

**Modulation von p53 durch die N-terminale Domäne  
der Thymidinkinase des Humanen-Herpesvirus-8**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**eingereicht von  
René Leubert**

**Die Arbeit wurde in der Abteilung Virale Vaskulopathie am  
Institut für Molekulare Virologie des GSF-Forschungszentrum  
für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg durchgeführt.**

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12 Abs. 3 der Promotionsordnung von Herrn PD Dr. B. Salmons betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbstständig , ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 14. 12..2006

René Leubert

Dissertation eingereicht am: 14.12.2006

1. Gutachter: PD Dr. B. Salmons
2. Gutachter: PD Dr. R. Brack-Werner
3. Sondergutachter: Prof. Dr. M. Stürzl

Mündliche Prüfung am: 12.07.2007

Für meine Eltern, Ulrike und Raino  
Zum Gedenken an Hanni und Michael

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	i
<b>Abkürzungen</b> .....	ii
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Die vier bekannten Formen des Kaposi-Sarkoms (KS).....	1
1.2 Andere HHV-8 assoziierte Erkrankungen.....	2
1.3 Das HHV-8-Genom.....	3
1.4 Taxonomie und Aufbau der Herpesviren.....	5
1.5 Lebenszyklus der Herpesviren.....	7
1.5.1 HHV-8-Latenz und latente HHV-8-Gene.....	8
1.5.1.1 Biologie der latenten Infektion und KS.....	9
1.5.2 Die lytische Replikation von HHV-8.....	9
1.5.2.1 Biologie der lytischen Infektion und KS.....	10
1.5.2.2. Der lytische Zyklus als therapeutischer Angriffspunkt.....	12
1.6 HHV-8-Interaktionen mit den Signalwegen der Wirtszelle.....	13
1.6.1 Signalwege der HHV-8-Interaktion.....	13
1.6.1.1. Die Transkriptionsaktivierung von AP-1.....	14
1.6.1.2. Die Transkriptionsaktivierung von NFκB.....	15
1.6.1.3. Die Transkriptionsaktivierung von p53.....	17
1.6.1.4. Posttranslationale Modifikationen von p53.....	19
1.6.1.5. p53 abhängige Apoptose.....	22
<b>2. Fragestellung und Zielsetzung</b> .....	25
<b>3. Material und Methoden</b> .....	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	26
3.1.2 Enzyme.....	27
3.1.3 Primäre Antikörper.....	27
3.1.4 Sekundäre Antikörper.....	28
3.1.4.1 gekoppelte Enzyme .....	28
3.1.4.2 gekoppelte Fluorochrome .....	28
3.1.5 Vektoren und Plasmide.....	28
3.1.5.1 HHV-8-Expressionsplasmide externer Herkunft.....	29
3.1.6 Oligonukleotide .....	29
3.1.6.1 Oligonukleotide zur Erzeugung der HHV-8-Expressionsdatenbank und Sequenzierung.....	30
3.1.7 Biologische Materialien.....	34

3.1.7.1 Bakterienstämme.....	34
3.1.7.2 Eukaryotische Zelllinien.....	35
3.2 Methoden.....	35
3.2.1 Allgemeine Puffer, Lösungen und Medien.....	35
3.2.2 Zellbiologische Methoden.....	36
3.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien.....	36
3.2.2.2 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen.....	37
3.2.2.3 Transiente Transfektion von adhärenen eukaryotischen Zellen.....	37
3.2.2.4 Assay für die Induktionssaktivierung von Transkriptionsfaktoren.....	38
3.2.2.5 Assay zur Messung der Depolarisierung des mitochondrialen Potenzials.....	38
3.2.2.6 Immunzytochemie.....	39
3.2.2.7 Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen.....	39
3.2.2.7.1 Zellkulturaufnahmen.....	39
3.2.2.7.2 Immunzytochemieaufnahmen.....	39
3.2.2.8 Proteinzellextrakt.....	40
3.2.2.9 Zellzahluntersuchung an eukaryotischen Zellen.....	40
3.2.2.9.1 Adhärenente Zellen.....	40
3.2.2.9.2 Suspensionszellen.....	40
3.2.3 DNA-Technologie.....	41
3.2.3.1 Plasmidisolierung.....	41
3.2.3.2 PCR.....	41
3.2.3.2.1 PCR für die Plasmidklonierung.....	41
3.2.3.2.2 PCR für den Nachweis von cDNA-Fragmenten.....	42
3.2.3.3 Reinigung von PCR-Fragmenten.....	43
3.2.3.4 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren.....	43
3.2.3.5 Enzymatische Spaltung von DNA-Molekülen.....	43
3.2.3.5.1 Präperativ.....	43
3.2.3.5.2 Analytisch.....	44
3.2.3.6 Dephosphorylierung von DNA-Molekülen.....	44
3.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	45
3.2.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	45
3.2.3.9 Synthetische Oligonukleotide.....	46
3.2.3.10 Ligation von DNA-Molekülen.....	46
3.2.3.11 Transformation von Bakterien mit Plasmiden.....	46
3.2.3.12 Langzeitkonservierung von Bakterienkulturen.....	47
3.2.3.13 Ortsgerichtete Mutagenese.....	47
3.2.3.14 Präparation von genomischer DNA.....	47
3.2.4 RNA-Technologie.....	48

