderen mit Dox (1  $\mu\text{g/ml}$ ) kultiviert, zu sechs verschiedenen Zeitpunkten geerntet, RNA präpariert und in cDNA umgeschrieben. Für die Quantifizierung der Transkripte wurde eine *Real-time* PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt und die Transkriptmengen auf die Abundanz von G6PD-Transkripten normalisiert. Dargestellt ist jeweils der Quotient der relativen Transkriptmengen für Zellen kultiviert mit Dox/ohne Dox (x-fache Induktion) des jeweiligen Zeitpunkts für die gesamte Zeitreihe. Die Abbildung zeigt für die Analyse der Mutante und des Wildtyps den Mittelwert der x-fachen Induktion ( $\pm$  SD) aus zwei unabhängigen Experimenten. Um den Unterschied der x-fachen Induktion zwischen vIRF4-Wildtyp (wt) und vIRF4-Mutante (mt) nach 48 h besser zu verdeutlichen, ist der Quotient der x-fachen Induktion von vIRF4 wt zu vIRF4 mt nach 48 h angegeben (\*). Der Wert 1 beschreibt den Zustand bei dem weder Induktion noch Repression vorliegen (hier mit einer roten Linie markiert).





Bei einer CBF1-abhängigen Regulation sollte die Induktion der Zielgene durch vIRF4 nicht mehr möglich sein bzw. die Induktion durch die vIRF4-Mutante deutlich schwächer erfolgen als dies für vIRF4-Wildtyp gezeigt werden konnte.

In der Induktion von MAML2 zeigt sich der geringste Unterschied zwischen vIRF4-Wildtyp und vIRF4-Mutante, da MAML2 durch die Mutante nur 1,3-fach schlechter induziert wird. Für FAS und JUN ist nur ein 1,6-facher Unterschied zu erkennen und PDCD4 und RGS1 werden durch die Mutante 1,8-fach schlechter induziert. Hingegen ist für EGR1 ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Eine Induktion von EGR1 durch die vIRF4-Mutante war kaum mehr möglich und zwischen der Induktion durch vIRF4-Wildtyp und Mutante besteht ein 3,9-facher Unterschied.

Die Genregulation wurde von mir CBF1-abhängig definiert, wenn sich die x-fache Induktion zwischen Wildtyp und Mutante mindestens um den Faktor 2 unterschied. Dadurch erwies sich nur EGR1 als CBF1-abhängig reguliert. Der Unterschied um den Faktor 3,9 für EGR1 war überzeugend. Die EGR1-Induktion zeigte außerdem innerhalb der Zeitreihe keine Schwankungen. EGR1 stellt damit einen geeigneten Kandidaten für weitere molekulare Untersuchungen der Genregulation dar.

## 5 Diskussion

Das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus (KSHV) infiziert B-Zellen und persistiert dort im latenten Zustand. Der Großteil der KSHV-Gene wird nach Reaktivierung in der so genannten lytischen Phase des Virus exprimiert. KSHV ist mit drei malignen Tumoren assoziiert: einem endothelialen Tumor - dem Kaposi-Sarkom, und zwei seltener auftretenden Lymphomen - dem Primären Effusionslymphom (PEL) und der Multizentrischen Castleman-Erkrankung (MCD).

PEL-Zellen sind B-Zellen. Es existieren verschiedene Zelllinien, die ursprünglich aus dem Tumor von PEL-Patienten isoliert wurden und gut zu kultivieren sind. Aus diesen Gründen wird KSHV-Forschung verstärkt in PEL-Zellen betrieben.

In KSHV-infizierten PEL-Zellen wurde ein aktiver Notch-Signalweg beschrieben, der zum zellulären Phänotyp und zum Überleben der Zellen beiträgt (Chang et al., 2005a; Lan et al., 2006a; Lan et al., 2009; Lan et al., 2006b). Eine Modulation dieses Signalweges durch herpesvirale Proteine des EBV und KSHV ist seit geraumer Zeit bekannt. Die Modulation erfolgt häufig über das zentrale Effektorprotein des Notch-Signalweges – dem zellulären Adapterprotein CBF1. Eine Interaktion mit dem DNA-Bindeprotein CBF1 ist für die viralen Proteine EBNA2, EBNA3A, EBNA3B und EBNA3C aus EBV und die Proteine RTA und LANA des KSHV beschrieben. Die Arbeitsgruppe Kempkes konnte ein neues virales und lytisches Protein des KSHV als CBF1-Interaktionspartner identifizieren – den viralen Interferon regulatorischen Faktor 4 (vIRF4). Die Interaktion konnte von Barbara Scholz und mir unabhängig voneinander in verschiedenen Systemen gezeigt werden. In Folge dessen wurden unsere Doktorarbeiten ein Gemeinschaftsprojekt mit dem Ziel, die Interaktion von vIRF4 und CBF1 näher zu beschreiben, seine Rolle als transkriptionellen Regulator zu definieren und Hinweise auf die Funktion von vIRF4 zu erbringen. Für die Studien zu vIRF4 wurden von uns verschiedene Systeme und Zelllinien etabliert.

Meine Doktorarbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob vIRF4 ein Modulator des Notch-Signalwegs ist, es Einfluss auf die Expression zellulärer Gene nimmt und in diesem Zusammenhang möglicherweise die Notch-Signatur von PEL-Zelllinien modifiziert. In meiner Doktorarbeit konnte ich die vIRF4/CBF1-Interaktion näher charakterisieren, wobei die Bindestelle in vIRF4 kartiert und ein interessantes Bindemotiv entdeckt wurde. Daraufhin wurde von mir eine Mutante hergestellt, die nicht mehr an CBF1 binden kann und im zweiten Teil meiner Arbeit Verwendung fand. Die herpesviralen CBF1-Interaktionspartner RTA, LANA, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B und EBNA3C stellen allesamt transkriptionelle Regulatoren zellulärer Gene dar, von denen manche die Notch-Signatur modulieren. Deshalb führte ich im zweiten Teil meiner Arbeit erstmals eine genomweite Suche nach zellulären Zielgenen von vIRF4 durch. Für einen Satz ausgewählter Gene überprüfte ich die

CBF1-abhängige Regulation von vIRF4. Die Ergebnisse werden auf den folgenden Seiten diskutiert.

## A) Charakterisierung der vIRF4/CBF1-Interaktion

### 5.1 Spezifische Interaktion von vIRF4 mit CBF1

Das KSHV-Genom kodiert neben vIRF4 noch für drei weitere vIRFs (vIRF1 bis 3), die aufgrund von partiellen Sequenzhomologien zu zellulären Interferon regulatorischen Faktoren, zu der Gruppe der viralen Interferon regulatorischen Faktoren zusammengefasst werden. Auch wenn aus dieser Sequenzähnlichkeit nicht zwangsläufig eine ähnliche Funktion resultiert, sind die Proteine vIRF1 bis 3 in den zellulären Interferonsignalweg involviert und modulieren diesen über die Interaktion mit verschiedenen Komponenten des Signalweges. Für vIRF4 ist das Eingreifen in diesen Signalweg bislang nicht beschrieben worden. Eine mögliche vIRF4-vermittelte Inhibition der Interferon  $\beta$ -Induktion nach Sendai Virus-Infektion konnte nicht nachgewiesen werden (Kanno et al., 2006).

Durch die in der Arbeitsgruppe Kempkes neu entdeckte Interaktion von vIRF4 mit CBF1 konnte für vIRF4 erstmals eine Verknüpfung zu dem CBF1/Notch-Signalweg gezeigt werden. Die Bedeutung dieses Signalweges ist bereits ausführlich erläutert worden. Es stellte sich nun die Frage, ob auch die anderen vIRFs mit CBF1 interagieren würden, und es somit eine Eigenschaft ist, die sich alle vIRFs teilen. Zu Beginn meiner Doktorarbeit konnte ich durch Koimmunpräzipitationen in Säugerzellen zeigen, dass keines der anderen vIRFs in der Lage ist mit CBF1 zu interagieren. Demnach scheint die Interaktion eine spezifische Eigenschaft von vIRF4 zu sein, wodurch es sich klar von den anderen vIRFs abgrenzt. Als Nächstes wurde untersucht, ob die Interaktion auch nach endogener Expression von vIRF4 und CBF1 in KSHV-infizierten Zellen, genauer gesagt in PEL-Tumorzellen, darstellbar sei. Bis zu diesem Zeitpunkt war der Proteinkomplex ausschließlich nach transienter Transfektion und Expression, sowie unter Verwendung von HA-getagten vIRF4 Konstrukten gezeigt worden. Zunächst wurde das Expressionsmuster von vIRF4 in der Zelllinie BCBL-1 und für spätere Untersuchungen auch in der PEL-Zelllinie BC-1 in einer Zeitreihe von insgesamt 48 h definiert. Dazu wurde von mir ein vIRF4-spezifischer Antikörper im Labor etabliert. Beide Linien sind latent mit KSHV infiziert. Die Zelllinie BC-1 enthält zusätzlich noch das EBV Genom im latenten Zustand (Callahan et al., 1999; Chen et al., 1995; Tierney et al., 1994; Trivedi et al., 2004). Die Expression von EBV-Proteinen ist in den BC-1-Zellen auf EBNA1 und LMP2A beschränkt (Horenstein et al., 1997; Szekely et al., 1998; Trivedi et al., 2004). Die Frequenz der LMP1 Expression wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Callahan et al., 1999; Horenstein et al., 1997; Szekely et al., 1998). Die endogene Expression von vIRF4



konnte in beiden Linien nach Induktion des lytischen Zyklus nachgewiesen werden und zeigte in beiden Linien bis 48 h eine stetige Zunahme. Der Komplex von endogen exprimiertem vIRF4 und CBF1 konnte von mir in der Linie BCBL-1 nach Koimmunpräzipitationen dargestellt werden. Die Interaktion konnte von Barbara Scholz auch in BC-1-Zellen gezeigt werden. Es war zu beobachten, dass vIRF4 in BCBL-1 auch in der latenten Phase geringfügig exprimiert wird. Dies beruht auf einer Subpopulation von Zellen (2-5%), die spontan lytisch reaktivieren und in verschiedenen Publikationen erwähnt werden (Chen and Lagunoff, 2005; Mesri et al., 1996; Renne et al., 1998). Genaue Untersuchungen dazu gibt es bislang nicht. Auch wenn Reaktivierung unweigerlich zur Lyse der Zelle führt, ist sie nötig, um durch weitere Neuinfektionen den latenten Zustand zu etablieren. Dadurch wird die Langzeitpersistenz des Virus gewährleistet (Dyson et al., 2010; Lan et al., 2005b; Matsumura et al., 2005). Diese spontan lytische Subpopulation ist nur für die Linie BCBL-1 beschrieben, nicht jedoch für BC-1 Zellen. Da die Gesamtpopulation letzterer Zelllinie in ihrem Expressionsmuster stabiler ist, war sie für einige Untersuchungen besser geeignet und wurde deshalb im zweiten Teil dieser Arbeit verwendet.

## 5.2 Kartierung der CBF1-Bindestelle in vIRF4

Ziel dieser Arbeit war es eine mögliche Rolle von vIRF4 im Notch-Signalweg zu beschreiben. Für eine weitere Charakterisierung der vIRF4/CBF1-Interaktion, wurde die genaue Interaktionsregion in vIRF4 kartiert. Die Definition einer Interaktionsregion würde die Interaktion zusätzlich bestätigen. Darüber hinaus könnte die Sequenz dieser Region im Vergleich mit den kartierten Regionen in EBNA2 und Notch Hinweise zur Funktion liefern. Das Ziel war es außerdem, für spätere Studien eine vIRF4-Mutante zu generieren, die nicht mehr in der Lage ist CBF1 zu binden.

### 5.2.1 Die Interaktion von vIRF4 und CBF1 wird durch zwei distinkte Regionen des vIRF4 vermittelt

Die Kartierung der CBF1-Bindestelle in vIRF4 erfolgte parallel in zwei experimentellen Ansätzen: Eingesetzt wurden das Hefe-*Two-Hybrid*-System unter Verwendung verschiedener deletierter und trunkierter vIRF4-Fragmente und eine Peptidblot-Bindungsstudie. Die Peptidblot-Bindungsstudie diente der Feinkartierung und stellte eine Analyse kurzer linearer vIRF4-Epitope dar, die in ihrer Summe das gesamte vIRF4-Protein abdecken.

Die Untersuchungen der Hefe-*Two-Hybrid*-Experimente führten zu dem minimalen vIRF4-Fragment von As 201-240, welches allein mit CBF1 interagieren konnte. Eine weitere Deletion dieses Fragments in die beiden Subfragmente As 201-220 und As 221-240 führte in beiden Fällen zu keiner CBF1-Bindung mehr. Zusätzlich lieferte die Kartierung in Hefe Hinweise auf eine zweite Binderegion in anderen zentralen Bereichen des vIRF4-Proteins. Die Peptidblot-Bindungsstudie zeigte die mit Abstand stärkste CBF1-Bindung für das Peptid vIRF4 As 466-478. Überraschenderweise führte die in Hefe kartierte Binderegion von As 201-240 in der Peptidblot-Bindungsstudie zu keiner CBF1-Bindung. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der beiden Ergebnisse ist, dass das Bindepitop von vIRF4 As 201-240 ein Konformationsepitop darstellt, welches erst durch die Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins möglich wird. Als Nächstes wurde untersucht, welche Rolle die identifizierten Binderegionen bei Interaktion des gesamten vIRF4-Proteins mit CBF1 spielen. Eine zusätzlich durchgeführte Peptid-Bindungsstudie des vIRF4-Fragments As 466-478, in der jede der 15 Aminosäuren des Fragments im Wechsel gegen ein Alanin (A) ausgetauscht wurde, erbrachte den Hinweis, dass Tryptophan (W) und Prolin (P) wesentlich an der Bindung beteiligt sind. Deshalb wurden anschließend Deletions- und Punktmutanten von vIRF4 hergestellt, in denen in vIRF4 (i) As 201-240 deletiert war (vIRF4  $\Delta$  201-240), (ii) im Bereich von As 466-478 an As-Position 471 W gegen A und an As-Position 473 P gegen A ausgetauscht wurde (vIRF4 <sup>W471A/P473A</sup>), oder (iii) eine Doppelmutante mit einer Kombination aus beiden Mutationen (vIRF4  $\Delta$  201-240/ <sup>W471A/P473A</sup>) vorlag. Die Komplexbildung der drei Konstrukte mit CBF1 wurde mittels Koimmunpräzipitation in Säugerzellen und ihrer Darstellung im Westernblot untersucht. Es zeigte sich, dass nur die Mutanten vIRF4 <sup>W471A/P473A</sup> und vIRF4  $\Delta$  201-240/ <sup>W471A/P473A</sup> nicht mehr mit CBF1 interagieren konnten. Als Nächstes wurden die identifizierten Binderegionen vIRF4 As 201-240 und vIRF4 As 466-478 zur Verifizierung und Ermittlung der Bindungsstärke erneut in ein Hefe-*Two-Hybrid*-Experiment eingesetzt. Wie bereits unter 4.2.1.1 erläutert, ermöglicht das Hefe-*Two-Hybrid*-System eine grobe Abschätzung der Bindungsstärke der Interaktionspartner. Hier zeigte sich deutlich, dass die CBF1-Bindung mit vIRF4 <sup>W471A/P473A</sup> schwächer ist, jedoch eine CBF1-Bindung erst mit der Doppelmutante vIRF4  $\Delta$  201-240/ <sup>W471A/P473A</sup> unterbunden werden kann. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die Hefeextrakte nicht im Westernblot dargestellt und die Proteinmengen somit nicht quantifiziert wurden. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass von den Fragmenten generell ungleiche Mengen an Protein exprimiert werden, woraus ebenfalls ungleiche Signalstärken resultieren könnten.

## 5.2.2 Sequenzvergleich des hochaffinen vIRF4-Peptids mit dem von Notch und EBNA2

Für Notch ist bereits bekannt, welche Region bzw. Regionen an CBF1 binden. Durch biophysikalische Studien und Kristallstrukturanalysen des CBF1/Notch-Komplexes konnte in der RAM-Domäne von Notch ein Tetrapeptid (siehe Ergebnisse, Abb. 4.9), flankiert von basischen Aminosäuren, bestimmt werden, welches die hochaffine Bindung von Notch an CBF1 vermittelt und für die Bindung essentiell ist (Johnson et al., 2010; Kovall and Hendrickson, 2004; Lubman et al., 2007; Tamura et al., 1995). Ein Vergleich der CBF1-bindenden Tetrapeptide von Notch1, 2, 3 und 4 zeigten einen Consensus auf, mit dem auch das Tetrapeptid von EBNA2 Übereinstimmung findet (Kovall and Hendrickson, 2004; Ling and Hayward, 1995; Ling et al., 1993) und für die CBF1-Bindung essentiell ist (Johnson et al., 2010; Prabhu and Sharp, 2005; Wang and Samudrala, 2006).

In meinen Untersuchungen konnte für vIRF4 ein kurzes Peptid von 13 As im Bereich As 466-478 als interagierende Region ermittelt werden, wobei W (Position 471) und P (Position 473) wesentlich an der CBF1-Bindung beteiligt sind. Ein Aminosäureaustausch an diesen Positionen führte zu einer deutlichen Verminderung der Bindung, was Studien sowohl in Hefe als auch Koimmunpräzipitationen in Säugerzellen belegen. Betrachtet man nun den Consensus der Notch- und EBNA2-Interaktionspeptide –  $\Phi W \Phi P$ , wobei  $\Phi$  für eine beliebige hydrophobe Aminosäure steht – so sieht man, dass das Tetrapeptid VWHP von vIRF4 mit diesem große Übereinstimmung zeigt. Allerdings entspricht das vIRF4-Tetrapeptid nicht ganz dem Consensus von Notch und EBNA2, da es sich bei Histidin um keine hydrophobe, sondern um eine positiv geladene Aminosäure handelt. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass vIRF4 mit einer ähnlichen Sequenz und dem gleichen Mechanismus an CBF1 bindet. Gestützt wird diese Theorie durch Daten meiner Kollegin Barbara Scholz, welche durch Koimmunpräzipitationen mit verschiedenen CBF1-Mutanten zeigen konnte, dass vIRF4 mit der hydrophoben Tasche der BTD von CBF1 interagiert. Diese Daten zur Interaktion von vIRF4 mit CBF1 konnten von uns in einer Koautorenschaft publiziert werden (Heinzelmann et al., 2010). An dieselbe hydrophobe Tasche von CBF1 binden auch Notch und EBNA2. Betrachtet man außerdem die publizierte Struktur von CBF1/RAM näher, so hat es den Anschein, als ob die betreffende hydrophobe Aminosäure an Position vier in ihrer Orientierung nicht der hydrophoben Tasche zugewandt sei (Wilson and Kovall, 2006). Die zweite identifizierte Interaktionsregion in vIRF4 von As 201-240 zeigte nach alleiniger Deletion kaum eine Verschlechterung der CBF1-Bindung (siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.2.4.2, Abb. 4.8). Bei genauer Betrachtung der Aminosäuresequenz findet sich auch hier ein Tetrapeptidmotiv mit der Sequenz VWIP an Aminosäure-Position 203-206. Neben W und P an Position zwei und vier, werden Position eins und drei von hydrophoben Aminosäuren besetzt. Dieses Motiv entspricht demnach dem Consensus von Notch und EBNA2. Dennoch

scheint dieses besser passende Motiv für die Bindung eine untergeordnete Rolle zu spielen. Sollte es sich bei diesem Peptid um ein ebenso wichtiges Motiv handeln, wäre zu erwarten gewesen, dass zum einen das Fragment vIRF4 As 201-220 an CBF1 hätte binden müssen und zum anderen die Deletion des Fragments vIRF4 201-240 im gesamten vIRF4-Protein eine deutlichere Verschlechterung für die CBF1-Bindung zur Folge gehabt hätte. Hinzu kommt, dass die Analyse linearer vIRF4-Epitope in der Peptidblot-Bindungsstudie für dieses Tetrapeptid zu keiner positiven vIRF4-Interaktion führte. Demnach scheint das Tetrapeptidmotiv an Position 203-206 nicht an der CBF1-Bindung beteiligt zu sein. Vielmehr sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Bindung des Fragments vIRF4 As 201-240 über ein Konformationsepitop erfolgt, welches erst nach Faltung des Proteins entsteht. Dass das Fragment bei der Interaktion von vIRF4 und CBF1 dennoch von Bedeutung zu sein scheint, zeigt der Vergleich der CBF1-Bindung zwischen der Einfachmutante vIRF4<sup>W471A/P473A</sup> und der Doppelmutante vIRF4<sup>Δ 201-240/ W471A/P473A</sup>. Das Hefeexperiment macht deutlich, dass nicht vIRF4<sup>W471A/P473A</sup> allein, sondern nur vIRF4<sup>Δ 201-240/ W471A/P473A</sup> eine CBF1-Bindung unterbinden kann. Das bedeutet, dass As 201-240 eine in der Bindung wichtige unterstützende Funktion hat.

Eine ähnliche Situation ist für Notch beschrieben. Notch bindet über zwei Regionen an CBF1 (Nam et al., 2003). Wie bereits erwähnt, wird die hochaffine Bindung an CBF1 über das Tetrapeptidmotiv in der RAM-Domäne vermittelt. Durch die RAM-Bindung kommt es in CBF1 zu Konformationsänderungen, wodurch ANK in unmittelbare Nähe zu seiner Bindestelle in der C-terminalen Domäne von CBF1 gebracht und die Bindung dadurch ermöglicht wird (Bertagna et al., 2008). Die ANK-Bindung bewirkt die Rekrutierung von MAML zur weiteren Stabilisierung und als Koaktivator an den Komplex (Del Bianco et al., 2008; Nam et al., 2006; Nam et al., 2003; Wilson and Kovall, 2006). Der Beitrag von ANK ist demnach in der Komplexbildung und für die weitere Aktivierung sehr wichtig. Es wäre möglich, dass ein ähnlicher Fall auch für vIRF4 vorliegt und die Bindung von vIRF4 As 201-240 den gesamten vIRF4/CBF1-Komplex stabilisiert. Bislang gibt es keine Strukturanalysen in welchen der Komplex viraler Proteine mit CBF1 dargestellt ist. Dies würde Aufschluss über die genaue Interaktion bringen und helfen den Komplex und die Modulation des Notch-Signalweges durch virale Proteine auf dieser Ebene besser verstehen zu können.

Wie die Daten des ersten Abschnitts meiner Doktorarbeit zeigten, bindet vIRF4 über ein ähnliches Motiv an CBF1 wie Notch und EBNA2. EBNA2 konkurriert über die CBF1-Bindung mit Notch und greift so in den Notch-Signalweg ein (Übersicht: Hayward et al., 2006). EBNA2 ist auch wie Notch ein transkriptioneller Regulator. Für EBNA2 und Notch sind eine Reihe an zellulären Zielgenen publiziert worden. Wie eine Analyse der Zielgendaten zeigte, findet sich hier eine Überlappung, wonach Notch-Zielgene auch durch EBNA2 reguliert werden. In Anbetracht dessen wurde im zweiten Teil meiner Arbeit erstmals eine genomweite Suche

nach zellulären Zielgenen von vIRF4 vorgenommen, um zu untersuchen, ob vIRF4 über seine Bindung an CBF1 einen ähnlichen Mechanismus für die Regulation von Zielgenen benutzt und eine Regulation zellulärer Notch-Zielgene über CBF1 erfolgt.

## B) Identifizierung von zellulären Zielgenen des vIRF4-Proteins

### 5.3 Affymetrix-Genexpressionsanalyse unter Verwendung eines konditionalen Zellsystems

Im zweiten Abschnitt meiner Arbeit sollten erstmals zelluläre Zielgene von vIRF4 identifiziert werden. Da die Rolle von vIRF4 als transkriptioneller Regulator bis dahin völlig unklar war, müssen die durchgeführten Genexpressionsanalysen und die folgende Bestätigung der potentiellen Zielgene von vIRF4 als Pilotstudien betrachtet werden, in denen grundlegend die Bedeutung von vIRF4 in der zellulären Zielgenregulation definiert wurde.

Die Identifizierung von vIRF4-Zielgenen erfolgte unter Verwendung eines konditionalen Zellsystems. In dem System steht die Expression von vIRF4 unter Kontrolle eines Doxycyclin-abhängigen Promotors. Das Vektorsystem wurde von Barbara Scholz stabil in die PEL-Zelllinie BC-1 transfiziert, welche latent mit KSHV und EBV infiziert ist. Für Untersuchungen der CBF1-abhängigen Regulation wurde auch die vIRF4-Mutante (diskutiert unter 5.2.1) in das konditionale Vektorsystem überführt und eine stabile Zelllinie, tet-vIRF4 mt-BC-1 genannt, etabliert. Vor weiteren Untersuchungen wurden die Expression und die subzelluläre Lokalisation von vIRF4-Wildtyp und vIRF4-Mutante verglichen, um zu beurteilen, ob eine gleichstarke Transkriptregulation durch Wildtyp und Mutante überhaupt möglich ist.

#### 5.3.1 Konfokalstudien und Zellfraktionierung

In der Literatur ist beschrieben, dass vIRF4 nach Transfektion und nach endogener Expression in KSHV-positiven Zellen sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma subzellulär lokalisiert ist, wobei mehr vIRF4 im Kern detektiert wird (Kanno et al., 2006; Sander et al., 2008). Die subzelluläre Lokalisation des vIRF4 ist auch von der An- und Abwesenheit viraler Interaktionspartner abhängig (Sander et al., 2008). In meiner Arbeit wurden Pilotstudien zur subzellulären Lokalisation von vIRF4-Wildtyp und vIRF4-Mutante durchgeführt, um für spätere Studien der Transkriptregulation zu überprüfen, ob Wildtyp und auch Mutante im Kern lokalisiert sind. Dafür wurden Konfokalmikroskopiestudien auf Einzelzellniveau und Zellfraktionierungen zur Quantifizierung der Proteinmengen durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten nach Transfektion von HeLa-Zellen. Beide Versuche zeigten, dass

vIRF4-Wildtyp und vIRF4-Mutante sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert sind. Die von mir durchgeführten Studien mit Hilfe der Konfokalmikroskopie machten deutlich, dass sowohl für vIRF4-Wildtyp als auch für vIRF4-Mutante drei Zustände der subzellulären Lokalisation unterschieden werden können, wonach vIRF4-Wildtyp oder vIRF4-Mutante nach Transfektion nicht spezifisch im Kern oder im Zytoplasma nachweisbar sind. Das Ergebnis der Konfokalmikroskopie zeigte eine für die Mutante und den Wildtyp unterschiedliche Verteilung, wonach der Wildtyp seltener eine vorwiegende Kernlokalisierung aufweist. In publizierten Daten von Kanno und Kollegen wurde vIRF4-Wildtyp nach Transfektion in HeLa-Zellen vorwiegend im Kern detektiert (Kanno et al., 2006). Allerdings wurde der Versuch nicht unter den exakt gleichen Parametern durchgeführt. Des Weiteren ist auch nicht klar aus wie vielen Einzelzellanalysen die Prozentsätze der einzelnen Fraktionen ermittelt wurden. Bei der Unterscheidung der drei Zustände handelt es sich außerdem um so feine Unterschiede, dass die Konfokalmikroskopie zur Lokalisationsbestimmung für ein Protein, welches in beiden Kompartimenten vorkommt, nicht geeignet erscheint. Hinzu kommt, dass eine Quantifizierung unter diesen Bedingungen schwer möglich ist, da die Volumenverhältnisse von Kern zu Zytoplasma nicht bekannt sind.

Die Zellfraktionierung zeigte, dass der Mutante im Kern eine gleich starke Expression zugeschrieben werden kann. Unter Berücksichtigung eines technischen Problems in diesem Experiment mit dem „Fusion“-Gerät, welches nur in diesem Experiment vorlag, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Wildtyp geringfügig stärker im Kern auftritt. Der Unterschied ist aber nicht drastisch.

Festzuhalten bleibt, dass die Mutante auch im Kern nachzuweisen ist, was Konfokalstudien und Zellfraktionierung zeigten.

### 5.3.2 Identifizierung von vIRF4-Zielgenen

Zur Identifizierung von vIRF4-Zielgenen wurden zwei Genexpressionsanalysen auf Basis der Affymetrix-Technologie durchgeführt und die Genexpressionsprofile auf RNA-Ebene in An- und Abwesenheit von vIRF4 verglichen. Die Untersuchungen erfolgten in BC-1-Zellen, die ein konditionales Dox-abhängiges vIRF4-Protein exprimieren. BC-1-Zellen sind PEL-Zellen, die latent mit KSHV und EBV infiziert sind, wodurch es zur Expression der latenten EBV-Proteine EBNA1 und LMP2A kommt (siehe 5.1).

Den beiden Affymetrix-Screens liegen zwei verschiedene experimentelle Ansätze zugrunde. Im sogenannten GeRNA (Gesamt-RNA)-Screen sollte untersucht werden, welche zellulären Gene durch vIRF4 nach 48 h reguliert werden. Transkriptionelle Regulation, d.h. die Induktion oder Repression von Genen findet meist in einem bestimmten Zeitfenster statt. Das ist abhängig von dem jeweiligen Protein und von dem Zustand der Zelle. Da bislang keine Zielgene von vIRF4 publiziert sind, war auch bei Planung des Experiments nicht bekannt, in

welchem Zeitfenster vIRF4 die stärkste Regulation zeigen würde. Es wurde deshalb eine relativ lange Zeitspanne von 48 h gewählt, in der Hoffnung, dass sich Effekte in dieser Zeit aufsummieren würden. Auf diesem Weg sollte generell die Funktion von vIRF4 als Modulator der Genexpression definiert und vIRF4-regulierte Zielgene identifiziert werden. Der Aufbau des NaRNA-Screens unterschied sich vom GeRNA-Screen in zwei wesentlichen Aspekten: Die Untersuchung des Genexpressionsprofils in Anwesenheit von vIRF4 erfolgte in einer Zeitreihe von insgesamt 48 h zu sechs verschiedenen Zeitpunkten, allerdings in Einzelwerten. Das sollte die Möglichkeit bieten, den Zeitraum der Regulation weiter einzugrenzen. Darüber hinaus wurde für die Analyse nur nascente RNA herangezogen und somit die vIRF4-induzierte *de novo* Synthese von RNA bzw. die vIRF4-vermittelte Repression der Gentranskription untersucht. Für vIRF4 ist in der Literatur die Interaktion mit dem Poly-A-Bindeprotein (PABP) beschrieben (Kanno et al., 2006). PABP ist ein Protein, welches die Prozessierung, Stabilität und den Export von polyadenylierten RNAs, sowie die Initiierung der Translation beeinflusst (Guhaniyogi and Brewer, 2001; Kuyumcu-Martinez et al., 2004; Übersicht: Smith and Gray, 2010). Eine Kolokalisation des Komplexes konnte nur im Kern beobachtet werden, während vIRF4 und PABP im Kern und im Zytoplasma nachgewiesen werden konnten. Darauf basierend postulierte die Gruppe von Katano, dass vIRF4 möglicherweise auf die Stabilität zellulärer Transkripte einwirkt (Kanno et al., 2006). Durch die Verwendung nascenter RNA sollte in diesem Versuch sichergestellt werden, dass auftretende Effekte ursächlich auf eine Transkriptregulation durch vIRF4 zurückzuführen sind und nicht Resultat einer Transkriptstabilisation sind.

### 5.3.3 Bestimmung des vIRF4-regulierten Genexpressionsprofils anhand der Affymetrix-Microarraydaten

Um zunächst eine allgemeine Beurteilung der Screens vornehmen und gleichzeitig beide miteinander in Bezug setzen zu können, erfolgte die Auswertung in dieser Arbeit in beiden Screens bezogen auf den Messwert von 48 h Zellkultur, in Gegenwart bzw. Abwesenheit von vIRF4. Im GeRNA-Screen wurden Effekte im Expressionsmuster der Zellen nach einer vIRF4-Expression sowohl von 48 h im Vergleich zu 0 h, als auch von 48 h im Vergleich zu 48 h kultivierter Zellen ohne vIRF4-Expression in der Analyse berücksichtigt und die Gene ermittelt, die 1,5-Fach mit  $p < 0,05$  differentiell reguliert wurden. Im NaRNA-Screen konnte die Auswertung nur von 48 h zu 0 h erfolgen. Aus finanziellen Gründen konnte leider weder der GeRNA- noch der NaRNA-Screen in gut abgesicherten Mehrfachwerten bzw. im GeRNA-Screen nur in Duplikaten durchgeführt werden. Eine statistische Auswertung war dadurch schwierig bzw. für den NaRNA-Screen nicht möglich, weshalb die hier

durchgeführten Genexpressionsanalysen als Vorversuche zur Zielgenidentifizierung betrachtet werden müssen.

Beide Screens zeigten im Ergebnis eine ähnliche Zahl an regulierten Genen. Von den 1107 regulierten Genen des GeRNA-Screens wurden 482 induziert und 625 reprimiert. Im NaRNA-Screen wurden von den insgesamt 1219 regulierten Genen 310 induziert und 909 reprimiert. Interessant zu beobachten war hier die Regulation im zeitlichen Verlauf. Während die induzierten Gene erst gegen Ende der Zeitreihe reguliert wurden, erfolgte die Regulation für einen Teil der reprimierten Gene abrupt zu Beginn der Zeitreihe. Es wurden aber auch Gene erst nach 48 h reprimiert. Zusätzlich waren im NaRNA-Screen unter den reprimierten Genen vermehrt Schwankungen zu beobachten. Eine Reihe von Genen wurden innerhalb der Zeitreihe durch vIRF4 zu Beginn reprimiert, daraufhin induziert und erneut reprimiert. Dass vIRF4 zu verschiedenen Zeitpunkten Gene reguliert wäre zwar denkbar, jedoch ist ein mehrfacher Wechsel von Repression und Induktion eher unwahrscheinlich und lässt auf Schwankungen im Grundexpressionsniveau schließen, die ursächlich nicht auf eine vIRF4-Regulation zurückzuführen sind. Es war zu beobachten, dass ein Großteil der reprimierten Gene nach 6 oder 12 h reguliert wird, während die induzierten Gene, die ab 18 h eine deutliche Induktion zeigen wohl in einem anderen Zeitfenster reguliert werden. Die Reihenfolge von Repression und Induktion könnte für zelluläre Prozesse von Bedeutung sein. Ein Problem stellt die Annotation der Gene dar. Von den 1107 Genen im GeRNA-Screen lag nur für 738 Gene eine Annotation mit voller Geninformation vor. Von den 369 nicht-annotierten Genen sind 295 auch ohne Transkriptinformation. Im NaRNA-Screen waren von 1219 Genen sogar nur 407 voll annotiert. Um in Zukunft auch funktionelle Studien zur Genregulation durchführen zu können, erfolgte die Eingrenzung weiterer Kandidatengene anhand der annotierten Gene. Somit konnte ein Großteil der Gene nicht weiter berücksichtigt werden.

Um das Ergebnis der beiden Screens zusammen zu fassen, wurden die Gene ermittelt, die in beiden Analysen reguliert waren. Dadurch sollte auch erreicht werden, dass unter den annotierten Genen diejenigen herausgegriffen werden, die in beiden Genexpressionsanalysen erfasst wurden und somit am stärksten und sichersten durch vIRF4 reguliert werden. Die Überlappung lag lediglich bei 195 Genen. Erfreulich jedoch war, dass diese im GeRNA- und im NaRNA-Screen regulierten Gene dieselbe Tendenz bezüglich Induktion (106/195) und Repression (72/195) zeigten. Dadurch war es möglich aus diesem kleineren Satz an Genen geeignete Kandidatengene heraus zu greifen und deren Regulation in Folgeexperimenten zu bestätigen und weiter zu untersuchen.