3.2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA.....	48
3.2.4.2 cDNA-Synthese.....	48
3.2.5 Protein-Technologie.....	48
3.2.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	48
3.2.5.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	48
3.2.5.2.1 Diskontinuierliche SDS-Page.....	48
3.2.5.2.2 NuPage.....	49
3.2.5.3 Elektroblotten von Proteinen.....	49
3.2.5.4 Westernblot.....	50
3.2.5.5 (Polyacrylnitril)-Chromatografie-Affinitätskinetik-Elektrophorese.....	50
3.2.6 Array-Technologie.....	51
3.2.6.1 Herstellung des Glaspins.....	51
3.2.6.2 Erzeugen von Mikroarrays für die Arraytransfektion.....	51
3.2.6.2.1 Reinigung der Pins.....	51
3.2.6.2.2 Reinigung des Roboters.....	52
3.2.6.2.3 Drucken von Mikroarrays.....	52
3.2.6.2.4 Reverse-Transfektion.....	53
3.2.6.2.5 Lipidtransfektion.....	55
3.2.6.3 Quantitative Erfassung der Fluoreszenz von Objektträgern.....	56
3.2.7 Bioinformatik.....	57
3.2.7.1 Vergleichen von Proteinsequenzen.....	57
3.2.7.2 Quantitative Auswertung von Arrayaufnahmen.....	57
3.2.7.3 Ermittlung von linearen Signalmotiven.....	57
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
4.1 Die Arraytransfektion als Hochdurchsatzmethode zur Identifizierung transkriptions- aktivierender Gene des Humanen-Herpesvirus-8 (HHV-8).....	58
4.1.1 Klonierung der HHV-8-Expressionsbank.....	58
4.1.2 Expressionsanalyse der HHV-8-Expressionsbank.....	59
4.1.3 Beschreibung des modular anpassbaren Reportersystems.....	60
4.1.3.1 Optimierung des NFκB-Reporterplasmids.....	61
4.1.3.2 Das Reporterplasmid p(NF-RE)-mpTATA-GFP143 ist durch die Aktivierung von p65 und vFLIP induzierbar.....	63
4.1.4 Die Modularisierung des Reportersystems.....	64
4.1.4.1 Nachweis der Induktion von AP1 über das plasmidkodierte Indikatorsystem p(AP-1-RE)-mpTATA-GFP143.....	65
4.1.4.2 Nachweis der Induktion von p53 über das plasmidkodierte Indikatorsystem p(p53-RE)-mpTATA-GFP143.....	66

4.1.5 Die Umkehrtransfektion als Hochdurchsatz-Transfektionstechnik.....	68
4.1.5.1 Das Reportersystem in der 600-µm-Arraytransfektion .....	70
4.2 Durchsuchen einer HHV-8-Expressionsbank mit Hilfe der Arraytransfektion nach transkriptionsaktivierenden Genen.....	71
4.2.1 Verifizierung der Induktion durch K4.2, ORF 22 und ORF 21.....	73
4.2.2 Suche nach p53 induzierenden HHV-8-Genen mit Hilfe der konventionellen Lochplattentransfektion.....	75
4.3 Charakterisierung der HHV-8 <i>tk</i> -Wirkung.....	77
4.3.1 HHV-8 <i>tk</i> induziert p53 als Transkriptionsfaktor und die Entstehung von Zellinseln.....	77
4.3.2 HHV-8 <i>tk</i> verringert die Zellzahl.....	79
4.3.3 HHV-8 <i>tk</i> löst die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials aus.....	80
4.3.4 HHV-8 <i>tk</i> erhöht den endogenen p53-Spiegel und die p53-Serin-392-Phosphorylierung.....	82
4.3.5 HHV-8 <i>tk</i> erhöht den zellulären p53-Proteinlevel in HeLa-Zellen.....	84
4.3.6 HHV-8 <i>tk</i> verändert nicht den Phosphorylierungsstatus von pRB.....	86
4.3.7 Die Gammaherpesvirus HHV-8 <i>tk</i> unterscheidet sich zu den Alphaherpesviren- Thymidinkinasen in der N-terminalen Länge.....	88
4.3.8 Der 200 Aminosäuren lange HHV-8 <i>tk</i> -N-Terminus als Ursache für die p53- Transkriptionsaktivierung und die Veränderung des Zellwachstums.....	91
4.3.9 Der 200 AS HHV-8 <i>tk</i> -N-Terminus erhöht den zellulären p53-Proteinlevel.....	93
4.3.10 Die N-terminalen HHV-8 <i>tk</i> -Varianten lösen die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials aus.....	94
4.3.11 EBV <i>tk</i> induziert weder p53 als Transkriptionsfaktor, noch eine Veränderung der Zellzahl oder Morphologie des Zellrasens.....	96
4.3.12 HHV-8 <i>tk</i> und Varianten sind im Gegensatz zur EBV <i>tk</i> in der ganzen Zelle lokalisiert.....	98
4.3.13 Die HHV-8 <i>tk</i> -Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor wird durch LANA2 inhibiert.....	101
4.3.14 Die HHV-8 <i>tk</i> induzierte Erhöhung des endogenen p53-Levels wird nicht durch LANA2 inhibiert.	103
4.3.15 Die HHV-8 <i>tk</i> als lytisch induziertes Gen.....	106
4.3.15.1 Ganciclovir hat keinen Einfluss auf die Zellzahl lytisch induzierter und nicht induzierter BCBL-1-Zellen.....	107
4.3.15.2 Ganciclovir inhibiert in lytischen BCBL-1-Zellen die Transkription von ORF 26 wahrscheinlich stärker als die der HHV-8 <i>tk</i> .....	108
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>111</b>
5.1 HHV-8-Expressionsbank.....	112
5.2 Das modular anpassbare Reportersystem.....	112
5.3 Die Suche nach transkriptionsaktivierenden HHV-8-Genen mit Hilfe der Arraytransfektion.....	112
5.4 Die HHV-8-Thymidinkinase.....	114
5.4.1 Die Modulation von p53 durch die HHV-8 <i>tk</i> .....	114