Auch wenn vIRF4 eine Vielzahl an Genen zu regulieren scheint, muss gleichzeitig erwähnt werden, dass verglichen mit EBNA2 oder EBNA3A die Amplitude der Regulation gering ist und vIRF4 deshalb nicht als starker Regulator zellulärer Zielgene in Erscheinung tritt. So



wurden im GeRNA-Screen nur 14 Gene 4-fach mit  $p < 0,05$  und im NaRNA-Screen nur neun Gene 4-fach reguliert. Diese Gene zeigten dabei nur für EGR1 eine Überlappung. Das Maximum der Regulation lag im 5-fachen Bereich. Im Vergleich dazu wurden in einer zellulären Zielgenanalyse von EBNA3A, 66 Gene mindestens 4-fach mit  $p \leq 0,01$  reguliert, unter denen sich Gene fanden, die 30-fach reguliert wurden (Hertle et al., 2009). Ähnlich verhält es sich mit EBNA2. Auch in der Microarrayanalyse von EBNA2 war eine hohe Amplitude in der Regulation beobachtet worden, die oft in einem 100-fachen Bereich lag (Maier et al., 2006).

Die oben beschriebene Eingrenzung von vIRF4-Zielgenen unter Berücksichtigung beider Microarrayanalysen erschien deshalb sinnvoller, als stattdessen strengere Regulationskriterien anzuwenden.

#### **5.4 Bestätigung der vIRF4-Regulation ausgewählter Zielgene**

Aus dem kleineren Satz von 195 Genen, die in beiden Genexpressionsanalysen durch vIRF4 reguliert waren, wurden zur weiteren Bestätigung Gene ausgewählt, die besonders stark reguliert wurden oder funktionell interessant erschienen. Die Regulation der ausgewählten Zielgene sollte in mehreren unabhängigen Experimenten verifiziert werden. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden: (i) Ist die Regulation ursächlich auf vIRF4 und nicht auf einen indirekten Effekt von Dox zurückzuführen, (ii) kann ein Zeitfenster zur Regulation definiert werden und ist dies auch ein Resultat der vIRF4-Regulation und nicht ein Nebeneffekt höherer Zelldichte und (iii) erfolgt die vIRF4-Regulation CBF1-abhängig? Ziel war es unter den bestätigten Genen ein geeignetes Kandidatengen für weitere Studien der Regulation zu finden. Zur Beantwortung der Fragen wurde in dem gleichen zellulären System ein Experiment unter Berücksichtigung der Ausgangsbedingungen beider Screens durchgeführt. In einer Zeitreihe von 0 bis 48 h wurde in der Zelllinie tet-vIRF4-BC-1 zu sechs verschiedenen Zeitpunkten das Expressionsprofil der Kandidatengene in Anwesenheit von vIRF4 bestimmt. Parallel erfolgte die Untersuchung über denselben Zeitraum in Abwesenheit von vIRF4, um Effekte, die aufgrund einer höheren Zelldichte entstehen, ausschließen zu können. Zusätzlich wurde in der Leervektorlinie tet-leer-BC-1 das Expressionsmuster der potentiellen Zielgene mit und ohne Zugabe von Dox in einer Zeitreihe von 48 h bestimmt. So sollte überprüft werden, ob Effekte möglicherweise durch Dox ausgelöst werden und nicht das Resultat einer transkriptspezifischen vIRF4-Regulation sind.

#### 5.4.1 Ist vIRF4 ein Repressor?

Vorversuche von Barbara Scholz in der Arbeitsgruppe Kempkes lieferten Hinweise, dass vIRF4 über Repressoreigenschaften verfügt. In einem GAL4-abhängigen Reportergensystem konnte vIRF4 die Basisaktivität eines Reporters knapp 3-fach reprimieren (unveröffentlichte Daten, Barbara Scholz). In weiteren Versuchen mit einem CBF1-abhängigen Reportergensystem zeigte vIRF4 keine Repressoraktivität. Das gleiche Phänomen war für das EBV-Protein EBNA3A beobachtet worden. Auch hier besaß EBNA3A nur in einem GAL4-abhängigen Reportergensystem Repressorfunktion. Eine von meiner Kollegin Marie Hertle durchgeführte zelluläre Genexpressionsanalyse für EBNA3A zeigte jedoch, dass es durchaus als Repressor fungiert, was in *Real-time* PCR-Experimenten bestätigt werden konnte (Hertle et al., 2009).

Deshalb wurde untersucht, ob auch potentiell reprimierte Zielgene von vIRF4 als solche verifiziert werden könnten. Zunächst wurden die gut regulierten und funktionell interessanten Gene OAS2 und MYC untersucht. Für beide Gene konnte zwar in der Linie tet-vIRF4-BC-1 eine differentielle Regulation (MYC 2,7-fach; OAS2 1,7-fach) bestätigt werden, jedoch sind die beobachteten Effekte sehr schwach. Die Repression von MYC konnte außerdem nicht eindeutig auf vIRF4 zurückgeführt werden, da auch in der Kontrolllinie tet-leer-BC-1 nach Zugabe von Dox, aber ohne Expression von vIRF4, eine 2-fache Repression zu verzeichnen war. Die zunehmende Repression durch Dox allein führte zu der Frage, ob Dox möglicherweise toxisch auf die Zellen wirkt. In einem anschließenden Experiment wurde deshalb überprüft, ob unter den gewählten Versuchsbedingungen eine Zunahme toter Zellen zu verzeichnen ist. Dazu wurde in Zellen der Linie tet-vIRF4-BC-1, tet-vIRF4 mt-BC-1 und tet-leer-BC-1 eine Titration mit verschiedenen Dox-Konzentrationen durchgeführt und die Zahl toter Zellen im FACS detektiert. Der Versuch führte zu dem Ergebnis, dass die mit steigenden Konzentrationen an Dox zunehmende Überexpression von vIRF4-Wildtyp bzw. vIRF4-Mutante zu einem deutlichen Anstieg toter Zellen in den Linien tet-vIRF4-BC-1 und tet-vIRF4 mt-BC-1 führt und somit toxisch wirkt. In der Linie tet-leer-BC-1, in der vIRF4 nicht exprimiert wird, führte eine steigende Dox-Konzentration zu keinem bzw. im Vergleich zu vIRF4 vernachlässigbarem Effekt auf den Zustand der Zellen. Demnach zeigen vIRF4-Wildtyp und vIRF4-Mutante vergleichbare Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen, wodurch diesbezüglich kein Zusammenhang mit dem CBF1/Notch-Signalweg hergestellt werden kann. Mit Verringerung der Dox-Konzentration nahm auch die Toxizität kontinuierlich ab. Bei der in dem Experiment verwendeten niedrigsten Menge von 25 ng/ml Dox, liegt jedoch im Vergleich zu chemisch induzierten Zellen immer noch eine Überexpression von vIRF4 vor (siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.4.1). Der toxische Effekt auf die Zellen ist deshalb vermutlich nur ein Nebeneffekt der starken Überexpression von vIRF4.

In den bisherigen Versuchen zur Zielgenregulation waren immer Konzentrationen von 1 µg/ml Dox eingesetzt worden, da nur so die Frequenz induzierter Zellen bei 90 % lag. Bei Wiederholung des Experiments mit einer geringeren Dox-Konzentration von 25 ng/ml konnte keines der ausgewählten reprimierten Zielgene verifiziert werden. Allerdings liegt bei 25 ng/ml Dox immer noch eine Überexpression von vIRF4 vor, wodurch zu erwarten gewesen wäre, einen Effekt immer noch erkennen zu können. In diesem System kann nicht untersucht werden, ob vIRF4 über Repressoreigenschaften verfügt, da hier nie die Bedingung gewählt werden kann, bei der mehr als 85 % der Zellen induziert sind und gleichzeitig kein oder nur ein minimaler toxischer Effekt vorliegt. Ob vIRF4 als Repressor fungiert bleibt offen und muss nach Möglichkeit in einem alternativen Zellsystem untersucht werden. Letztendlich muss gesagt werden, dass keine messbaren Effekte beobachtet wurden, die nicht auch durch die toxische Überexpression von vIRF4 erklärt werden könnten. Die sehr niedrige Amplitude der Signalveränderung, sowohl in der Array-Hybridisierung, als auch nach Quantifizierung mit der *Real-time* PCR, sowie die vielen sekundären Effekte, wie Schwankungen im Array und in der Linie tet-leer-BC-1 lassen jedoch vermuten, dass vIRF4 keine große Rolle als Repressor zugeschrieben werden kann.

Es darf natürlich an dieser Stelle nicht vergessen werden, dass vIRF4 möglicherweise auch Gene induziert, die mit Toxizität und Apoptose in Verbindung stehen. Hier wäre z.B. PDCD4 zu nennen. PDCD4 (*programmed cell death 4*) wird während dem Prozess der Apoptose hoch exprimiert. Mittlerweile gilt seine Funktion als Tumorsuppressor als unumstritten. PDCD4 selbst wird auf komplexe Weise auf Ebene der Transkription und Translation reguliert, wie z.B. durch microRNA-21 (miR-21), welche in verschiedensten Tumoren überexprimiert wird (Chen et al., 2003; Lankat-Buttgereit and Goke, 2009; Reis et al., 2010). Wie gesagt, kann bisher nicht davon gesprochen werden, dass vIRF4 eine proapoptotische Funktion besitzt. Natürlich muss jedoch für die Zukunft ein möglicher Beitrag in diese Richtung durch Regulation proapoptotischer Gene, wie z.B. PDCD4 in Betracht gezogen werden. Dem gegenüber steht, dass von Lee und Kollegen gezeigt wurde, dass vIRF4 in PEL-Zellen durch seine Bindung an MDM2 eine antiapoptotische Funktion einnimmt (Lee et al., 2009). Gleichzeitig wäre es auch möglich, dass aufgrund der toxischen Überexpression von vIRF4, die Transkriptzunahme von PDCD4 nicht ursächlich auf vIRF4 zurückzuführen ist, sondern vielmehr ein indirekter Effekt anderer zellulärer Stimuli, ausgelöst durch Apoptose, ist.

#### 5.4.2 Verläuft die Induktion zellulärer Gene CBF1-abhängig?

Im Folgenden werden die Ergebnisse der durch vRF4 induzierten Gene EGR1, FAS, JUN, MAML2, PDCD4 und RGS1 diskutiert. Die Induktion der Gene wurde wie bei Bestätigung der reprimierten Gene in dem konditionalen System der Linien tet-vIRF4-BC-1 und tet-leer-BC-1

in An- und Abwesenheit von vIRF4 in einer Zeitreihe durch Quantifizierung der Transkriptmengen in *Real-time* PCR überprüft. Im Anschluss daran wurde die CBF1-abhängige Regulation der Gene durch vIRF4 in der Linie tet-vIRF4 mt-BC-1 untersucht. Das Ergebnis wird auf den nächsten Seiten mit diskutiert.

Aufgrund der Tatsache, dass die relativen Transkriptmengen innerhalb der Zeitreihe auch in Abwesenheit von vIRF4, je nach Gen und Experiment, leichte Abweichungen zeigten, wurde die Beurteilung einer x-fachen Induktion zum jeweiligen Zeitpunkt vorgenommen. Die Ergebnisse der beiden Genexpressionsanalysen konnten für ausgewählte potentiell induzierte Gene in zwei unabhängigen Zeitreihen in der Linie tet-vIRF4-BC-1 durch *Real-time* PCR bestätigt werden. Die Amplitude der x-fachen Induktion lag für das jeweilige Gen in beiden Experimenten etwa im selben Bereich. Die Gene untereinander wiederum wurden unterschiedlich stark reguliert. Die, mit einer 2- bis 3-fachen Induktion, schwächste Gruppe, setzt sich aus den Genen FAS, MAML2, PDCD4 und RGS1 zusammen. Eine 6-fache Regulation durch vIRF4 war für JUN beobachtet worden. Mit einer knapp 20-fachen Induktion zeigte sich die mit Abstand stärkste Regulation durch vIRF4 in der Expression von EGR1. Die Werte zeigten zudem über die Zeit eine stabile Zunahme der Induktion. Durch Dox allein zeigten die Gene in der Linie tet-leer-BC-1 keine Regulation. Für den Großteil der Gene nahm die Transkriptmenge erst ab Mitte der Zeitreihe, nach etwa 18 h zu und die stärkste Induktion war erst nach 48 h zu verzeichnen. JUN zeigte erst nach 48 h eine deutliche, aber dafür starke Transkriptzunahme. Diese späte Induktion der Gene deckt sich mit den Arraydaten des NaRNA-Screens, in welchem die Transkriptmenge der induzierten Gene generell erst gegen Ende der Zeitreihe stark anstieg. Insgesamt waren die Effekte in der Bestätigung stärker als im Screen. Die Zeitreihe wurde in meinen Experimenten nur für 48 h durchgeführt, da bis dahin keine Daten zum zeitlichen Verlauf der Regulation vorlagen. Anhand der Ergebnisse kann nicht beurteilt werden, wann ein Maximum der Induktion erreicht ist. Auch wenn über Regulation keine allgemeingültige Aussage zum zeitlichen Verlauf für jedes Protein oder Zielgen getroffen werden kann, so weist die „späte“ Regulation nach 48 h dennoch auf eine indirekte Genregulation durch vIRF4 hin. Um dies zu überprüfen sind natürlich weitere Untersuchungen nötig. Die Ergebnisse zeigen, dass die ausgewählten Gene in der Linie tet-vIRF4-BC-1 durch vIRF4 reguliert werden. Am überzeugendsten erwies sich in diesen Experimenten die Regulation von EGR1.

Auch wenn vIRF4 in den Genexpressionsanalysen nicht als starker Regulator in Erscheinung trat und die Frage, ob vIRF4 ein Repressor ist, anhand des Systems und der Arraydaten nicht beantwortet werden kann, konnte die Regulation durch vIRF4 für ausgewählte potentiell induzierte Zielgene in der konditionalen Zelllinie tet-vIRF4-BC-1 bestätigt werden.

Um zu untersuchen, welche vIRF4-Zielgene in Abhängigkeit von CBF1 reguliert werden, wurde die Zelllinie tet-vIRF4 mt-BC-1 herangezogen. Diese war basierend auf den Daten des

ersten Teils meiner Doktorarbeit etabliert worden und ermöglicht die konditionale Expression einer vIRF4-Mutante, die nicht mehr an CBF1 binden kann. Sollte die Regulation CBF1-abhängig erfolgen, so würde die nach Expression von vIRF4-Wildtyp beobachtete Induktion oder Repression der Zielgene nach Expression der vIRF4-Mutante nicht reproduzierbar sein. Es wurde von mir festgelegt, dass eine CBF1-abhängige Regulation dann gegeben ist, wenn die Induktion der Zielgene durch die vIRF4-Mutante mindestens um die Hälfte schwächer erfolgt als durch den Wildtyp. Die Gene FAS, MAML2, JUN, PDCD4 und RGS1 zeigten bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine nur geringfügig schwächere Induktion (knapp 2-fach). Für EGR1 hingegen war der mit Abstand stärkste Effekt mit einem 3,9-fachen Induktionsunterschied zwischen Wildtyp und Mutante zu erkennen. Deshalb weist dieses Experiment stark darauf hin, dass die Induktion von EGR1 CBF1-abhängig erfolgt. Anhand der bisher durchgeführten Versuche zeichnet sich EGR1 als geeignetes Kandidatengenen für weitere Untersuchungen ab.

Von Beginn an lag der Fokus der Arbeit darauf, CBF1-abhängig regulierte Zielgene zu identifizieren und ein geeignetes Kandidatengenen zu finden, an dem der molekulare Mechanismus der Regulation in zukünftigen Studien untersucht werden kann. Von den bestätigten vIRF4-Zielgenen verlief die Regulation für MAML2 und FAS CBF1-unabhängig und auch für JUN, PDCD4 und RGS1 konnte keine überzeugende und eindeutige CBF1-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Natürlich kann die Rekrutierung von vIRF4 an den Promotor auch über andere Transkriptionsfaktoren erfolgen. Hinzu kommt, dass zwar für vIRF4 eine DNA-Bindung bislang nicht beschrieben, jedoch auch nicht widerlegt wurde.

## **5.5 vIRF4 als Regulator zellulärer Zielgene**

### **5.5.1 Werden durch vIRF4 auch Notch-Zielgene reguliert?**

Eine Gemeinsamkeit unter den Herpesviren EBV und KSHV stellt die Interaktion viraler Proteine mit CBF1 dar. Auf diesem Wege nutzen Herpesviren den Signalweg zu ihrem Vorteil. Wie unter Abschnitt 5.2.2 diskutiert wurde, bindet vIRF4 über ein Tetrapeptidmotiv an CBF1 welches starke Ähnlichkeit mit dem Interaktionsmotiv von Notch und EBNA2 hat. Das EBNA2-Protein fungiert als transkriptioneller Regulator zellulärer Gene und kontrolliert dies über den CBF1/Notch-Signalweg. EBNA2 kann als funktionelles Äquivalent zu Notch betrachtet werden. Darüber hinaus stellt EBNA2 einen sehr starken Regulator dar und wie in der Literatur beschrieben wurde, überlappen einige der Notch und EBNA2 identifizierten zellulären Zielgene, wie z.B. CD21, CD23 und MYC (Kempkes et al., 2005). Auf diesem Wissen beruhend wurde in Erwägung gezogen, dass vIRF4 möglicherweise durch die Zielgenregulation in den Notch-Signalweg eingreift und auch hier eine Überlappung der

vIRF4-Zielgene mit denen von Notch vorliegt. Wie bereits unter 5.4.1 angesprochen, konnte eine vIRF4-abhängige Regulation von MYC nicht bestätigt werden. In den Daten der Affymetrix-Microarrays wurde nach einer Regulation von Notch-Zielgenen wie CD21, CD23, Gene der HES und HEY Familie, sowie CyclinD1 oder p21 gesucht (Übersicht Kempkes et al., 2005; Übersicht: Kopan and Ilagan, 2009). Keines der genannten Gene wurde durch vIRF4 reguliert. Eine Einschränkung besteht darin, dass anhand der Microarraydaten keine Aussage zur Expressionstärke der Gene gemacht werden kann. Es ist deshalb möglich, dass einige der eben genannten, nicht regulierten Gene in BC-1-Zellen gar nicht exprimiert werden und folglich auch nicht reguliert werden können. So konnte in Versuchen von Cesarman und Kollegen keine Expression von CD21 und CD23 in BC-1-Zellen nachgewiesen werden (Cesarman et al., 1995). Auch in PEL-Zellen, isoliert aus Tumorproben mehrerer PEL-positiver Patienten, war die CD23-Expression gering. Hingegen konnte eine starke Expression von aktivem Notch1 nachgewiesen werden (Wang et al., 2010). Publierte Daten von der Gruppe von Robertson (Lan et al., 2006a; Lan et al., 2009; Lan et al., 2006b; Lan et al., 2007) sowie von Chang und Kollegen (Chang et al., 2005a) zeigen, dass in PEL-Zellen ein aktiver Notch-Signalweg vorliegt, in welchem Notch(1) aktiv ist. Es wurden verschiedene PEL-Zelllinien untersucht, allerdings waren BC-1-Zellen nicht mit eingeschlossen. Nach meinen Erkenntnissen wurde der aktive Notch-Signalweg in diesen Untersuchungen biologisch indirekt abgefragt und keine Aktivierung von Notch-Zielgenen gemessen. Publiziert wurde lediglich die Zunahme der CyclinD1-Expression in Abhängigkeit der Expression von Notch in PEL-Zelllinien, die als ursächlich für die Proliferation der Zellen angegeben wird. Jedoch war auch in diesen Untersuchungen die BC-1-Linie nicht mit eingeschlossen (Lan et al., 2006a).