5.4.1.1 p53-Transkriptionsaktivierung und Erhöhung des endogenen p53-Levels.....	114
5.4.1.2 Verstärkung posttranslationaler p53-Modifikationen durch die HHV-8 <i>tk</i> .....	115
5.4.2 HHV-8 <i>tk</i> induziert wahrscheinlich die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials.....	117
5.4.3 HHV-8 <i>tk</i> hat eine für Humane-Gammaherpesviren einmalige N-terminale Signaldomäne.....	119
5.4.4 SH2- / SH3- und WW-Interaktionsdomänen des HHV-8 <i>tk</i> -N-Terminus.....	120
5.4.5 Regulation der HHV-8 <i>tk</i> -Wirkung.....	122
5.4.6 Die subzelluläre Lokalisation der HHV-8 <i>tk</i> .....	123
5.4.7 Die HHV-8 <i>tk</i> im lytischen Zyklus von HHV-8.....	124
5.4.8 Das HHV-8 <i>tk</i> -Interaktionsmodell.....	126
5.4.8.1 Viral förderliche mitochondriale Interaktion .....	128
5.4.8.2 Viral förderliche Caspaseinteraktion.....	129
5.4.8.3 Viral förderliche immunologische Interaktion.....	131
5.4.9 KS und die HHV-8 <i>tk</i> .....	132
<b>6. Literatur</b> .....	135
6.1 Bücher.....	148
<b>7. Lebenslauf</b> .....	149
<b>8. Danksagung</b> .....	151
<b>9. Anhänge</b> .....	A

## Zusammenfassung

Das Humane-Herpesvirus-8 (HHV-8) gehört zu den Viren, die an der Entstehung von humanen Tumoren beteiligt sind. Die zugrunde liegenden onkogenen molekularen Mechanismen sind weitgehend unbekannt. Mit Hilfe der Arraytransfektion soll eine HHV-8-Expressionsbank auf die Induktion von mit HHV-8 assoziiert bekannten Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Dabei wurde ein modulares Reportersystem entwickelt, das die Transkriptionsaktivierung von AP-1, NF $\kappa$ B und p53 in der Arraytransfektion erfassen kann. Durch das Reportersystem konnte mit Hilfe der Arraytransfektion die HHV-8-Thymidinkinase als den Transkriptionsfaktor p53 induzierend ermittelt werden.

Die lytisch assoziierte HHV-8-Thymidinkinase konnte in zwei funktionell getrennte Domänen unterteilt werden. Einerseits in die bekannte C-terminale Domäne mit der biochemischen Kinasefunktion und andererseits in eine neu beschriebene N-terminale Domäne. Diese ca. 200 Aminosäuren lange N-terminale Proteindomäne war allein dafür verantwortlich, dass das endogene p53-Proteinlevel erhöht, p53 als Transkriptionsfaktor induziert und p53 an Serin-392 phosphoryliert wurde.

Durch das anti-apoptotische HHV-8-Protein "latency-associated nuclear antigen" (LANA) 2 ließ sich die Transkriptionsaktivierung von p53 durch die HHV-8-Thymidinkinase inhibieren, aber nicht vollständig aufheben. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die HHV-8-Thymidinkinase-Wirkung durch ein anderes HHV-8-Gen auf molekularer Ebene reguliert wird.

Darüber hinaus war die N-terminale Domäne für die Veränderung der Zellmorphologie zu Zellinseln, Verminderung der Zellzahl und wahrscheinlich für die Depolarisation des mitochondrialen Potentials verantwortlich. Zusätzlich konnte in lytisch induzierten BCBL-1-Zellen gezeigt werden, dass das Transkriptionsverhalten der HHV-8-Thymidinkinase durch das viral-replikationsinhibierende Ganciclovir, in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer, wahrscheinlich wenig oder gar nicht beeinflusst wird. Es ist daher zu vermuten, dass die HHV-8-Thymidinkinase das durch Ganciclovir nicht transkriptionsinhibierbare HHV-8-Gen ist, das durch die Umgehung viraler und zellulärer anti-apoptotischer molekularer Mechanismen den Zelltod in lytisch induzierten BCBL-1-Zellen auslösen kann.

Diese Einflüsse einer Thymidinkinase sind für die humanen Gammaherpesviren einmalig und konnte für das homologe Gen des Epstein-Barr-Virus nicht beobachtet werden. Durch wahrscheinlich unterschiedliche subzelluläre Lokalisierungen wurde die Divergenz in der Funktion zusätzlich aufgezeigt.

Die ermittelten Erkenntnisse dieser Arbeit können zur Entwicklung einer anti-viralen Therapie beitragen, die die lytische Vermehrung von HHV-8 begrenzt und somit die Entstehung von HHV-8 abhängigen Tumoren, wie das Kaposi-Sarkom, verhindern könnte. Zusätzlich gibt der Einfluss der HHV-8 $tk$  auf die Wirtszelle einen Einblick in die Interaktion des Virus mit dem Wirt und erlaubt wichtige Rückschlüsse auf das Zusammenspiel zellulärer und viraler molekularer Mechanismen für die Grundlagenforschung.

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ANT	Adenine Nucleotide Translocator
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AP	Activating Protein
APAF-1	Apoptotic Protease Activation Factor-1
APS	Ammonium-Per-Sulfat
AS	Aminosäure
ATF	Activating Transcription Factor
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia</i> mutated
ATP	Adenosin Triphosphat
ATR	<i>Ataxia-telangiectasia</i> Rad3-related
BAX	BCL-2 associated X Protein
BCL	B-Cell-Lymphoma-Protein
BCL-X	BCL-2-like 1 Protein
bp	Basenpaare
But	Butyrat
bZIP	Basic Leucine Zipper
c-Abl	Cellular-nonreceptor Tyrosine Kinase
CBP	CREB Binding Protein
cDNA	Complementary DNA
cm	Zentimeter
CTAR	Carboxy-terminal Activating Region
DAPI	4',6'-Diamino-2-Phenylindol
CD	Cluster of Differentiation
DHFR	Dihydrofolate Reduktase
DK	DMSO-Kontrolle
DMEM	Dulbecco's-Modifiziertes-Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleicacid
dNTP	Desoxyribonucleicacid-Triphosphat
ds	Doppelstrang
dT	Dexoxythymidin
E1B-55K	55-kDa-Genprodukt der frühen Region 1B Adenovirus Serotyp 5
E2F	Transcription Factors in Higher Eukaryotes
E6	Frühes HPV-Protein-6
<i>E. Coli</i>	Escherichia Coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGFP	Verbessertes grün fluoreszierendes Protein
Em	Emission
ERG	Eppendorfreagenzgefäß
EtOH	Ethanol

ex	Expression
FADD	Fas-associated protein with Death Domain
FKS	Fötale Kälberserum
FLIP	"FLICE" inhibitorisches Protein
FGARAT	Formylglycinamide Ribotide Amidotransferase
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase
GAPS	Gamma-Amino-Silan-Slides
gB	HHV-8-Glycoprotein-"B"
GCV	Ganciclovir
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gH	HHV-8-Glykoprotein-"H"
gL	HHV-8-Glykoprotein-"L"
gM	HHV-8-Glykoprotein-"M"
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
h	Stunde
HEK	Human embryonic kidney cells
HHV	Humanes-Herpesvirus
HIV	Humanes-Immundefizienzvirus
HPV	Human-Papilloma-Virus
HSV	Humanes-Simplexvirus
I $\kappa$ B	Inhibitory- $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ appaB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
IZC	Immunzytochemie
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3' Tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodide/Chloride
JDP	Jun Dimerization Protein
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kb	Kilobase
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilo Dalton
KIE	KSHV immediate-early messengers
KS	Kaposi-Sarkom
KSHV	Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus
l	Liter
LAMP	Latency-associated membrane protein
LANA	Latent assoziiertes nukläres Antigen
LAT	Latency-associated Transcript
LB	Luria Bertani
LMP	Latent membran protein
mA	Milliamper

MCD	Multizentrische-Castleman-Erkrankung
MDM-2	Murine Double Minute gen 2
mg	Milligramm
min	Minute
MIP	Macrophage-inflammatory Proteine
MIR	Modulator of Immune Recognition
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mp	Minimalpromoter
mRNA	Messenger RNA
MTA	mRNA Transport And Accumulation Protein
MPTP	Mitochondrion Permeability Transition Pore
ND	N-terminale Domäne
NFκB	Nuclear Factor-κB
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ORF	Open Reading Frame
P3	3' Primer
P5	5' Primer
p53ex	p53-Expressionvektor
PAN	Polyadenylated Nuclear
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCAF	p300/CBP-associated factor
PCR	Poly Chain Reaction
PEL	Peripheres-Effusions-Lymphoma
PFA	Paraformaldehyd
PFA <sub>lyt</sub>	Phosphonoformic Acid
PKR	"Double-Stranded RNA Activated" Protein Kinase
pmol	Picomol
PTPC	Permeability Transition Pore Complex
PUMA	p53-upregulated Modulator of Apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAP	Replication-associated Protein
RB	Retinoblastoma
RE	Responseelement
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RLE	Relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per Minute
RRV	Rhesus-Rhadino-Virus

RTA	Replication and Transcription Activator
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
SaOS	Human Osteogenic Sarcoma
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH	SRC-Homolog
ST	Staurosporin
SV40	Simian Virus 40
SV40-TLA	SV40-T-Large-Antigen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAF	TATA box binding protein associated factor
TE	Trypsin/EDTA Lösung
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TRADD	TNF Receptor-associated Death Domain
TRAF	TNF Receptor-associated Factor
TRE	TPA-Responseelement
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TK	Thymidinkinase
TPA	Tetradecanoyl Phorbol Acetate
TRI	Triplex Component
TS	Thymidylate Synthetase
U	Amper
UV	Ultraviolett
V	Volt
vBCL	Virales "B-Cell"-Lymphoma-Protein
vCYC	Virales "Cyclin" vom Typ-D
vFLIP	Virales "FLICE" inhibitorisches Protein
vGPCR	Viraler G-Protein-gekoppelter Rezeptor
vIL	Virales Interleukin
vIRF	Virales Interferon
vMIP	Virales Makrophagen inflammatorisches Protein
vOX2	Viral OX-2 Membrane Glycoprotein Homolog Precursor
VZV	Varizella-Zoster-Virus
WB	Westernblot
WW	Tryptophans (W) (Spaced 20-22 Amino Acid)-Domain

## 1. Einleitung

Das nach dem Wiener Dermatologen Moritz Kaposi benannte Kaposi-Sarkom (KS) ist eine vermutlich von Endothelzellen ausgehende Krebserkrankung. Das ursächlich verantwortliche Virus wurde im Jahre 1994 als Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus (KSHV) oder taxonomisch benannt als Humanes-Herpesvirus-8 (HHV-8) identifiziert (Chang *et al.* 1994). Die HHV-8-Infektion ist Voraussetzung für diese maligne Erkrankung, als alleinige Ursache jedoch nicht ausreichend und braucht zum Auslösen zusätzliche Faktoren.

### 1.1 Die vier bekannten Formen des Kaposi-Sarkoms

M. Kaposi beschrieb 1872 zum ersten Mal das klassische Kaposi-Sarkom mit seinen typisch bläulich-lila gefärbten Tumorlessuren (Abb. 1) (Kaposi M 1872). Neben dem klassischen (sporadischen) KS sind das "Acquired Immune Deficiency Syndrome" (AIDS)-assoziierte / Humanen-Immunschwäche-Virus (HIV)-assoziierte (epidemische) KS, das afrikanische (endemische) KS und das iatrogene KS beschrieben (Kaposi M 1872, Oettle AG 1962, Tappero *et al.* 1993).