Bei Betrachtung der Arraydaten und seinen Expressionswerten von Notch1 bis 4 zeigen sich deutlich hohe Signalwerte von Notch2 und niedrige Werte von Notch1, Notch3 und Notch4. Allgemein liegen mehr Untersuchungen zu Notch1 in T-Zellen vor. Man weiß jedoch, dass Notch2 bevorzugt in reifen B-Zellen exprimiert wird und wesentlich an der Entwicklung von B-Zellen der Marginalzone (MZB, *marginal zone B*) in der Milz beteiligt ist (Saito et al., 2003). Es liegen jedoch zu wenig publizierte Daten zur Charakterisierung der BC-1-Zellen vor, als dass die hohe Expression von Notch2 und die niedrige Expression von Notch1, sofern die Daten auf die Expressionstärke schließen lassen, als für diese Zellen ungewöhnlich oder typisch interpretiert werden könnte.

Auch wenn aufgrund des CBF1-Bindemotivs von vIRF4 die Vermutung nahe lag, dass eine Überlappung in den von vIRF4- und Notch-regulierten Zielgenen vorliegt, so lassen die Daten zunächst nicht darauf schließen, dass die Notch-Signatur, soweit in BC-1-Zellen gegeben, durch vIRF4 moduliert wird.

Eine Modulation der Notch-Signatur kann aber auch indirekt über die Regulation von Komponenten des Notch-Signalweges erfolgen. Diesbezüglich könnte die Induktion von MAML2 als Interaktionspartner des Notch-CBF1-Aktivator-Komplexes möglicherweise von Bedeutung sein. Das menschliche Genom kodiert für drei MAML-Gene (Mastermind-like 1-3). Alle drei MAML-Proteine können mit allen Notch-Proteinen interagieren und einen Komplex aus CBF1 und Notch mit ausbilden und stabilisieren. (Lin et al., 2002; Wu et al., 2002). Nach wie vor ist nicht klar, wie wichtig der Beitrag der MAML-Proteine in der Feinregulierung des Notch-Signalweges ist. Versuche in Gen *knock-out* Mäusen zeigten, dass für die Notch2 vermittelte MZB-Entwicklung MAML1 benötigt wird (Wu et al., 2007). Daraus ergibt sich der Hinweis, dass individuelle MAML-Koaktivatoren einen Beitrag zur zellspezifischen Notch-Funktion in den verschiedenen Zellen leisten und somit auch einen regulierenden Faktor im Notch-Signalweg darstellen. Es gibt verschiedene Hinweise, dass eine MAML-Deregulation zu einer Fehlregulation des Notch-Signalwegs führen kann. Ein Beispiel ist eine Translokation im Mucoepidermoiden Karzinom, welche zu einem MAML2-Fusionsprotein führt, das Notch-Zielgene unabhängig einer Notchsignalgebung und unabhängig von CBF1 aktiviert. Die natürliche Signalgebung wird dadurch unterbrochen und fehlreguliert (Tonon et al., 2003). Köchert und Kollegen führten Untersuchungen zum MAML-Beitrag in einer deregulierten Notchaktivität in humanen B-Zell-Lymphomen durch. Eine abnorm hohe Expressionsrate von MAML2 war in Lymphomzelllinien, speziell in den vom klassischen Hodgkin-Lymphom abgeleiteten Zellen beobachtet worden. Darüber hinaus konnten sie in HRS-Zellen (*Hodgkin-Reed-Sternberg*, maligne Zellen des Hodgkin Lymphoms) zeigen, dass MAML2 die Transkriptionsaktivität von Notch verstärkt, wodurch es in diesen Zellen zu einer hohen Expression der Notch-Zielgene HES7 und HEY1 kommt. Die hohe Expression von HES7 und HEY1 ist für das Expressionsprofil in HRS-Zellen charakteristisch. Außerdem konnte in HRS-Zellen eine besonders hohe Expression von Notch2, verglichen mit anderen Notch-Proteinen, festgestellt werden (Köchert et al., 2010). Untersuchungen zur MAML2-Expression und seinem Beitrag im Notch-Signalweg liegen für PEL-Zellen nicht vor. Es wäre denkbar, dass vIRF4 über die Induktion von MAML2 in den Notch-Signalweg eingreift und die Komplexbildung von MAML2, Notch und CBF1 zu einer differenzierten Signalgebung führt.

Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass mit den hier erstmals durchgeführten Untersuchungen zur Identifizierung vIRF4-regulierter Zielgene definiert werden sollte, ob und welche Rolle vIRF4 bei der Regulation zellulärer Gene einnimmt. Die Induktion ausgewählter Gene durch vIRF4 konnte in der Linie tet-vIRF4-BC-1 in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt und für EGR1 eine CBF1-abhängige Induktion nachgewiesen werden. Um jedoch eine biologische Relevanz in der vIRF4-Regulation dieser

zellulären Gene allgemein in PEL-Zellen zu definieren, sind fortführende Untersuchungen und die Bestätigung in einer weiteren PEL-Zelllinie nötig.

### 5.5.2 Funktion der Zielgene

Für vIRF4 bleibt festzuhalten, dass es in der Genexpressionsanalyse insgesamt zwar als schwacher Regulator in Erscheinung trat, aber dennoch für ausgewählte Gene die Induktion durch vIRF4 in *Real-time* PCR-Experimenten bestätigt werden konnte. Der folgende Abschnitt soll deshalb einen Überblick über die Funktion dieser Gene geben.

MAML2 und PDCD4 sind bereits in den vorigen Abschnitten besprochen worden. RGS1 (*regulator of G-protein signaling*) gehört zu einer Gruppe multifunktionaler Proteine, welche nach Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (engl: *G-protein coupled receptor*, GPCR) die Deaktivierung von heterotrimeren G-Proteinen beschleunigen und so die zelluläre Signalweiterleitung regulieren. RGS1 scheint in B-Zellen hoch exprimiert zu werden, weshalb ihm eine Rolle als Regulator von Immunzellen zugeteilt wird und in Versuchen ein enger Zusammenhang zwischen der RGS1-Expression und der Zellmigration hergestellt werden konnte (Moratz et al., 2000). Die RGS1-Expression kann durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\beta$  in B-Zellen induziert werden (Tran et al., 2010). Für RGS-Proteine und so auch für RGS1 besteht eine Assoziation mit verschiedenen Tumorerkrankungen. Eine erhöhte Expression von RGS1 ist unter anderem in Melanomen (Rangel et al., 2008), dem Cervixkarzinom (Wong et al., 2006), der adulten T-Zell-Leukämie (Koga et al., 2004) und dem Mantelzell-Lymphom (Zhu et al., 2002) beschrieben worden (Hurst and Hooks, 2009). FAS, JUN und EGR1 sind in Prozesse der Apoptose involviert. FAS, der sogenannte Todesrezeptor, ist ein Rezeptor auf der Zelloberfläche und wesentlich im extrinsischen Signalweg der Apoptose involviert. Die FAS-Signalgebung ist wichtig für die Lymphozyten-Homeostase und ein defekter FAS-Rezeptor führt zur Lymphadenopathie (Hughes et al., 2008; Krammer, 2000; Rieux-Laucat et al., 1995).

JUN ist ein Positivregulator der Zellproliferation und dem Wechsel von G1 zur S-Phase und kann bei einer fehlregulierten Expression als Onkogen fungieren. Außerdem spielt es in der Zelldifferenzierung und in Apoptose eine Rolle. Eine Überexpression von JUN reprimiert die p53- und p21-Expression und beschleunigt so die Zellproliferation (Schreiber et al., 1999). Studien im Multiplen Myelom (MM) zeigten, dass der JUN/EGR1-Komplex zur Apoptose führt. JUN induziert die EGR1-Expression, was wiederum Caspasen aktiviert und so zur Apoptose führt (Chen et al., 2010). EGR1 ist hier der JUN-Expression nachgestellt. Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der EGR1- und JUN-Induktion in meinen *Real-time* PCR-Experimenten, so erfolgt die Induktion von EGR1 deutlich früher als für JUN. Ein ähnlicher proapoptotischer Mechanismus ist deshalb unwahrscheinlich. Dennoch zeigt es das enge Zusammenspiel der Proteine JUN und EGR1 im Prozess der Apoptose.



EGR1 (*early growth response 1*) ist ein zellulärer Transkriptionsfaktor, der in die verschiedensten biologischen Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung involviert ist, wobei der funktionelle Beitrag von EGR1 vom Zelltyp abhängig ist. Die Induktion der EGR1-Expression ist wichtig für die Antigen/Rezeptor-bedingte Aktivierung von B-Zellen (Monroe et al., 1993; Maltzman et al., 1996), welche durch den p21<sup>ras</sup>-Signalweg aktiviert werden kann (McMahon and Monroe, 1995). EGR1 induziert Apoptose durch Regulation der Expression von Tumorsuppressorgenen wie p53 oder Transkriptionsfaktoren wie JUN. Wie gesagt handelt es sich bei EGR1 um einen Transkriptionsfaktor. Eines seiner Zielgene ist p53. EGR1 bewirkt die Induktion von p53 *in vitro* und *in vivo*, was zu einem antiproliferativen Effekt in humanen Melanomzellen und in MEF-Zellen, isoliert aus EGR1-Null-Mäusen, führt (Krones-Herzig et al., 2005; Nair et al., 1997). Eine p53-Regulation wurde in meinen Arrayanalysen nicht beobachtet. In Neuroblastomzellen konnte EGR1 auch eine apoptotische Funktion zugeschrieben werden. Interessanterweise konnte hier ein Zusammenhang mit p53 ausgeschlossen werden. In Zellen mit einer stabilen Expression von EGR1 zeigte sich eine Zunahme von p73 und MDM2, wo hingegen die p53-Proteinmenge abnahm. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die MDM2-Expression durch EGR1 induziert wird. Die Überexpression von MDM2 bewirkt den Abbau von p53. Wiederum kann das Protein p73 an p53-Bindestellen binden, weshalb vermutet wird, dass in der durch EGR1 ausgelösten Apoptose p73 involviert ist (Pignatelli et al., 2003). Dieser Fall wurde für Neuroblastomzellen beschrieben und steht mit Daten von Lee und Kollegen in Widerspruch, die in PEL-Zellen zeigen konnten, dass vIRF4 durch seine Interaktion mit MDM2 eine antiapoptotische Funktion einnimmt. Dennoch kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass vIRF4 auch durch die EGR1-Induktion in den Prozess der Apoptose involviert ist. Zum einen kann nicht gesagt werden, ob es sich mit p73 in PEL-Zellen ähnlich verhält und zum anderen ist für p73 auch publiziert, dass seine Transaktivierung durch MDM2 inhibiert werden kann (Kobet et al., 2000).

### 5.5.3 Kooperiert vIRF4 mit der Zielgenregulation von RTA?

Zur Identifizierung und Bestätigung der Zielgene wurde bewusst ein konditionales System im Hintergrund einer KSHV-positiven PEL-Zelle im latenten Zustand gewählt, um regulatorische Effekte direkt auf vIRF4, und unabhängig vom lytischen Programm, d.h. von Sekundäreffekten lytischer Proteine der Zelle, zurückführen zu können. Hierbei erwies sich vIRF4, wie des Öfteren angesprochen, als eher schwacher Regulator zellulärer Zielgene. Um intensiv den Mechanismus der Regulation zu untersuchen, bieten die Daten weniger Potential. Was die Zielgenregulation in Hinblick auf Funktion betrifft, sind für vIRF4 als lytisches Protein weitere Studien in der lytischen Phase des Virus sinnvoll. Bezüglich des lytischen Zyklus zeichneten sich in der Zielgenregulation von vIRF4 Parallelen zu RTA ab.

Unlängst wurden von Brown und Kollegen weitere potentielle zelluläre Zielgene von RTA publiziert (Brown et al., 2010). Die Daten wurden in Microarrayanalysen anhand eines konditionalen Systems zur Expression von RTA in HEK293-Zellen in einem Zeitraum von 12 h durchgeführt. Eine experimentelle Bestätigung der RTA-Regulation liegt bislang nicht vor. Zuvor waren bereits potentielle Zielgene von Chang und Kollegen identifiziert worden (Chang et al., 2005b). Dies geschah mit einem konditionalen System in BCBL-1-Zellen nach einer RTA-Expression von 48 h. Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich, dass manche der von mir bestätigten Zielgene von vIRF4 auch durch RTA reguliert werden. Darunter finden sich FAS, JUN und PDCD4. FAS und PDCD4 werden durch RTA induziert, wo hingegen JUN reprimiert wird. JUN wurde schon früher mit RTA in Verbindung gebracht. So konnte gezeigt werden, dass RTA über die Interaktion mit JUN virale Zielgene reguliert (Gwack et al., 2001).

Interessanterweise ist auch für EGR1 eine Verbindung zu KSHV RTA gegeben. In Endothelzellen (HMVEC-d, *dermal-derived Human Microvascular Endothelial Cells*) konnte gezeigt werden, dass EGR1 an den Promotor von RTA bindet und die RTA-Expression aktiviert. Der Effekt konnte durch das KSHV-Protein Glycoprotein B aufgehoben werden, wobei sowohl die EGR1- als auch die RTA-Expression reprimiert wurden (Dyson et al., 2010). Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus einen Beitrag in der Etablierung der Latenz nach Infektion von Zellen leistet. Publikationen belegen, dass EGR1 die Expression verschiedener viraler Gene reguliert und eine entscheidende Rolle in der Replikation verschiedener Viren einnimmt (Chang et al., 2006; Chen et al., 2008; Romagnoli et al., 2008).

Dass wiederum herpesvirale Proteine die Induktion von EGR1 bewirken können, zeigen verschiedene Versuche zu dem lytischen EBV-Protein BZLF1. Chang und Kollegen beobachteten, dass die EGR1-Expression durch BZLF1 induziert werden kann (Chang et al., 2006). Dies kann durch die direkte Bindung von BZLF1 an den Promotor von EGR1 erfolgen. Dabei bindet BZLF1 an sogenannte ZREs (*Zta-response elements*), die CpG-Motive enthalten (Bhende et al., 2004; Heather et al., 2009). Ein *knock-down* von EGR1 führte zu einer Abnahme der BZLF1- und BRLF1-Expression, weshalb vermutet wird, dass ein möglicher Rückkopplungsmechanismus durch EGR1 für die Reaktivierung von EBV benötigt wird. Außerdem wird EGR1 während der Infektion von B-Lymphozyten hochreguliert. Durch die Induktion von EGR1, erweitert BZLF1 möglicherweise seinen Einfluss auf die Genregulation und wirkt so auf breiter Ebene auf zelluläre Aktivitäten ein (Chang et al., 2006). Möglich, dass vIRF4 durch die Induktion von EGR1 einen ähnlichen Beitrag zur Replikation oder bei der Neuinfektion von Zellen zur Etablierung von Latenz leistet.

Das früh lytische Protein RTA aus KSHV kann direkt an Zielgen-Promotoren binden. An manche Promotoren wird es aber auch durch Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CBF1

rekrutiert und die Bindung über CBF1 kann auf die Transkription einen verstärkenden Effekt haben. Der lytische Zyklus führt unweigerlich zum Tod und zur Lyse der Zelle. Demnach werden proliferationsfördernde Signale dieser Phase kaum zum Tumorwachstum beitragen, sondern vielmehr einen wichtigen Beitrag zum Durchlaufen der lytischen Phase und der damit verbundenen Replikation führen. So bietet beispielsweise ein Zellzyklusarrest dem Virus den Vorteil, auf limitierende zelluläre Faktoren wie Nukleotide zuzugreifen. Zur erfolgreichen Produktion neuer infektiöser Viruspartikel muss der lytische Zyklus nach Initiierung aufrechterhalten und komplett durchlaufen werden. Wie gezeigt wurde, ist die Aktivierung des lytischen Zyklus durch RTA CBF1-abhängig und die Aktivierung einer Vielzahl viraler, aber auch zellulärer Gene von RTA erfordert CBF1-responsive Elemente (Carroll et al., 2006; Liang et al., 2002; Staudt and Dittmer, 2007). Wiederum wird CBF1 nicht zur Etablierung der Latenz benötigt (Liang and Ganem, 2003). Es ist möglich, dass vIRF4 und seine Zielgenregulation von größerer Bedeutung im lytischen Zyklus ist und dabei mit RTA kooperiert. Ob dabei eine Regulation über CBF1 von Bedeutung ist, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen. Von den bestätigten vIRF4-Zielgenen zeigt sich eine CBF1-abhängige Regulation für EGR1. EGR1 scheint deshalb in vielerlei Hinsicht als Kandidatengen für weitere Untersuchungen interessant zu sein.