Abb. 1, Bläulich-lila gefärbte KS-Tumorlessur  
(<http://medinfo.ufl.edu/>)

Das klassische KS ist eine Erkrankung, die vor allem bei älteren Männern auftritt und langsam fortschreitet. Die Bedingungen der Induktion des klassischen KS sind bisher nicht bekannt. Das epidemische KS ist variabel im Verlauf, von langsam bis sehr aggressiv und steht im unmittelbaren Zusammenhang mit HIV-1. Die HIV-1-Infektion bedingt den

Immunstatus des Wirts und nimmt vermutlich darüber Einfluss auf den Krankheitsverlauf von KS. HIV-1 scheint der auslösende Faktor für das epidemische KS zu sein.

Für das endemische KS sind neben langsamen, dem klassischen KS vergleichbaren Verläufen, auch aggressive Formen beschrieben. Die auslösenden Faktoren sind auch hier nicht bekannt. Das iatrogene KS kann nach Transplantationen auftreten, bei denen der Empfänger immunsupprimiert ist. Der Auslöser ist hierbei die Immunsuppression, da sich bei einer Immunrekonstitution das iatrogene KS zurückbildet (Tappero *et al.* 1993). Das Auftreten von KS scheint damit unter anderem von einem geschwächten Immunstatus abhängig zu sein (Luppi *et al.* 2000, Pastore *et al.* 2000). Alle vier KS-Formen sind histologisch nicht von einander zu unterscheiden und deuten dadurch auf einen vergleichbaren Ablauf der onkogenen Transformation der Wirtszelle hin.

Charakteristisch für KS-Läsionen sind KS-Spindelzellen, die mit anderen Zelltypen vergesellschaftet sind und durch eine inflammatorische Infiltration von mononukleären Immunzellen begleitet wird (Ablashi *et al.* 2002). Die Entwicklungsstadien des KS verlaufen vom Patch-, über das Plaque- zum Nodularstadium, bei dem die Spindelzellen die Hauptpopulation der beteiligten Zellen bilden können (Cockerell, C. J. 1991, Fribourg *et al.* 1998). Der transformierte Zelltyp des KS wird noch diskutiert, wobei es sich vermutlich um lymphatische Endothelzellen handelt (Dupin *et al.* 1999).

## **1.2 Andere HHV-8 assoziierte Erkrankungen**

Neben dem KS werden weitere Tumorerkrankungen mit HHV-8 assoziiert. Zu ihnen zählen das Primäres-Erguss-Lymphom (PEL) und die Multizentrische Castleman Erkrankung (MCD) (Cesarman *et al.* 1995, Soulier *et al.* 1995).

**PEL** ist eine seltene Non-Hodgkin-Lymphomerkkrankung in Brustkorb und Bauchhöhle, die vor allem HIV-positive Patienten betrifft und keinen festen Tumor bildet. PEL ist eine fast ausschließlich B-Zellen betreffende proliferative Erkrankung, denn es wurde der B-Zell-Vorläufermarker "Cluster of Differentiation" (CD)-138 nachgewiesen (Said *et al.* 1999, Gaidano *et al.* 1997). In PEL-Zelllinien und primären PEL-Tumorzellen lassen sich verschiedene Ig-VH-Gene-Sequenzen nachweisen. Die Entwicklung von PEL scheint damit nicht auf ein Stadium der B-Zell-Differenzierung begrenzt zu sein. (Matolcsy *et al.* 1998).

**MCD** ist eine lymphoproliferative Erkrankung der B-Zellen, die vermutlich durch eine Interleukin-(IL)-6-Fehlregulation ausgelöst wird (Knowles DM (ed.), Neoplastic hematopathology. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.). Zwei histologisch unterschiedliche Varianten von MCD sind beschrieben. Zum einen die Plasmazellvariante mit solitär lokalisierten Herden und zum anderen die hyaline-vaskuläre Variante mit großen plasmatischen Zellen (Fields 4<sup>th</sup> Edition, Du *et al.* 2001). Bei HIV-1 positiven Patienten tritt MCD oft zusammen mit KS auf (Schulz TF 2001).

### **1.3 Das HHV-8-Genom**

HHV-8 ist ein Doppelstrang-DNA Virus mit einem ca. 165 kb langen linearen Genom im Kapsid und ca. 145 kb langen Episom in der Wirtszelle. Das lineare Genom hat einen zu anderen Herpesviren vergleichbaren Aufbau mit einem zentralem L-Segment und geringem GC-Gehalt, in dem die kodierenden "Open Reading Frames" (ORFs) liegen. Das Zentralsegment wird durch "Terminal-Repeats" mit einem hohen GC-Gehalt flankiert, für das keine ORFs bekannt sind (Bornkamm *et al.* 1976).

Die annotierten Gene wurden mit dem damals als nächst verwandt bekannten Virus, Herpesvirus-Saimiri, verglichen und homologe Gene in der gleichen Weise nummeriert (Abb. 2). Daraus resultiert die Nummerierung der ORFs 4 bis 75. Alle anderen einmaligen HHV-8-Gene wurden mit einem K (für KSHV) vor der Nummer des jeweiligen ORFs bezeichnet (Chang *et al.* 1994, Moore *et al.* 1996). Es können drei Regionen (Region I bis III) zusammengefasst werden, die innerhalb der Herpesviren konservierte Gene enthalten (Abb. 2). Diese kodieren für Enzyme zum Eingriff in den Nukleinsäurehaushalt (Thymidinkinase, Thymidylatsynthetase, dUTPase, Ribonukleotidreduktase), der DNA-Synthese (DNA-Polymerase, Helikase, Primase) und zur Prozessierung von Proteinen (Proteinkinasen). Darüber hinaus liegen in den konservierten Regionen Gene, die für die Kapsid-, Tegument- und Glykoproteine des Virions kodieren.