## 5.6 Ausblick

Zusammengefasst ergibt sich aus den hier beschriebenen Experimenten, dass vIRF4 die zelluläre Genexpression zahlreicher Gene zu regulieren scheint, aber im Vergleich zu Effekten von EBNA3A und EBNA2 die Amplitude der Regulation sehr gering ist und bezogen auf Notch keine gleichsinnige oder gegenläufige Regulation zu beobachten ist. Ein wichtiger Punkt ist, ob in der lytischen Phase eine Kooperation zwischen RTA und vIRF4 vorliegt. Dies könnte sowohl durch die Regulation zellulärer als auch viraler Zielgene erfolgen, weshalb weitere Untersuchungen zur Transkriptregulation und Signaltransduktion der bestätigten Gene EGR1, JUN, FAS und PDCD4 dennoch berechtigt sind. Es wäre denkbar, dass vIRF4 Prozesse der Apoptose kontrolliert, um den zeitlichen Verlauf und das Durchlaufen des lytischen Zyklus zu beeinflussen und zu unterstützen.

Für Untersuchungen zum Mechanismus der Regulation, sowie zur Funktion, speziell in der lytischen Phase, erscheint EGR1 interessant zu sein. Um die Aktivatorfunktion von vIRF4 zu bestätigen, könnten zunächst Promotor-Reporterstudien durchgeführt werden. Durch Verwendung deletierter und trunkierter Sequenzen des Promotors könnte die vIRF4-Bindung im Promotorbereich eingegrenzt werden. Dabei wäre es interessant die Untersuchungen neben der hier verwendeten PEL-Zelllinie auch in Säugerzellen ohne Virushintergrund und ohne B-Zell-Hintergrund durchzuführen um zu prüfen wie wichtig virale oder B-Zell-

spezifische Proteine für die vIRF4-bedingte Aktivierung sind. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Promotormodifikationen eine wesentliche Rolle bei der Transkription spielen. Beschrieben wurde das für die erwähnte Aktivierung von EGR1 durch BZLF1. Auch ist nicht klar, ob es sich bei EGR1 um ein direktes Zielgen von vIRF4 handelt. Regulation von Genen kann direkt erfolgen, d.h. vIRF4 bindet selbst, bzw. über ein Adapterprotein an den Promotor der Zielgene und steuert so deren Transkription. Aber auch eine indirekte Regulation, bei der die direkte Regulation eines Transkriptionsfaktors die Induktion weiterer, sekundärer Gene veranlasst, wäre möglich. Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) könnten *in vivo* Aufschluss über die direkte Aktivierung von EGR1 liefern. Mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation kann eine direkte, aber auch eine Adapter vermittelte Bindung von Proteinen an genomische DNA lebendiger Zellen nachgewiesen werden (Orlando, 2000; Orlando et al., 1997).

Es ist wahrscheinlicher, dass die Funktion von vIRF4 in der lytischen Phase mehr von Bedeutung ist und es weniger einen Regulator zellulärer Gene darstellt, sondern vielmehr die virale Genexpression beeinflusst und über diesen Weg möglicherweise mit RTA kooperiert. Zukünftig wäre es sinnvoll *knock-out* Viren herzustellen und fortführende Studien zu vIRF4 nach Infektion und Reaktivierung des KSHV durchzuführen.

## 6 Literatur

- Amakawa, R., Jing, W., Ozawa, K., Matsunami, N., Hamaguchi, Y., Matsuda, F., Kawaichi, M., and Honjo, T. (1993). Human JK recombination signal binding protein gene (IGKJRB): comparison with its mouse homologue. *Genomics* 17, 306-315.
- Ambroziak, J.A., Blackbourn, D.J., Herndier, B.G., Glogau, R.G., Gullett, J.H., McDonald, A.R., Lennette, E.T., and Levy, J.A. (1995). Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science* 268, 582-583.
- Amsen, D., Antov, A., Jankovic, D., Sher, A., Radtke, F., Souabni, A., Busslinger, M., McCright, B., Gridley, T., and Flavell, R.A. (2007). Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 27, 89-99.
- An, J., Sun, Y., and Rettig, M.B. (2004). Transcriptional coactivation of c-Jun by the KSHV-encoded LANA. *Blood* 103, 222-228.
- Antman, K., and Chang, Y. (2000). Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 342, 1027-1038.
- Arguello, M., Sgarbanti, M., Hernandez, E., Mamane, Y., Sharma, S., Servant, M., Lin, R., and Hiscott, J. (2003). Disruption of the B-cell specific transcriptional program in HHV-8 associated primary effusion lymphoma cell lines. *Oncogene* 22, 964-973.
- Ballestas, M.E., and Kaye, K.M. (2001). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mediates episome persistence through cis-acting terminal repeat (TR) sequence and specifically binds TR DNA. *J Virol* 75, 3250-3258.
- Barbera, A.J., Chodaparambil, J.V., Kelley-Clarke, B., Joukov, V., Walter, J.C., Luger, K., and Kaye, K.M. (2006). The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science* 311, 856-861.
- Belloc, F., Dumain, P., Boisseau, M.R., Jalloustre, C., Reiffers, J., Bernard, P., and Lacombe, F. (1994). A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 17, 59-65.
- Bertagna, A., Toptygin, D., Brand, L., and Barrick, D. (2008). The effects of conformational heterogeneity on the binding of the Notch intracellular domain to effector proteins: a case of biologically tuned disorder. *Biochem Soc Trans* 36, 157-166.
- Bhende, P.M., Seaman, W.T., Delecluse, H.J., and Kenney, S.C. (2004). The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat Genet* 36, 1099-1104.
- Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90, 281-291.
- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., *et al.* (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33, e137.
- Bshoff, C., Schulz, T.F., Kennedy, M.M., Graham, A.K., Fisher, C., Thomas, A., McGee, J.O., Weiss, R.A., and O'Leary, J.J. (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nat Med* 1, 1274-1278.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5, 207-216.
- Brown, H.J., Peng, L., Harada, J.N., Walker, J.R., Cole, S., Lin, S.F., Zack, J.A., Chanda, S.K., and Sun, R. (2010). Gene expression and transcription factor profiling reveal inhibition of transcription factor cAMP-response element-binding protein by gamma-herpesvirus replication and transcription activator. *J Biol Chem* 285, 25139-25153.
- Burysek, L., and Pitha, P.M. (2001). Latently expressed human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor 2 inhibits double-stranded RNA-activated protein kinase. *J Virol* 75, 2345-2352.

- Burysek, L., Yeow, W.S., Lubyova, B., Kellum, M., Schafer, S.L., Huang, Y.Q., and Pitha, P.M. (1999). Functional analysis of human herpesvirus 8-encoded viral interferon regulatory factor 1 and its association with cellular interferon regulatory factors and p300. *J Virol* 73, 7334-7342.
- Cai, X., and Cullen, B.R. (2006). Transcriptional origin of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs. *J Virol* 80, 2234-2242.
- Calabro, M.L., Sheldon, J., Favero, A., Simpson, G.R., Fiore, J.R., Gomes, E., Angarano, G., Chieco-Bianchi, L., and Schulz, T.F. (1998). Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in several regions of Italy. *J Hum Virol* 1, 207-213.
- Callahan, J., Pai, S., Cotter, M., and Robertson, E.S. (1999). Distinct patterns of viral antigen expression in Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus coinfecting body-cavity-based lymphoma cell lines: potential switches in latent gene expression due to coinfection. *Virology* 262, 18-30.
- Carbone, A., Cilia, A.M., Ghoghini, A., Capello, D., Todesco, M., Quattrone, S., Volpe, R., and Gaidano, G. (1998). Establishment and characterization of EBV-positive and EBV-negative primary effusion lymphoma cell lines harbouring human herpesvirus type-8. *Br J Haematol* 102, 1081-1089.
- Carbone, A., Ghoghini, A., Vaccher, E., Zagonel, V., Pastore, C., Dalla Palma, P., Branz, F., Saglio, G., Volpe, R., Tirelli, U., et al. (1996). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in AIDS-related and AIDS-unrelated lymphomatous effusions. *Br J Haematol* 94, 533-543.
- Carroll, K.D., Bu, W., Palmeri, D., Spadavecchia, S., Lynch, S.J., Marras, S.A., Tyagi, S., and Lukac, D.M. (2006). Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein stimulates DNA binding of RBP-Jk/CSL to activate the Notch pathway. *J Virol* 80, 9697-9709.
- Cesarman, E., Moore, P.S., Rao, P.H., Inghirami, G., Knowles, D.M., and Chang, Y. (1995). In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences. *Blood* 86, 2708-2714.
- Chakraborty, R., Pulver, A., Pulver, L.S., Musoke, R., Palakudy, T., D'Agostino, A., and Rana, F. (2002). The post-mortem pathology of HIV-1-infected African children. *Ann Trop Paediatr* 22, 125-131.
- Chang, H., Dittmer, D.P., Shin, Y.C., Hong, Y., and Jung, J.U. (2005a). Role of Notch signal transduction in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J Virol* 79, 14371-14382.
- Chang, H., Gwack, Y., Kingston, D., Souvlis, J., Liang, X., Means, R.E., Cesarman, E., Hutt-Fletcher, L., and Jung, J.U. (2005b). Activation of CD21 and CD23 gene expression by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA. *J Virol* 79, 4651-4663.
- Chang, P.J., Shedd, D., Gradoville, L., Cho, M.S., Chen, L.W., Chang, J., and Miller, G. (2002). Open reading frame 50 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus directly activates the viral PAN and K12 genes by binding to related response elements. *J Virol* 76, 3168-3178.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., and Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266, 1865-1869.
- Chang, Y., Lee, H.H., Chen, Y.T., Lu, J., Wu, S.Y., Chen, C.W., Takada, K., and Tsai, C.H. (2006). Induction of the early growth response 1 gene by Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta. *J Virol* 80, 7748-7755.
- Chang, Y., Ziegler, J., Wabinga, H., Katangole-Mbidde, E., Boshoff, C., Schulz, T., Whitby, D., Maddalena, D., Jaffe, H.W., Weiss, R.A., et al. (1996). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and Kaposi's sarcoma in Africa. Uganda Kaposi's Sarcoma Study Group. *Arch Intern Med* 156, 202-204.
- Chen, F., Zou, J.Z., di Renzo, L., Winberg, G., Hu, L.F., Klein, E., Klein, G., and Ernberg, I. (1995). A subpopulation of normal B cells latently infected with Epstein-Barr virus resembles Burkitt lymphoma cells in expressing EBNA-1 but not EBNA-2 or LMP1. *J Virol* 69, 3752-3758.
- Chen, J., Ye, F., Xie, J., Kuhne, K., and Gao, S.J. (2009). Genome-wide identification of binding sites for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein, RTA. *Virology* 386, 290-302.
- Chen, L., and Lagunoff, M. (2005). Establishment and maintenance of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency in B cells. *J Virol* 79, 14383-14391.
- Chen, L., Wang, S., Zhou, Y., Wu, X., Entin, I., Epstein, J., Yaccoby, S., Xiong, W., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., Jr., et al. (2010). Identification of early growth response protein 1 (EGR-1) as a novel target for JUN-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood* 115, 61-70.

- Chen, S.H., Yao, H.W., Chen, I.T., Shieh, B., Li, C., and Chen, S.H. (2008). Suppression of transcription factor early growth response 1 reduces herpes simplex virus lethality in mice. *J Clin Invest* 118, 3470-3477.
- Chen, Y., Knosel, T., Kristiansen, G., Pietas, A., Garber, M.E., Matsuhashi, S., Ozaki, I., and Petersen, I. (2003). Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. *J Pathol* 200, 640-646.
- Chung, C.N., Hamaguchi, Y., Honjo, T., and Kawauchi, M. (1994). Site-directed mutagenesis study on DNA binding regions of the mouse homologue of Suppressor of Hairless, RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22, 2938-2944.
- Covarrubias, S., Richner, J.M., Clyde, K., Lee, Y.J., and Glaunsinger, B.A. (2009). Host shutoff is a conserved phenotype of gammaherpesvirus infection and is orchestrated exclusively from the cytoplasm. *J Virol* 83, 9554-9566.
- Cunningham, C., Barnard, S., Blackbourn, D.J., and Davison, A.J. (2003). Transcription mapping of human herpesvirus 8 genes encoding viral interferon regulatory factors. *J Gen Virol* 84, 1471-1483.
- Curry, C.L., Reed, L.L., Broude, E., Golde, T.E., Miele, L., and Foreman, K.E. (2007). Notch inhibition in Kaposi's sarcoma tumor cells leads to mitotic catastrophe through nuclear factor-kappaB signaling. *Mol Cancer Ther* 6, 1983-1992.
- Curry, C.L., Reed, L.L., Golde, T.E., Miele, L., Nickoloff, B.J., and Foreman, K.E. (2005). Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells. *Oncogene* 24, 6333-6344.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., *et al.* (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
- Dedicoat, M., and Newton, R. (2003). Review of the distribution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in Africa in relation to the incidence of Kaposi's sarcoma. *Br J Cancer* 88, 1-3.
- Del Bianco, C., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2008). Mutational and energetic studies of Notch 1 transcription complexes. *J Mol Biol* 376, 131-140.
- Deng, H., Chu, J.T., Rettig, M.B., Martinez-Maza, O., and Sun, R. (2002a). Rta of the human herpesvirus 8/Kaposi sarcoma-associated herpesvirus up-regulates human interleukin-6 gene expression. *Blood* 100, 1919-1921.
- Deng, H., Song, M.J., Chu, J.T., and Sun, R. (2002b). Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). *J Virol* 76, 8252-8264.
- Dittmer, D., Lagunoff, M., Renne, R., Staskus, K., Haase, A., and Ganem, D. (1998). A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 72, 8309-8315.
- Dittmer, D.P. (2003). Transcription profile of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in primary Kaposi's sarcoma lesions as determined by real-time PCR arrays. *Cancer Res* 63, 2010-2015.
- Dölken, L., Ruzsics, Z., Radle, B., Friedel, C.C., Zimmer, R., Mages, J., Hoffmann, R., Dickinson, P., Forster, T., Ghazal, P., *et al.* (2008). High-resolution gene expression profiling for simultaneous kinetic parameter analysis of RNA synthesis and decay. *Rna* 14, 1959-1972.
- Drexler, H.G., Uphoff, C.C., Gaidano, G., and Carbone, A. (1998). Lymphoma cell lines: in vitro models for the study of HHV-8+ primary effusion lymphomas (body cavity-based lymphomas). *Leukemia* 12, 1507-1517.
- Duan, W., Wang, S., Liu, S., and Wood, C. (2001). Characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 ORF57 promoter. *Arch Virol* 146, 403-413.
- Duprez, R., Lacoste, V., Briere, J., Couppe, P., Frances, C., Sainte-Marie, D., Kassa-Kelembho, E., Lando, M.J., Essame Oyono, J.L., Nkegoum, B., *et al.* (2007). Evidence for a multiclonal origin of multicentric advanced lesions of Kaposi sarcoma. *J Natl Cancer Inst* 99, 1086-1094.
- Dyson, O.F., Traylen, C.M., and Akula, S.M. (2010). Cell membrane-bound Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded glycoprotein B promotes virus latency by regulating expression of cellular Egr-1. *J Biol Chem* 285, 37491-37502.

- Ehebauer, M., Hayward, P., and Arias, A.M. (2006). Notch, a universal arbiter of cell fate decisions. *Science* 314, 1414-1415.
- Emuss, V., Lagos, D., Pizzey, A., Gratrix, F., Henderson, S.R., and Boshoff, C. (2009). KSHV manipulates Notch signaling by DLL4 and JAG1 to alter cell cycle genes in lymphatic endothelia. *PLoS Pathog* 5, e1000616.
- Escalante, C.R., Yie, J., Thanos, D., and Aggarwal, A.K. (1998). Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature* 391, 103-106.
- Falke, D. (2009). Herpes-Viren. In *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer, ed. 571-572.
- Fang, T.C., Yashiro-Ohtani, Y., Del Bianco, C., Knoblock, D.M., Blacklow, S.C., and Pear, W.S. (2007). Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 27, 100-110.
- Feller, L., Wood, N.H., and Lemmer, J. (2007). HIV-associated Kaposi sarcoma: pathogenic mechanisms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104, 521-529.
- Feller, L., Khammissa, R.A., Gugushe, T.S., Chikte, U.M., Wood, N.H., Meyerov, R., and Lemmer, J. (2010). HIV-associated Kaposi sarcoma in African children. *Sadj* 65, 20-22.
- Finke, J., Fritzen, R., Ternes, P., Trivedi, P., Bross, K.J., Lange, W., Mertelsmann, R., and Dolken, G. (1992). Expression of bcl-2 in Burkitt's lymphoma cell lines: induction by latent Epstein-Barr virus genes. *Blood* 80, 459-469.
- Friberg, J., Jr., Kong, W., Hottiger, M.O., and Nabel, G.J. (1999). p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature* 402, 889-894.
- Friedmann, D.R., Wilson, J.J., and Kovall, R.A. (2008). RAM-induced allosteric facilitates assembly of a notch pathway active transcription complex. *J Biol Chem* 283, 14781-14791.
- Fryer, C.J., White, J.B., and Jones, K.A. (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell* 16, 509-520.
- Fuchs, K.P., Bommer, G., Dumont, E., Christoph, B., Vidal, M., Kremmer, E., and Kempkes, B. (2001). Mutational analysis of the J recombination signal sequence binding protein (RBP-J)/Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) and RBP-J/Notch interaction. *Eur J Biochem* 268, 4639-4646.
- Fujimuro, M., Wu, F.Y., ApRhys, C., Kajumbula, H., Young, D.B., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (2003). A novel viral mechanism for dysregulation of beta-catenin in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. *Nat Med* 9, 300-306.
- Fuld, S., Cunningham, C., Klucher, K., Davison, A.J., and Blackbourn, D.J. (2006). Inhibition of interferon signaling by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus full-length viral interferon regulatory factor 2 protein. *J Virol* 80, 3092-3097.
- Gaidano, G., and Carbone, A. (2001). Primary effusion lymphoma: a liquid phase lymphoma of fluid-filled body cavities. *Adv Cancer Res* 80, 115-146.
- Ganem, D. (2010). KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. *J Clin Invest* 120, 939-949.
- Garber, A.C., Shu, M.A., Hu, J., and Renne, R. (2001). DNA binding and modulation of gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 75, 7882-7892.
- Glaunsinger, B.A., and Ganem, D.E. (2006). Messenger RNA turnover and its regulation in herpesviral infection. *Adv Virus Res* 66, 337-394.
- Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2007). Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat Struct Mol Biol* 14, 295-300.
- Grabher, C., von Boehmer, H., and Look, A.T. (2006). Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 6, 347-359.
- Grayson, W., and Pantanowitz, L. (2008). Histological variants of cutaneous Kaposi sarcoma. *Diagn Pathol* 3, 31.
- Guhaniyogi, J., and Brewer, G. (2001). Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265, 11-23.