Die Anzahl konservierter Gene können je nach Herpesvirus oder Unterfamilie variieren. Zum Beispiel kodieren die Betaherpesviren für keine eigene Thymidinkinase.

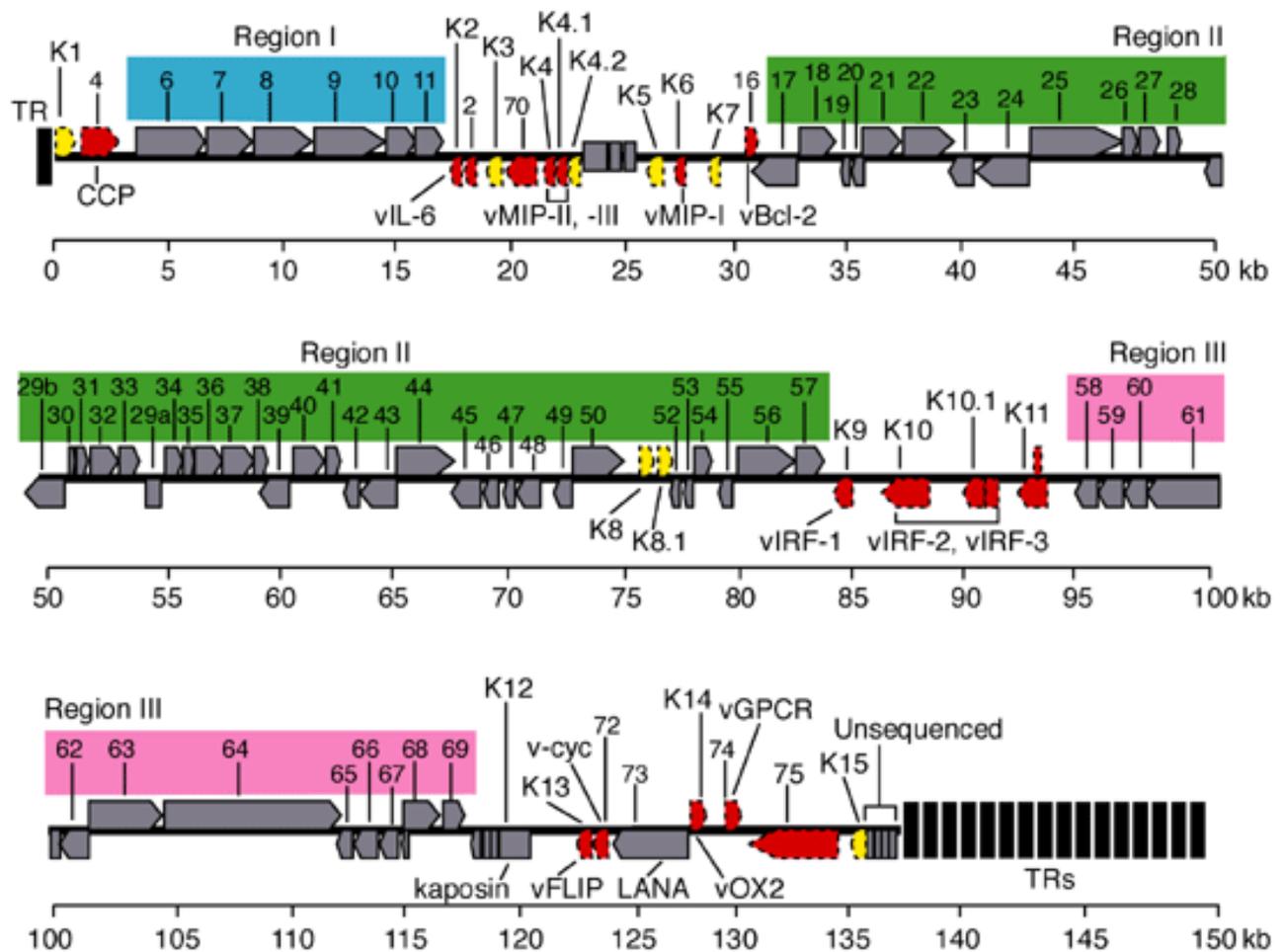


Abb. 2, Schematische Darstellung der linearen Abfolge des HHV-8-Genoms (aus Foreman KE 2001)

Das lineare HHV-8-Genom wird von terminalen Wiederholungen/ "Terminal Repeats" (TRs, schwarze Quadrate) umgeben. Es sind die drei homologen Regionen I bis III dargestellt (blau, grün und rosa) in denen die zu anderen Herpesviren homologen Gene liegen. Einige der dazwischen liegenden Gene sind einmalig für HHV-8 und beinhalten die zu zellulären Genen homologen HHV-8-Gene (rot mit schwarzem gestricheltem Rand) und jene ohne bekannte Homologie (gelb mit schwarzem gestricheltem Rand).

Die biochemische Funktion der fehlenden TK wird vermutlich durch die Proteinkinase der Betaherpesviren übernommen (Michel D und Mertens T 2004). Die zwischen den konservierten Regionen liegenden Gene kodieren hauptsächlich für HHV-8 einmalige Gene. Dazu gehören auch zu zellulären Genen Homologe, wie zum Beispiel das virale B-Cell Lymphoma-Protein (vBCL), virales IL (vIL)-6, viraler G-Protein-gekoppelter Rezeptor (vGPCR) und virales Cyclin Typ-D (vCYC). Alle für die Etablierung der Latenz nötigen Proteine kodieren im Bereich zwischen den konservierten Regionen.

Viele der für HHV-8 als einmalig beschriebenen Gene wie K1, K2, virale Makrophagen inflammatorische Proteine (vMIPs), K4, K4.1, K5, K9, K12, ORF 71, ORF 73, ORF 74 oder K15 haben onkogenes oder transformierendes Potential und tragen vermutlich zur Veränderung der Wirts- zu einer Tumorzelle bei (Neipel F und Fleckenstein B 1999).

Für die insgesamt ungefähr 90 bekannten HHV-8-Gene ist ca. einem Drittel noch keine Funktionen zugeordnet und somit deren Bedeutung für die Tumorentstehung oder Replikation unbekannt (<http://biochem.dental.upenn.edu/~soking/KSHV/index.html>).

#### **1.4 Taxonomie und Aufbau der Herpesviren**

Die **Taxonomie** der Viren richtet sich zuerst nach der Art der Nukleinsäuren und dem generellen Aufbau des Genoms. Die Herpesviren gehören zu den Doppelstrang-DNA-Viren ohne segmentiertes Genom.

Die Taxonomie innerhalb der Herpesviren unterteilt sich in die *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* und *Gammapherpesvirinae* (Fields 4<sup>th</sup> Edition). HHV-8 gehört zur Familie der Humanen-Herpesviren, Unterfamilie Gamma-Herpesviren in die Gattung der Rhadinoviren (Abb. 3).

Der **Aufbau** aller Herpesviren unterteilt sich in Kern, Kapsid, Tegument und der Hüllmembran mit Glykoproteinen (Abb. 4). Der Kern besteht aus dem linearen Virusgenom und einem länglichen Proteinkern. Dabei scheint die DNA um den Proteinkern aufgespult zu sein. Beide Komponenten interagieren gegenseitig mit unbekannter Wechselwirkung.

Der Kern wird von einem ikosaedrischen Kapsid mit ca. 100 nm Durchmesser umschlossen, das bei HHV-8 aus Strukturproteinen, wie dem großen Kapsidprotein (ORF 64) und dem kleinen Kapsidprotein (ORF 26) besteht. Das Kapsid ist in das Tegument eingebettet, das aus einer unstrukturierten Proteinmatrix besteht. Diese enthält bei HHV-8 unter anderem Proteine von ORF 33, 45, 21, 63, 64 oder 75 (Zhu *et al.* 2005). Die Hüllmembran mit Glykoproteinen umschließt das ganze Virion. Diese scheint von partiellen Flecken einer abgeänderten zellulären Membran abzustammen und enthält je nach Herpesvirus verschiedene Glykoproteine (Falke *et al.* 1959).

		Systematischer Name	Alternativer Name
Humane-Herpesviren	α-Herpesviren	Simplexviren	
		Humanes-Herpesvirus-1	Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1)
		Humanes-Herpesvirus-2	Herpes-Simplex-Virus-2 (HSV-2)
		Varicellaviren	
		Humanes-Herpesvirus-3	Varicella-Zoster-Virus (VZV)
	β-Herpesviren	Zytomegalieviren	
		Humanes-Herpesvirus-5	Zytomegalievirus (CMV)
		Roseolovirus	
		Humanes-Herpesvirus-6a/b	-
		Humanes-Herpesvirus-7	-
	γ-Herpesviren	Lymphokryptoviren	
		Humanes-Herpesvirus-4	Ebstein-Barr-Virus (EBV)
Rhadinoviren			
	<b>Humanes-Herpesvirus-8</b>	<b>Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus (KSHV)</b>	

Abb. 3, Taxonomieübersicht der humanen Herpesviren

Es sind die Herpesviren nach Familie, Unterfamilie, Gattung und Art angeordnet. Neben dem systematischen ist auch ein möglicher alternativer Name angegeben. **Das Humane-Herpesvirus-8 ist hervorgehoben.**

Die Größe des Virions variiert von 120 bis 300 nm. Dies wird vermutlich bedingt durch die verschiedene Dicke des Teguments und durch die Integrität der Hüllmembran, da sich bei Beschädigung dieser, das Tegument verändern kann (Fraenkel-Conrat H, Wagner RR, (eds) Comprehensive Virology, Vol 3. 1974).

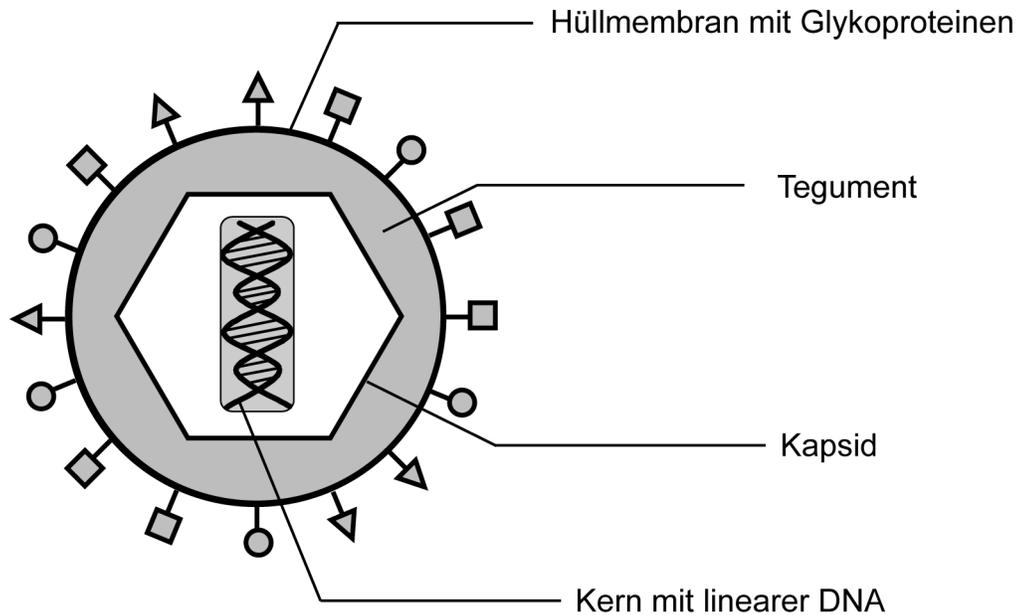


Abb. 4, Schematische Darstellung des Virionaufbaus der Herpesviren

(Von innen nach außen) Der Proteinkern wird von der linearen Viren-DNA umspult und bildet den Kern. Dieser ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, der in eine Proteinmatrix, dem Tegument, eingebettet ist. Die Hüllmembran mit Glykoproteinen umschließt das ganze ca. 120-300 nm große Virion.