- Gwack, Y., Hwang, S., Byun, H., Lim, C., Kim, J.W., Choi, E.J., and Choe, J. (2001). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50 represses p53-induced transcriptional activity and apoptosis. *J Virol* 75, 6245-6248.
- Gwack, Y., Hwang, S., Lim, C., Won, Y.S., Lee, C.H., and Choe, J. (2002). Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50 stimulates the transcriptional activity of STAT3. *J Biol Chem* 277, 6438-6442.
- Haines, N., and Irvine, K.D. (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 786-797.
- Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K., and Honjo, T. (2002). Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* 14, 637-645.
- Hansen, A., Henderson, S., Lagos, D., Nikitenko, L., Coulter, E., Roberts, S., Gratrix, F., Plaisance, K., Renne, R., Bower, M., *et al.* (2010). KSHV-encoded miRNAs target MAF to induce endothelial cell reprogramming. *Genes Dev* 24, 195-205.
- Haque, M., Davis, D.A., Wang, V., Widmer, I., and Yarchoan, R. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) contains hypoxia response elements: relevance to lytic induction by hypoxia. *J Virol* 77, 6761-6768.
- Hayward, S.D. (2004). Viral interactions with the Notch pathway. *Semin Cancer Biol* 14, 387-396.
- Hayward, S.D., Liu, J., and Fujimuro, M. (2006). Notch and Wnt signaling: mimicry and manipulation by gamma herpesviruses. *Sci STKE* 2006, re4.
- Heather, J., Flower, K., Isaac, S., and Sinclair, A.J. (2009). The Epstein-Barr virus lytic cycle activator Zta interacts with methylated ZRE in the promoter of host target gene *egr1*. *J Gen Virol* 90, 1450-1454.
- Heinzelmann, K., Scholz, B.A., Nowak, A., Fossum, E., Kremmer, E., Haas, J., Frank, R., and Kempkes, B. (2010). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor 4 (vIRF4/K10) is a novel interaction partner of CSL/CBF1, the major downstream effector of Notch signaling. *J Virol* 84, 12255-12264.
- Herndier, B., and Ganem, D. (2001). The biology of Kaposi's sarcoma. *Cancer Treat Res* 104, 89-126.
- Hertle, M.L., Popp, C., Petermann, S., Maier, S., Kremmer, E., Lang, R., Mages, J., and Kempkes, B. (2009). Differential gene expression patterns of EBV infected EBNA-3A positive and negative human B lymphocytes. *PLoS Pathog* 5, e1000506.
- Hicks, C., Johnston, S.H., diSibio, G., Collazo, A., Vogt, T.F., and Weinmaster, G. (2000). Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat Cell Biol* 2, 515-520.
- Hong, Y.K., Foreman, K., Shin, J.W., Hirakawa, S., Curry, C.L., Sage, D.R., Libermann, T., Dezube, B.J., Fingerroth, J.D., and Detmar, M. (2004). Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet* 36, 683-685.
- Horenstein, M.G., Nador, R.G., Chadburn, A., Hyjek, E.M., Inghirami, G., Knowles, D.M., and Cesarman, E. (1997). Epstein-Barr virus latent gene expression in primary effusion lymphomas containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8. *Blood* 90, 1186-1191.
- Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowicz, D., Habu, S., and Owen, M.J. (2004). Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol* 5, 638-644.
- Hsieh, J.J., Zhou, S., Chen, L., Young, D.B., and Hayward, S.D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 23-28.
- Hu, J., Garber, A.C., and Renne, R. (2002). The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus supports latent DNA replication in dividing cells. *J Virol* 76, 11677-11687.
- Hughes, P.D., Belz, G.T., Fortner, K.A., Budd, R.C., Strasser, A., and Bouillet, P. (2008). Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* 28, 197-205.
- Hurst, J.H., and Hooks, S.B. (2009). Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins in cancer biology. *Biochem Pharmacol* 78, 1289-1297.

- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249-264.
- Jacobs, D.B., and Pipho, C. (1983). Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure anti-mediated cytotoxicity: resolution of complement-sensitive and resistant target cells. *J Immunol Methods* 62, 101-108.
- Järviuoma, A., and Ojala, P.M. (2006). Cell signaling pathways engaged by KSHV. *Biochim Biophys Acta* 1766, 140-158.
- Jenner, R.G., Alba, M.M., Boshoff, C., and Kellam, P. (2001). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J Virol* 75, 891-902.
- Jenner, R.G., and Boshoff, C. (2002). The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochim Biophys Acta* 1602, 1-22.
- Johannsen, E., Miller, C.L., Grossman, S.R., and Kieff, E. (1996). EBNA-2 and EBNA-3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJkappa in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *J Virol* 70, 4179-4183.
- Johnson, S.E., Ilagan, M.X., Kopan, R., and Barrick, D. (2010). Thermodynamic analysis of the CSL x Notch interaction: distribution of binding energy of the Notch RAM region to the CSL beta-trefoil domain and the mode of competition with the viral transactivator EBNA2. *J Biol Chem* 285, 6681-6692.
- Jones, K., Rivera, C., Sgadari, C., Franklin, J., Max, E.E., Bhatia, K., and Tosato, G. (1995). Infection of human endothelial cells with Epstein-Barr virus. *J Exp Med* 182, 1213-1221.
- Joo, C.H., Shin, Y.C., Gack, M., Wu, L., Levy, D., and Jung, J.U. (2007). Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IRF homolog vIRF3. *J Virol* 81, 8282-8292.
- Ju, B.G., Jeong, S., Bae, E., Hyun, S., Carroll, S.B., Yim, J., and Kim, J. (2000). Fringe forms a complex with Notch. *Nature* 405, 191-195.
- Kanno, T., Sato, Y., Sata, T., and Katano, H. (2006). Expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded K10/10.1 protein in tissues and its interaction with poly(A)-binding protein. *Virology* 352, 100-109.
- Kao, H.Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C.R., Evans, R.M., and Kadesch, T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* 12, 2269-2277.
- Kato, H., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Minoguchi, S., Sakai, T., Nomura-Okazaki, S., Tamura, K., and Honjo, T. (1997). Involvement of RBP-J in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives. *Development* 124, 4133-4141.
- Kempkes, B.S., Strobl, L.J., Bornkamm, G.W., Zimmer-Strobl, U. (2005). EBNA-2 and Notch Signalling. In *Epstein-Barr Virus*, E.S. Robertson, Norfolk: Caister Academic Press, ed. 463-500.
- Kirchhoff, S., Sebens, T., Baumann, S., Krueger, A., Zawatzky, R., Li-Weber, M., Meinel, E., Neipel, F., Fleckenstein, B., and Krammer, P.H. (2002). Viral IFN-regulatory factors inhibit activation-induced cell death via two positive regulatory IFN-regulatory factor 1-dependent domains in the CD95 ligand promoter. *J Immunol* 168, 1226-1234.
- Kobet, E., Zeng, X., Zhu, Y., Keller, D., and Lu, H. (2000). MDM2 inhibits p300-mediated p53 acetylation and activation by forming a ternary complex with the two proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12547-12552.
- Köchert, K., Ullrich, K., Kreher, S., Aster, J.C., Kitagawa, M., Johrens, K., Anagnostopoulos, I., Jundt, F., Lamprecht, B., Zimmer-Strobl, U., *et al.* (2010). High-level expression of Mastermind-like 2 contributes to aberrant activation of the NOTCH signaling pathway in human lymphomas. *Oncogene*.
- Koga, H., Imada, K., Ueda, M., Hishizawa, M., and Uchiyama, T. (2004). Identification of differentially expressed molecules in adult T-cell leukemia cells proliferating in vivo. *Cancer Sci* 95, 411-417.
- Kopan, R., and Ilagan, M.X. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216-233.

- Kovall, R.A., and Hendrickson, W.A. (2004). Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *Embo J* 23, 3441-3451.
- Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Kremmer, E., B. R. Kranz, A. Hille, K. Klein, M. Eulitz, G. Hoffmann-Fezer, W. Feiden, K. Herrmann, H. J. Delecluse, G. Delsol, G. W. Bornkamm, N. Mueller-Lantzsch, and F. A. Grassert. (1995). Rat monoclonal antibodies differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B). *Virology* 208:336-342.
- Krithivas, A., Young, D.B., Liao, G., Greene, D., and Hayward, S.D. (2000). Human herpesvirus 8 LANA interacts with proteins of the mSin3 corepressor complex and negatively regulates Epstein-Barr virus gene expression in dually infected PEL cells. *J Virol* 74, 9637-9645.
- Krones-Herzig, A., Mittal, S., Yule, K., Liang, H., English, C., Urcis, R., Soni, T., Adamson, E.D., and Mercola, D. (2005). Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53. *Cancer Res* 65, 5133-5143.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Van Eden, M.E., Younan, P., and Lloyd, R.E. (2004). Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol Cell Biol* 24, 1779-1790.
- Lagunoff, M., and Ganem, D. (1997). The structure and coding organization of the genomic termini of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology* 236, 147-154.
- Lan, K., Choudhuri, T., Murakami, M., Kuppers, D.A., and Robertson, E.S. (2006a). Intracellular activated Notch1 is critical for proliferation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-associated B-lymphoma cell lines in vitro. *J Virol* 80, 6411-6419.
- Lan, K., Kuppers, D.A., and Robertson, E.S. (2005a). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation is regulated by interaction of latency-associated nuclear antigen with recombination signal sequence-binding protein Jkappa, the major downstream effector of the Notch signaling pathway. *J Virol* 79, 3468-3478.
- Lan, K., Kuppers, D.A., Verma, S.C., Sharma, N., Murakami, M., and Robertson, E.S. (2005b). Induction of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen by the lytic transactivator RTA: a novel mechanism for establishment of latency. *J Virol* 79, 7453-7465.
- Lan, K., Murakami, M., Bajaj, B., Kaul, R., He, Z., Gan, R., Feldman, M., and Robertson, E.S. (2009). Inhibition of KSHV-infected primary effusion lymphomas in NOD/SCID mice by gamma-secretase inhibitor. *Cancer Biol Ther* 8, 2136-2143.
- Lan, K., Murakami, M., Choudhuri, T., Kuppers, D.A., and Robertson, E.S. (2006b). Intracellular-activated Notch1 can reactivate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency. *Virology* 351, 393-403.
- Lan, K., Verma, S.C., Murakami, M., Bajaj, B., Kaul, R., and Robertson, E.S. (2007). Kaposi's sarcoma herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen stabilizes intracellular activated Notch by targeting the Sel10 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16287-16292.
- Lankat-Buttgereit, B., and Goke, R. (2009). The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biol Cell* 101, 309-317.
- Lebbé, C., Legendre, C., and Frances, C. (2008). Kaposi sarcoma in transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 22, 252-261.
- Lee, H.R., Toth, Z., Shin, Y.C., Lee, J.S., Chang, H., Gu, W., Oh, T.K., Kim, M.H., and Jung, J.U. (2009). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor 4 targets MDM2 to deregulate the p53 tumor suppressor pathway. *J Virol* 83, 6739-6747.
- Li, H., Komatsu, T., Dezube, B.J., and Kaye, K.M. (2002). The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K12 transcript from a primary effusion lymphoma contains complex repeat elements, is spliced, and initiates from a novel promoter. *J Virol* 76, 11880-11888.
- Liang, Y., Chang, J., Lynch, S.J., Lukac, D.M., and Ganem, D. (2002). The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* 16, 1977-1989.
- Liang, Y., and Ganem, D. (2003). Lytic but not latent infection by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus requires host CSL protein, the mediator of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8490-8495.

- Liang, Y., and Ganem, D. (2004). RBP-J (CSL) is essential for activation of the K14/vGPCR promoter of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by the lytic switch protein RTA. *J Virol* 78, 6818-6826.
- Lin, R., Genin, P., Mamane, Y., Sgarbanti, M., Battistini, A., Harrington, W.J., Jr., Barber, G.N., and Hiscott, J. (2001). HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators. *Oncogene* 20, 800-811.
- Lin, S.E., Oyama, T., Nagase, T., Harigaya, K., and Kitagawa, M. (2002). Identification of new human mastermind proteins defines a family that consists of positive regulators for notch signaling. *J Biol Chem* 277, 50612-50620.
- Ling, P.D., and Hayward, S.D. (1995). Contribution of conserved amino acids in mediating the interaction between EBNA2 and CBF1/RBPJk. *J Virol* 69, 1944-1950.
- Ling, P.D., Rawlins, D.R., and Hayward, S.D. (1993). The Epstein-Barr virus immortalizing protein EBNA-2 is targeted to DNA by a cellular enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9237-9241.
- Liu, R., Li, X., Tulpule, A., Zhou, Y., Scehnet, J.S., Zhang, S., Lee, J.S., Chaudhary, P.M., Jung, J., and Gill, P.S. (2010). KSHV-induced notch components render endothelial and mural cell characteristics and cell survival. *Blood* 115, 887-895.
- Liu, Y., Cao, Y., Liang, D., Gao, Y., Xia, T., Robertson, E.S., and Lan, K. (2008). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA activates the processivity factor ORF59 through interaction with RBP-Jkappa and a cis-acting RTA responsive element. *Virology* 380, 264-275.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarrault, S., Seidah, N.G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8108-8112.
- Lubman, O.Y., Ilagan, M.X., Kopan, R., and Barrick, D. (2007). Quantitative dissection of the Notch:CSL interaction: insights into the Notch-mediated transcriptional switch. *J Mol Biol* 365, 577-589.
- Lubman, O.Y., Korolev, S.V., and Kopan, R. (2004). Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. *Mol Cell* 13, 619-626.
- Lukac, D.M., Garibyan, L., Kirshner, J.R., Palmeri, D., and Ganem, D. (2001). DNA binding by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein is necessary for transcriptional activation of two viral delayed early promoters. *J Virol* 75, 6786-6799.
- Maier, S., Staffler, G., Hartmann, A., Hock, J., Henning, K., Grabusic, K., Mailhammer, R., Hoffmann, R., Wilmanns, M., Lang, R., *et al.* (2006). Cellular target genes of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 80, 9761-9771.
- Maltzman, J.S., Carman, J.A., and Monroe, J.G. (1996). Role of EGR1 in regulation of stimulus-dependent CD44 transcription in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 16, 2283-2294.
- Marcelin, A.G., Calvez, V., and Dussaix, E. (2007). KSHV after an organ transplant: should we screen? *Curr Top Microbiol Immunol* 312, 245-262.
- Marshall, V., Parks, T., Bagni, R., Wang, C.D., Samols, M.A., Hu, J., Wyvil, K.M., Aleman, K., Little, R.F., Yarchoan, R., *et al.* (2007). Conservation of virally encoded microRNAs in Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in primary effusion lymphoma cell lines and in patients with Kaposi sarcoma or multicentric Castlemann disease. *J Infect Dis* 195, 645-659.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2, 323-335.
- Matsumura, S., Fujita, Y., Gomez, E., Tanese, N., and Wilson, A.C. (2005). Activation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus major latency locus by the lytic switch protein RTA (ORF50). *J Virol* 79, 8493-8505.
- Mbulaiteye, S.M., and Engels, E.A. (2006). Kaposi's sarcoma risk among transplant recipients in the United States (1993-2003). *Int J Cancer* 119, 2685-2691.
- McMahon, S.B., and Monroe, J.G. (1995). Activation of the p21ras pathway couples antigen receptor stimulation to induction of the primary response gene *egr-1* in B lymphocytes. *J Exp Med* 181, 417-422.
- Mesri, E.A., Cesarman, E., Arvanitakis, L., Rafii, S., Moore, M.A., Posnett, D.N., Knowles, D.M., and Asch, A.S. (1996). Human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells. *J Exp Med* 183, 2385-2390.

- Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S., *et al.* (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* *406*, 369-375.
- Monroe, J. G., A. J. Yellen-Shaw, and V. L. Seyfert. (1993). Molecular basis for unresponsiveness and tolerance induction in immature stage B lymphocytes. *Adv. Mol. Cell. Immunol.* *1*:1–32.
- Moore, P.S., and Chang, Y. (1995). Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. *N Engl J Med* *332*, 1181-1185.
- Moore, P.S., Gao, S.J., Dominguez, G., Cesarman, E., Lungu, O., Knowles, D.M., Garber, R., Pellett, P.E., McGeoch, D.J., and Chang, Y. (1996). Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J Virol* *70*, 549-558.
- Moratz, C., Kang, V.H., Druey, K.M., Shi, C.S., Scheschonka, A., Murphy, P.M., Kozasa, T., and Kehrl, J.H. (2000). Regulator of G protein signaling 1 (RGS1) markedly impairs Gi alpha signaling responses of B lymphocytes. *J Immunol* *164*, 1829-1838.
- Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* *5*, 197-206.
- Mylona, E.E., Baraboutis, I.G., Lekakis, L.J., Georgiou, O., Papastamopoulos, V., and Skoutelis, A. (2008). Multicentric Castleman's disease in HIV infection: a systematic review of the literature. *AIDS Rev* *10*, 25-35.
- Nador, R.G., Cesarman, E., Chadburn, A., Dawson, D.B., Ansari, M.Q., Sald, J., and Knowles, D.M. (1996). Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Blood* *88*, 645-656.
- Nair, P., Muthukkumar, S., Sells, S.F., Han, S.S., Sukhatme, V.P., and Rangnekar, V.M. (1997). Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J Biol Chem* *272*, 20131-20138.
- Nakamura, H., Li, M., Zarycki, J., and Jung, J.U. (2001). Inhibition of p53 tumor suppressor by viral interferon regulatory factor. *J Virol* *75*, 7572-7582.
- Nam, Y., Sliz, P., Song, L., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2006). Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell* *124*, 973-983.
- Nam, Y., Weng, A.P., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2003). Structural requirements for assembly of the CSL.intracellular Notch1.Mastermind-like 1 transcriptional activation complex. *J Biol Chem* *278*, 21232-21239.
- Nguyen, H., Hiscott, J., and Pitha, P.M. (1997). The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev* *8*, 293-312.
- Offermann, M.K. (2007). Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded interferon regulator factors. *Curr Top Microbiol Immunol* *312*, 185-209.
- Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T.W., *et al.* (1995). Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* *121*, 3291-3301.
- Okajima, T., Xu, A., and Irvine, K.D. (2003). Modulation of notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and fringe. *J Biol Chem* *278*, 42340-42345.
- Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tani, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., and Haass, C. (2002). Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *Embo J* *21*, 5408-5416.
- Oksenhendler, E., Boulanger, E., Galicier, L., Du, M.Q., Dupin, N., Diss, T.C., Hamoudi, R., Daniel, M.T., Agbalika, F., Boshoff, C., *et al.* (2002). High incidence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-related non-Hodgkin lymphoma in patients with HIV infection and multicentric Castleman disease. *Blood* *99*, 2331-2336.
- Orlando, V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* *25*, 99-104.
- Orlando, V., Strutt, H., and Paro, R. (1997). Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* *11*, 205-214.

- Palmero, I., Holder, A., Sinclair, A.J., Dickson, C., and Peters, G. (1993). Cyclins D1 and D2 are differentially expressed in human B-lymphoid cell lines. *Oncogene* 8, 1049-1054.
- Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K.D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387, 908-912.
- Pantanowitz, L., and Duke, W.H. (2008). Lymphoedematous variants of Kaposi's sarcoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 22, 118-120.
- Park, J., Lee, M.S., Yoo, S.M., Jeong, K.W., Lee, D., Choe, J., and Seo, T. (2007). Identification of the DNA sequence interacting with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor 1. *J Virol* 81, 12680-12684.
- Parks, A.L., Klueg, K.M., Stout, J.R., and Muskavitch, M.A. (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373-1385.
- Pearce, M., Matsumura, S., and Wilson, A.C. (2005). Transcripts encoding K12, v-FLIP, v-cyclin, and the microRNA cluster of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus originate from a common promoter. *J Virol* 79, 14457-14464.
- Petcherski, A.G., and Kimble, J. (2000). Mastermind is a putative activator for Notch. *Curr Biol* 10, R471-473.
- Pica, F., and Volpi, A. (2007). Transmission of human herpesvirus 8: an update. *Curr Opin Infect Dis* 20, 152-156.
- Pignatelli, M., Luna-Medina, R., Perez-Rendon, A., Santos, A., and Perez-Castillo, A. (2003). The transcription factor early growth response factor-1 (EGR-1) promotes apoptosis of neuroblastoma cells. *Biochem J* 373, 739-746.
- Piolt, T., Tramier, M., Coppey, M., Nicolas, J.C., and Marechal, V. (2001). Close but distinct regions of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen 1 are responsible for nuclear targeting and binding to human mitotic chromosomes. *J Virol* 75, 3948-3959.
- Powles, T., Stebbing, J., Bazeos, A., Hatzimichael, E., Mandalia, S., Nelson, M., Gazzard, B., and Bower, M. (2009). The role of immune suppression and HHV-8 in the increasing incidence of HIV-associated multicentric Castleman's disease. *Ann Oncol* 20, 775-779.
- Prabhu, N.V., and Sharp, K.A. (2005). Heat capacity in proteins. *Annu Rev Phys Chem* 56, 521-548.
- Pursglove, S.E., and Mackay, J.P. (2005). CSL: a notch above the rest. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 2472-2477.
- Radkov, S.A., Kellam, P., and Boshoff, C. (2000). The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med* 6, 1121-1127.
- Radtke, F., Fasnacht, N., and Macdonald, H.R. (2010). Notch signaling in the immune system. *Immunity* 32, 14-27.
- Rand, M.D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J., and Aster, J.C. (2000). Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol Cell Biol* 20, 1825-1835.
- Rangel, J., Nosrati, M., Leong, S.P., Haqq, C., Miller, J.R., 3rd, Sagebiel, R.W., and Kashani-Sabet, M. (2008). Novel role for RGS1 in melanoma progression. *Am J Surg Pathol* 32, 1207-1212.
- Regezi, J.A., MacPhail, L.A., Daniels, T.E., DeSouza, Y.G., Greenspan, J.S., and Greenspan, D. (1993a). Human immunodeficiency virus-associated oral Kaposi's sarcoma. A heterogeneous cell population dominated by spindle-shaped endothelial cells. *Am J Pathol* 143, 240-249.
- Regezi, J.A., MacPhail, L.A., Daniels, T.E., Greenspan, J.S., Greenspan, D., Dodd, C.L., Lozada-Nur, F., Heinic, G.S., Chinn, H., Silverman, S., Jr., *et al.* (1993b). Oral Kaposi's sarcoma: a 10-year retrospective histopathologic study. *J Oral Pathol Med* 22, 292-297.
- Reis, P.P., Tomenson, M., Cervigne, N.K., Machado, J., Jurisica, I., Pintilie, M., Sukhai, M.A., Perez-Ordenez, B., Grenman, R., Gilbert, R.W., *et al.* (2010). Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 9, 238.
- Renne, R., Blackbourn, D., Whitby, D., Levy, J., and Ganem, D. (1998). Limited transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J Virol* 72, 5182-5188.

- Renne, R., Lagunoff, M., Zhong, W., and Ganem, D. (1996). The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J Virol* 70, 8151-8154.
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I.A., Debatin, K.M., Fischer, A., and de Villartay, J.P. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349.
- Rivas, C., Thlick, A.E., Parravicini, C., Moore, P.S., and Chang, Y. (2001). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. *J Virol* 75, 429-438.
- Roca, B. (2009). Castleman's Disease. A Review. *AIDS Rev* 11, 3-7.
- Romagnoli, L., Sariyer, I.K., Tung, J., Feliciano, M., Sawaya, B.E., Del Valle, L., Ferrante, P., Khalili, K., Safak, M., and White, M.K. (2008). Early growth response-1 protein is induced by JC virus infection and binds and regulates the JC virus promoter. *Virology* 375, 331-341.
- Russo, J.J., Bohenzky, R.A., Chien, M.C., Chen, J., Yan, M., Maddalena, D., Parry, J.P., Peruzzi, D., Edelman, I.S., Chang, Y., *et al.* (1996). Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14862-14867.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., *et al.* (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18, 675-685.
- Sakai, T., Taniguchi, Y., Tamura, K., Minoguchi, S., Fukuhara, T., Strobl, L.J., Zimmer-Strobl, U., Bornkamm, G.W., and Honjo, T. (1998). Functional replacement of the intracellular region of the Notch1 receptor by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 72, 6034-6039.
- Sakakibara, S., Ueda, K., Chen, J., Okuno, T., and Yamanishi, K. (2001). Octamer-binding sequence is a key element for the autoregulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50/Lyta gene expression. *J Virol* 75, 6894-6900.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sander, G., Konrad, A., Thurau, M., Wies, E., Leubert, R., Kremmer, E., Dinkel, H., Schulz, T., Neipel, F., and Sturzl, M. (2008). Intracellular localization map of human herpesvirus 8 proteins. *J Virol* 82, 1908-1922.
- Santos, M.A., Sarmiento, L.M., Rebelo, M., Doce, A.A., Maillard, I., Dumortier, A., Neves, H., Radtke, F., Pear, W.S., Parreira, L., *et al.* (2007). Notch1 engagement by Delta-like-1 promotes differentiation of B lymphocytes to antibody-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15454-15459.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P., and Wagner, E.F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* 13, 607-619.
- Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., and Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-386.
- Schulz, T.F. (2006). The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus. *J Pathol* 208, 187-198.
- Schulz, T.F. (2009). Humane Immundefizienz-Viren (HIV-1, HIV-2). In *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer, ed. 532.
- Smith, R.W., and Gray, N.K. (2010). Poly(A)-binding protein (PABP): a common viral target. *Biochem J* 426, 1-12.
- Soulier, J., Grollet, L., Oksenhendler, E., Cacoub, P., Cazals-Hatem, D., Babinet, P., d'Agay, M.F., Clauvel, J.P., Raphael, M., Degos, L., *et al.* (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* 86, 1276-1280.
- Speck, S.H., and Ganem, D. (2010). Viral latency and its regulation: lessons from the gamma-herpesviruses. *Cell Host Microbe* 8, 100-115.
- Staudt, M.R., and Dittmer, D.P. (2007). The Rta/Orf50 transactivator proteins of the gamma-herpesviridae. *Curr Top Microbiol Immunol* 312, 71-100.
- Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6, 625-636.

- Sturn, A., Quackenbusch, J., Trajanoski, Z. (2002). Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18: 207-208.
- Sun, R., Lin, S.F., Staskus, K., Gradoville, L., Grogan, E., Haase, A., and Miller, G. (1999). Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J Virol* 73, 2232-2242.
- Szekely, L., Chen, F., Teramoto, N., Ehlin-Henriksson, B., Pokrovskaja, K., Szeles, A., Manneborg-Sandlund, A., Lowbeer, M., Lennette, E.T., and Klein, G. (1998). Restricted expression of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded, growth transformation-associated antigens in an EBV- and human herpesvirus type 8-carrying body cavity lymphoma line. *J Gen Virol* 79 ( Pt 6), 1445-1452.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., and Honjo, T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* 5, 1416-1423.
- Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A., Nakano, T., and Honjo, T. (2002). Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol* 3, 443-450.
- Thomas, M., Calamito, M., Srivastava, B., Maillard, I., Pear, W.S., and Allman, D. (2007). Notch activity synergizes with B-cell-receptor and CD40 signaling to enhance B-cell activation. *Blood* 109, 3342-3350.
- Tierney, R.J., Steven, N., Young, L.S., and Rickinson, A.B. (1994). Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol* 68, 7374-7385.
- Tonon, G., Modi, S., Wu, L., Kubo, A., Coxon, A.B., Komiya, T., O'Neil, K., Stover, K., El-Naggar, A., Griffin, J.D., *et al.* (2003). t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet* 33, 208-213.
- Tran, T., Paz, P., Velichko, S., Cifrese, J., Belur, P., Yamaguchi, K.D., Ku, K., Mirshahpanah, P., Reder, A.T., and Croze, E. (2010). Interferonbeta-1b Induces the Expression of RGS1 a Negative Regulator of G-Protein Signaling. *Int J Cell Biol* 2010, 529376.
- Trivedi, P., Takazawa, K., Zompetta, C., Cuomo, L., Anastasiadou, E., Carbone, A., Uccini, S., Belardelli, F., Takada, K., Frati, L., *et al.* (2004). Infection of HHV-8+ primary effusion lymphoma cells with a recombinant Epstein-Barr virus leads to restricted EBV latency, altered phenotype, and increased tumorigenicity without affecting TCL1 expression. *Blood* 103, 313-316.
- Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T., and Kawaichi, M. (1994). Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22, 965-971.
- Uetz, P., Dong, Y.A., Zeretzke, C., Atzler, C., Baiker, A., Berger, B., Rajagopala, S.V., Roupelieva, M., Rose, D., Fossum, E., *et al.* (2006). Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* 311, 239-242.
- Wallberg, A.E., Pedersen, K., Lendahl, U., and Roeder, R.G. (2002). p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Mol Cell Biol* 22, 7812-7819.
- Wamburu, G., Masenga, E.J., Moshi, E.Z., Schmid-Grendelmeier, P., Kempf, W., and Orfanos, C.E. (2006). HIV - associated and non - HIV associated types of Kaposi's sarcoma in an African population in Tanzania. Status of immune suppression and HHV-8 seroprevalence. *Eur J Dermatol* 16, 677-682.
- Wang, H.Y., Fuda, F.S., Chen, W., and Karandikar, N.J. (2010). Notch1 in primary effusion lymphoma: a clinicopathological study. *Mod Pathol* 23, 773-780.
- Wang, K., and Samudrala, R. (2006). Incorporating background frequency improves entropy-based residue conservation measures. *BMC Bioinformatics* 7, 385.
- Wang, S.E., Wu, F.Y., Fujimuro, M., Zong, J., Hayward, S.D., and Hayward, G.S. (2003). Role of CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) in activation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) lytic-cycle replication-associated protein (RAP) promoter in cooperation with the KSHV replication and transcription activator (RTA) and RAP. *J Virol* 77, 600-623.
- Wen, K.W., and Damania, B. (2009). Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. *Cancer Lett* 289, 140-150.



- Wen, H.J., Minhas, V., and Wood, C. (2009). Identification and characterization of a new Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication and transcription activator (RTA)-responsive element involved in RTA-mediated transactivation. *J Gen Virol* 90, 944-953.
- Weninger, W., Partanen, T.A., Breiteneder-Geleff, S., Mayer, C., Kowalski, H., Mildner, M., Pammer, J., Sturzl, M., Kerjaschki, D., Alitalo, K., *et al.* (1999). Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells. *Lab Invest* 79, 243-251.
- Whitby, D., Luppi, M., Barozzi, P., Boshoff, C., Weiss, R.A., and Torelli, G. (1998). Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. *J Natl Cancer Inst* 90, 395-397.
- Wilson, J.J., and Koval, R.A. (2006). Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell* 124, 985-996.
- Wong, Y.F., Cheung, T.H., Tsao, G.S., Lo, K.W., Yim, S.F., Wang, V.W., Heung, M.M., Chan, S.C., Chan, L.K., Ho, T.W., *et al.* (2006). Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray. *Int J Cancer* 118, 2461-2469.
- Wu, L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S., and Griffin, J.D. (2000). MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* 26, 484-489.
- Wu, L., Maillard, I., Nakamura, M., Pear, W.S., and Griffin, J.D. (2007). The transcriptional coactivator Maml1 is required for Notch2-mediated marginal zone B-cell development. *Blood* 110, 3618-3623.
- Wu, L., Sun, T., Kobayashi, K., Gao, P., and Griffin, J.D. (2002). Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. *Mol Cell Biol* 22, 7688-7700.
- Ye, J., Gradoville, L., Daigle, D., and Miller, G. (2007). De novo protein synthesis is required for lytic cycle reactivation of Epstein-Barr virus, but not Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, in response to histone deacetylase inhibitors and protein kinase C agonists. *J Virol* 81, 9279-9291.
- Zhao, G., Cui, M.Z., Mao, G., Dong, Y., Tan, J., Sun, L., and Xu, X. (2005). gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J Biol Chem* 280, 37689-37697.
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J.J., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G., and Hayward, S.D. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of Notch1C To facilitate Notch1C function. *Mol Cell Biol* 20, 2400-2410.
- Zhu, Y., Hollmen, J., Raty, R., Aalto, Y., Nagy, B., Elonen, E., Kere, J., Mannila, H., Franssila, K., and Knuutila, S. (2002). Investigatory and analytical approaches to differential gene expression profiling in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 119, 905-915.

## 7 Danksagung

Bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Bettina Kempkes möchte ich mich für die gute wissenschaftliche Betreuung, Diskussionen und Gespräche und ihr stets offenes Ohr bei sämtlichen Anliegen und Problemen bedanken.

Corinna Hintermair und Dr. Bin Hu danke ich für ihre zeitaufwendige Hilfe am Konfokalmikroskop und Manuel Deutsch für die Bereitstellung verschiedener Reagenzien.

Vielen Dank auch an meine (ehemaligen) Kolleginnen Sabine Petermann, Agnes Nowak, Kathrin Griß und Heike Pfister für ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit im Labor.

Mein besonderer Dank gilt zweifelsohne meiner Kollegin Barbara Scholz für ihre Hilfe, ihre Unterstützung, ihre Teambereitschaft im KSHV Projekt und die guten Gespräche, vor allem am Ende der Doktorarbeit. Trotz so mancher Schwierigkeiten in unseren beiden Projekten, gab es dennoch viele schöne und lustige Nachmittage (der drei Musketiere), die ich sicher nicht missen möchte.

Großer Dank gilt insbesondere Marie Hertle für ihre Unterstützung, Rat und Hilfe und ihre herzliche und fröhliche Art. Es ist schön eine Freundin gefunden zu haben bei der Blicke (und Lieder) genügen um sich zu verständigen.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meiner ganzen Familie bedanken. Ohne ihren Rückhalt und Zuspruch über viele Jahre hinweg wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank an Elke für das intensive Korrekturlesen dieser Arbeit und die aufmunternden Worte in der letzten Phase. Meiner Mama und Christine danke ich vielmals für die bedingungslose Unterstützung, ihrem Verständnis und ehrlichen Interesse an meiner Arbeit über die lange Zeit hinweg. Ich weiß, dass meine Familie immer an mich glaubt und ich mich allzeit voll auf sie verlassen kann. Vielen Dank auch an Stefan und Tobi, die mit mir am Ende (wieder mal) den Kampf gegen Computer und Drucker aufgenommen haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich von Herzen bei Simon, einem ganz wunderbaren Menschen, bedanken - für seine Liebe, sein Verständnis und die Kraft, die er mir in den schwierigen Zeiten gab. Es macht mich sehr glücklich ihn als so wichtigen Gesprächspartner an meiner Seite zu wissen und ich danke ihm vielmals für seine Aufmerksamkeit, sein Interesse und seine unendliche Geduld.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
α	anti
Abb	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Adn	Adenin
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure
3'-AT	3'-Amino-1, 2, 4-triazol
BCBL	Body cavity based lymphoma
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaar
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid
CBF1	<i>C-promotor binding factor</i>
cDNA	komplementäre DNA
cfu	<i>colony forming units</i>
CMV	Cytomegalievirus
Cp	<i>Crossing-point</i>
DBD	DNA Bindedomäne
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DO	Dropout (selektive Aminosäurelösung)
Dox	Doxycyclin
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N, N-tetra-Acetat
EGR1	<i>early growth response 1</i>
engl.	englisch
F	Farad
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
Gen	Gentamicin

---

h	Stunde
HCl	Hydrochlorid
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
HEK	Human Embyonic Kidney
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IP	Immunpräzipitation
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KS	Kaposi-Sarkom
KSHV	Karposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus
l	Liter
L	Lysat
LANA	Latenz assoziiertes nukleäres Antigen
LB	Luria Bertani
Leu	Leucin
LiAc	Licium-Acetat
LMP	latentes Membranprotein
M	Mol
mA	Milliampere
MCD	Multizentrische Castleman Erkrankung
µg	Microgramm
µl	Microliter
MAML	<i>mastermind-like</i>
min	Minuten
m.k.	monoklonal
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mt	Mutante
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NGFR	<i>Nerve growth factor receptor</i>
nm	Nanometer
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
P	Prolin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDCD4	<i>programmed cell death 4</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin

PEL	Primäres Effusionslymphom
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
p.k.	polyklonal
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
%	Prozent
RBP-Jk	Rekombinationssignal-Bindungsprotein für Immunglobulin Kappa J Region
RGS	Regulator der G-Protein-Signalgebung
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTA	Replikations- und Transkriptionsaktivator
SD	Hefe-Selektivmedium
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacryamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
Tab	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
Tris base	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
Trp	Tryptophan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vIRF	viraler Interferon regulatorischer Faktor
wt	Wildtyp
W	Aminosäure Tryptophan
YPDA	Adenin-supplementiertes Hefe-Vollmedium

## 8.2 Der vIRF4-Peptidblot

Die Liste gibt die 300 der 15-Aminosäure-Peptide (Spots) von vIRF4 wieder, die im Peptidarray auf eine Cellulosemembran aufgespottet wurden. Die Peptidsequenzen sind jeweils um drei Aminosäuren versetzt. Für jedes Peptid ist die Signalintensität als relative Phosphorimagerereinheit – das Integral über einer vorgegebenen Fläche – angegeben.

### ***Peptid / Peptidsequenz / Signalintensität***

<b>1</b>	<b>MPKAGGSEWATLWII 13.77</b>	<b>3</b>	<b>SEWATLWIIDALENN 53.44</b>
<b>2</b>	<b>AGGSEWATLWIIDAL 26.47</b>	<b>4</b>	<b>ATLWIIDALENNKFP 54.10</b>

5	WIIDALENNKFPYFS	32.85	52	DTREQSYEEAGAAAP	14.44
6	DALENNKFPYFSWFD	39.09	53	EQSYEEAGAAAPAPP	42.95
7	ENNKFPYFSWFDNRN	59.70	54	YEEAGAAAPAPPKAP	34.33
8	KFPYFSWFDNRNLLF	148.86	55	AGAAAPAPPKAPSGL	27.15
9	YFSWFDNRNLLFAAP	69.68	56	AAPAPPKAPSGLRGR	88.04
10	WFDNRNLLFAAPAPL	102.26	57	APPKAPSGLRGRPRK	379.02
11	RNLLFAAPAPLPAG	114.10	58	KAPSGLRGRPRKSNR	323.13
12	LLFAAPAPLPAGSDI	93.54	59	SGLRGRPRKSNRYYN	580.10
13	AAPAPLPAGSDIPPG	19.71	60	RGRPRKSNRYYNVGD	552.60
14	APLPAGSDIPPGWYS	67.61	61	PRKSNRYYNVGDITT	724.58
15	PAGSDIPPGWYSVYH	56.94	62	SNRYYNVGDITTEQK	266.83
16	SDIPPGWYSVYHAFD	21.91	63	YYNVGDITTEQKAAC	66.87
17	PPGWYSVYHAFDEEC	20.16	64	VGDITTEQKAACSVW	34.70
18	WYSVYHAFDEECDRV	52.06	65	ITTEQKAACSVWIPV	42.27
19	VYHAFDEECDRVYGP	44.20	66	EQKAACSVWIPVNEG	23.26
20	AFDEECDRVYGPSPV	59.21	67	AACSVWIPVNEGAST	7.23
21	EECDRVYGPSPVVGQ	10.11	68	SVWIPVNEGASTSGM	6.44
22	DRVYGPSPVVGQTVY	13.19	69	IPVNEGASTSGMGSS	0.52
23	YGSPVVGQTVYGRF	47.34	70	NEGASTSGMGSSGTR	8.69
24	SPVVGQTVYGRFRGL	144.09	71	ASTSGMGSSGTRQVT	20.44
25	VGQTVYGRFRGRLLRG	464.16	72	SGMGSSGTRQVTQAS	7.78
26	TVYGRFRGRLLRGTRR	529.08	73	GSSGTRQVTQASSFT	17.33
27	GRFRGRLLRGTRRAV	429.87	74	GTRQVTQASSFTWRV	133.71
28	GRLLRGTRRAVVRND	393.13	75	QVTQASSFTWRVPGD	37.71
29	LRGTRRAVVRNDLRY	315.59	76	QASSFTWRVPGDPPA	19.33
30	TRRAVVRNDLRYSDT	525.53	77	SFTWRVPGDPPAPST	41.00
31	AVVRNDLRYSDTFGG	25.62	78	WRVPGDPPAPSTLTG	16.79
32	RNDLRYSDTFGGSYV	155.25	79	PGDPPAPSTLTGPSD	14.04
33	LRYSDTFGGSYVVWQ	94.45	80	PPAPSTLTGPSDPHS	19.29
34	SDTFGGSYVVWQLVR	40.31	81	PSTLTGPSDPHSSGA	15.36
35	FGGSYVVWQLVRTPF	63.13	82	LTGPSDPHSSGAGLP	20.12
36	SYVVWQLVRTPFKNC	128.76	83	PSDPHSSGAGLPGTA	11.93
37	VWQLVRTPFKNCTYC	141.12	84	PHSSGAGLPGTAPPK	16.99
38	LVRTPFKNCTYCYGA	334.67	85	SGAGLPGTAPPKPQH	24.57
39	TPFKNCTYCYGAAYG	172.46	86	GLPGTAPPKPQHETR	58.75
40	KNCTYCYGAAYGPEK	177.55	87	GTAPPKPQHETRLAG	156.68
41	TYCYGAAYGPEKLQR	59.78	88	PKPQHETRLAGTVS	128.64
42	YGAAYGPEKLQRFIQ	30.94	89	PQHETRLAGTVSGVS	44.16
43	AYGPEKLQRFIQCLL	18.94	90	ETRLAGTVSGVSGVA	145.97
44	PEKLQRFIQCLLSPP	29.35	91	LAGTVSGVSGVAQTP	61.92
45	LQRFIQCLLSPPMQT	12.26	92	TVSGVSGVAQTPGDT	10.13
46	FIQCLLSPPMQTTAT	5.80	93	GVSVAQTPGDTGQL	18.66
47	CLLSPPMQTTATRRS	29.32	94	GVAQTPGDTGQLAPP	2.00
48	SPPMQTTATRRSDTR	50.97	95	QTPGDTGQLAPPMRD	18.18
49	MQTTATRRSDTREQS	79.78	96	GDTGQLAPPMRDGSR	2.28
50	TATRRSDTREQSYEE	90.90	97	GQLAPPMRDGSRLPS	8.71
51	RRSDTREQSYEEAGA	165.50	98	APPMRDGSRLPSTSP	10.39

99	MRDGSRLPSTSPWIP	77.85	146	PQPPSAPAPGYAKPS	15.20
100	GSRLPSTSPWIPACF	166.15	147	PSAPAPGYAKPSCYN	7.56
101	LPSTSPWIPACFPWG	85.22	148	PAPGYAKPSCYNWSP	26.56
102	TSPWIPACFPWGDLP	16.24	149	GYAKPSCYNWSPLAE	58.52
103	WIPACFPWGDLPVTG	29.34	150	KPSCYNWSPLAEPPA	52.45
104	ACFPWGDLPVTGWWP	66.02	151	CYNWSPLAEPPATRP	12.91
105	PWGDLPVTGWWPQGA	58.09	152	WSPLAEPPATRPIRA	22.33
106	DLPVTGWWPQGASGL	78.56	153	LAEPPATRPPIRAPVW	68.14
107	VTGWWPQGASGLPEK	42.94	154	PPATRPPIRAPVWHPP	451.29
108	WWPQGASGLPEKVHP	16.09	155	TRPIRAPVWHPPVGH	2327.46
109	QGASGLPEKVHPPTT	11.22	156	IRAPVWHPPVGHAVV	2160.30
110	SGLPEKVHPPTTQGF	43.11	157	PVWHPPVGHAVVPEV	210.41
111	PEKVHPPTTQGFDP	57.49	158	HPPVGHAVVPEVRTP	35.64
112	VHPPTTQGFDPSPR	28.29	159	VGHAVVPEVRTPLWI	11.79
113	PTTQGFDPSPRWTY	171.15	160	AVVPEVRTPLWIPWS	8.73
114	GQFDPSPRWTYTGI	37.84	161	PEVRTPLWIPWSSGG	14.04
115	DPLSPRWTYTGIPSS	89.13	162	RTPLWIPWSSGGAPN	243.93
116	SPRWTYTGIPSSQLN	67.84	163	LWIPWSSGGAPNQGL	34.10
117	WTYTGIPSSQLNPAA	11.73	164	PWSSGGAPNQGLSHT	73.58
118	TGIPSSQLNPAAPSW	17.74	165	SGGAPNQGLSHTQGG	9.52
119	PSSQLNPAAPSWIPP	8.66	166	APNQGLSHTQGGASA	7.32
120	QLNPAAPSWIPPHAQ	0.49	167	QGLSHTQGGASATPS	21.72
121	PAAPSWIPPHAQAGT	5.73	168	SHTQGGASATPSAGA	5.67
122	PSWIPPHAQAGTFVG	5.52	169	QGGASATPSAGAPPT	30.22
123	IPPHAQAGTFVGEFS	6.69	170	ASATPSAGAPPTPEV	1.09
124	HAQAGTFVGEFSQGA	61.41	171	TPSAGAPPTPEVAER	1.35
125	AGTFVGEFSQGAPLA	25.28	172	AGAPPTPEVAERQEP	39.50
126	FVGEFSQGAPLAPQG	39.73	173	PPTPEVAERQEPSSS	21.22
127	EFSQGAPLAPQGLLP	14.14	174	PEVAERQEPSSSGIP	49.22
128	QGAPLAPQGLLPQSG	47.05	175	AERQEPSSSGIPYVC	34.79
129	PLAPQGLLPQSGQCA	157.61	176	QEPSSSGIPYVCQGD	11.43
130	PQGLLPQSGQCASAW	340.92	177	SSSGIPYVCQGDNMA	17.48
131	LLPQSGQCASAWLPR	310.50	178	GIPYVCQGDNMATGY	65.66
132	QSGQCASAWLPRRET	127.96	179	YVCQGDNMATGYRRV	226.17
133	QCASAWLPRRETGAE	46.16	180	QGDNMATGYRRVTTS	414.94
134	SAWLPRRETGAEGAC	50.56	181	NMATGYRRVTTS SGA	643.25
135	LPRRETGAEGACGAS	28.91	182	TGYRRVTTS SGALEV	304.85
136	RETGAEGACGASTEG	51.98	183	RRVTTS SGALEVEI	180.29
137	GAEGACGASTEGRAP	56.80	184	TTSSGALEVEIIDLT	29.00
138	GACGASTEGRAPQGA	48.63	185	SGALEVEIIDLTGDS	142.70
139	GASTEGRAPQGAASE	5.97	186	LEVEIIDLTGDS DTP	167.26
140	TEGRAPQGAASERVY	5.07	187	EIIDLTGDS DTPSTT	23.18
141	RAPQGAASERVYPFE	62.24	188	DLTGDS DTPSTTVAS	6.94
142	QGAASERVYPFEPQP	3.02	189	GDS DTPSTTVASTPL	60.90
143	ASERVYPFEPQPPSA	40.95	190	DTPSTTVASTPLPVS	4.43
144	RVYPFEPQPPSAPAP	25.76	191	STTVASTPLPVSGPR	46.21
145	PFEPQPPSAPAPGYA	15.88	192	VASTPLPVSGPRVFQ	4.07

193	TPLFVSGPRVFQPTV	117.31	240	KPPSKMFFDPPDSQR	131.74
194	PVSGPRVFQPTVLYS	20.39	241	SKMFFDPPDSQRVSF	33.06
195	GPRVFQPTVLYSAPE	32.68	242	FFDPPDSQRVSFVVE	61.68
196	VFQPTVLYSAPEPAV	8.12	243	PPDSQRVSFVVEIFV	50.55
197	PTVLYSAPEPAVNPE	77.72	244	SQRVSFVVEIFVYGN	17.75
198	LYSAPEPAVNPEVSH	6.80	245	VSFVVEIFVYGNLRG	31.15
199	APEPAVNPEVSHLPT	6.84	246	VVEIFVYGNLRGTLR	16.20
200	PAVNPEVSHLPTLEL	25.44	247	IFVYGNLRGTLRREG	100.45
201	NPEVSHLPTLELERR	10.50	248	YGNLRGTLRREGDAG	233.65
202	VSHLPTLELERRRECV	13.82	249	LRGTLRREGDAGEAM	114.38
203	LPTELERRECVCPGS	33.09	250	TLRREGDAGEAMLCS	21.84
204	ELERRECVCPGSGER	92.68	251	REGDAGEAMLCSWPV	9.29
205	RRECVCPGSGERPRV	221.78	252	DAGEAMLCSWPVGDT	8.27
206	CVCPCGSGERPRVPL	72.70	253	EAMLCSWPVGDTLGH	14.71
207	PGSGERPRVPLVSTY	38.87	254	LCSWPVGDTLGHLQC	19.60
208	GERPRVPLVSTYAGD	21.76	255	WPVGDTLGHLQCQSF	25.17
209	PRVPLVSTYAGDRYA	39.39	256	GDTLGHLQCQSFVPE	24.23
210	PLVSTYAGDRYAVGG	145.42	257	LGHLQCQSFVPELLRI	14.43
211	STYAGDRYAVGGYGP	33.27	258	LCQSFVPELLRIPRL	15.31
212	AGDRYAVGGYGPEQS	14.96	259	SFVPELLRIPRLTVP	15.67
213	RYAVGGYGPEQSLVP	203.40	260	PELLRIPRLTVPSP	9.15
214	VGGYGPEQSLVPPPL	25.22	261	LRIPRLTVPSPQOME	39.19
215	YGPEQSLVPPPLGLP	109.57	262	PRLTVPSPQOMEILN	6.52
216	EQSLVPPPLGLPLTL	1.55	263	TVPSPEQMEILNRVF	4.34
217	LVPPPLGLPLTLNL	3.43	264	SPEQMEILNRVFEGL	16.02
218	PPLGLPLTLNLQGE	20.56	265	QMEILNRVFEGLGHG	12.96
219	GLPLTLNLQGEDIC	3.06	266	ILNRVFEGLGHGFPI	47.52
220	LTLNLQGEDICTWE	20.44	267	RVFEGLGHGFPIFCS	26.15
221	SNLQGEDICTWEEGL	35.31	268	EGLGHGFPIFCSMSG	105.90
222	QGEDICTWEEGLGNI	13.50	269	GHGFPIFCSMSGIYS	22.16
223	DICTWEEGLGNILSE	26.85	270	FPIFCSMSGIYSRNA	98.39
224	TWEEGLGNILSELQE	83.97	271	FCSMSGIYSRNATQV	49.86
225	EGLGNILSELQEEPS	85.76	272	MSGIYSRNATQVEGW	11.77
226	GNILSELQEEPSST	7.17	273	IYSRNATQVEGWVFG	16.77
227	LSELQEEPSSTRQA	8.77	274	RNATQVEGWVFGNPN	110.53
228	LQEEPSSTRQATDR	24.96	275	TQVEGWVFGNPNRSY	8.77
229	EPSSSTRQATDRRRP	35.70	276	EGWVFGNPNRSYERI	16.36
230	SSTRQATDRRRPRSR	551.43	277	WFGNPNRSYERILRS	244.58
231	RQATDRRRPRSRSPH	630.21	278	NPNSRYERILRSFSP	273.93
232	TDRRRPRSRSPHGRR	520.38	279	SRYERILRSFSPRVP	305.58
233	RRPRSRSPHGRRTPV	677.59	280	ERILRSFSPRVPQQL	125.79
234	RSRSPHGRRTPVSHS	416.67	281	LSRFSRVPQQLFNT	293.61
235	SPHGRRTPVSHSGPE	212.06	282	FSPRVPQQLFNTARY	70.75
236	GRRTPVSHSGPEKPP	400.01	283	RVPQQLFNTARYLAT	116.75
237	TPVSHSGPEKPPSKM	10.40	284	QQLFNTARYLATTAA	51.73
238	SHSGPEKPPSKMFFD	13.25	285	FNTARYLATTAAIPQ	70.45
239	GPEKPPSKMFFDPPD	14.36	286	ARYLATTAAIPQTPL	26.19



287	LATTAAIPQTPLSVN	6.76	294	VFFGASPASTENFQN	12.57
288	TAAIPQTPLSVNPVT	24.68	295	GASPASTENFQNVPL	10.84
289	IPQTPLSVNPVTCGT	5.09	296	PASTENFQNVPLTVK	6.15
290	TPLSVNPVTCGTVFF	6.82	297	TENFQNVPLTVKIFI	74.02
291	SVNPVTCGTVFFGAS	8.37	298	FQNVPLTVKIFIGSI	10.01
292	PVTCGTVFFGASPAS	8.75	299	VPLTVKIFIGSIWDS	13.33
293	CGTVFFGASPASTEN	61.54	300	LTVKIFIGSIWDSLH	15.49

### 8.3 Affymetrix-Microarrayanalyse

Die normalisierten Daten der Genexpressionsanalyse mit Gesamt-RNA und nascenter RNA sowie die Daten nach statistischer Auswertung der Analyse mit Gesamt-RNA liegen dieser Arbeit in Form einer CD-ROM bei.

Excel-Tabelle A) enthält die Daten der Genexpressionsanalyse mit Gesamt-RNA:

RMA-normalisierte Expressionswerte der sechs Affymetrix-Microarrays Human Gene ST 1.0 sowie den p-Werten aus der statistischen Bewertung der 33.298 *Probesets* durch den Student'schen t-Test unter gleicher Varianz; Annotierung der *Probesets* aus dem Jahr 2010;

Excel-Tabelle B) enthält die Daten der Genexpressionsanalyse mit nascenter RNA:

RMA-normalisierte Expressionswerte der sieben Affymetrix-Microarrays Human Gene ST 1.0; Annotierung der *Probesets* aus dem Jahr 2009;

## 9 Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt worden ist.

München, 1. Juni 2011

---

Katharina Heinzemann