### 1.5 Lebenszyklus der Herpesviren

Herpesviren können, neben der lytischen Replikation, in einem latenten, verborgenen Zustand in der Wirtszelle verbleiben. Das Virus kann sich so vor dem Immunsystem des Wirtsorganismus für eine gewisse Zeit verstecken und bildet durch den latenten, nicht produktiven Befall von Zellen ein Reservoir. Bei den Herpesviren gibt es kein Generalkonzept um die Latenz zu etablieren und ist je nach Herpesvirus eigenständig gelöst. Zum Beispiel exprimiert HHV-8 in der Latenz einige wenige Proteine um diesen Zustand aufrecht zu erhalten, im Gegensatz zu anderen, wie dem Herpes-Simplex-Virus (HSV)-1, das scheinbar keine viralen Proteine dafür benötigt (Staskus *et al.* 1997, Zhong *et al.* 1996, Fields 4<sup>th</sup> Edition). Aus der Latenz kann das Virus in den lytischen Zyklus übergehen und Virionen produzieren. Die Aktivierung des lytischen Zyklus aus der Latenz heraus wurde bei HHV-8 nachgewiesen. (Miller *et al.* 1997). Bei der Freisetzung von Viruspartikeln wird die Wirtszelle lysiert (Fields 4<sup>th</sup> Edition).

### 1.5.1 HHV-8-Latenz und latente HHV-8-Gene

Auch für HHV-8 konnte die Etablierung der Latenz beobachtet werden (Staskus et al. 1997, Miller et al. 1997), die ein Merkmal für alle Herpesviren ist (Fields 4th Edition). Die HHV-8-Latenz geht mit der Expression eines bestimmten Basisgensatzes einher. Dieser Basisgensatz kann in Abhängigkeit von der Wirtszelle zusätzlich erweitert sein und reflektiert, auch während der Latenz, die Anpassungen des Virus an seinen Wirt. Zum Beispiel konnte die Expression von LANA2 während der Latenz von HHV-8 nur in B-Zellen nachgewiesen werden (Rivas et al. 2001).

Latentes HHV-8-Gen	Funktionen
ORF 73 / LANA1	<ul style="list-style-type: none"> <li>– wirkt transkriptionsaktivierend oder reprimierend (An et al. 2002, Groves et al. 2001, Hyun et al. 2001, Jeong et al. 2001, Knight et al. 2001, Lim et al. 2001, Renne et al. 2001) und hat eine autoaktivierende Wirkung auf den Promotor der "Latency Associated Transcript" (LAT)-3-Genkassette in der Latenz (Jeong et al. 2001, Renne et al. 2001).</li> <li>– das Latenz assoziierte-nukläre Antigen LANA-1 bindet direkt an p53, inhibiert die p53-Transkriptionsaktivierung und kann die Apoptose blockieren (Friborg et al. 1999).</li> <li>– interagiert mit dem Retinoblastomprotein (pRB) und sorgt für das Anheften des HHV-8-Episoms an das zelluläre Chromatin (Radkov et al. 2000, Ballestas et al. 1999).</li> </ul>
K13 / vFLIP	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Homologe zum zellulären FLICE inhibitorischen Protein (FLIP)</li> <li>– inhibiert die "Fas Associated protein with Death Domain" (FADD)-vermittelte Apoptose, blockiert die Proteaseaktivität der Caspasen-3, -8 und -9, und interagiert direkt mit der Procaspase-8 um deren Aktivierung zu verhindern. (Djerbi et al. 1999, Belanger et al. 2001, Thome et al. 1997).</li> <li>– vFLIP aktiviert durch seine direkte Interaktion mit dem "Inhibitory"-κB (IκB)-Kinase-Komplex im Zytosol den "Nuclear Factor"-κB (NFκB)-Transkriptionsfaktor (Liu et al. 2002).</li> </ul>
K10.5 / LANA2	<ul style="list-style-type: none"> <li>– blockiert Apoptose und kann die p53 vermittelte Transaktivierung inhibieren (Rivas et al. 2001).</li> </ul>

Tab. 1, Zusammenfassung ausgewählter latenter HHV-8-Gene mit deren bekannten Funktionen

Es konnten insgesamt sieben verschiedene HHV-8-Transkripte/-Gene während der Latenz in Endothel- oder B-Zellen als exprimiert nachgewiesen werden (Staskus *et al.* 1997, Zhong *et al.* 1996). Als Beispiel sind einige latente Gene in Tabelle 1 zusammengefasst.

#### **1.5.1.1 Biologie der latenten Infektion und KS**

Der genaue molekulare Mechanismus, der zur Etablierung der Latenz von HHV-8 führt, ist nicht genau bekannt, bedingt aber das Zusammenspiel der latenten Gene untereinander.

Viele der latenten Gene wie K15, LANA1, vCYC, vFLIP und Kaposin-A wurden, neben anderen, mit KS assoziiert beobachtet. Ob KS aus einer latenten Zelle heraus entsteht oder durch einen anderen Mechanismus, bei dem latente Gene mit eingebunden werden, ist bislang unbekannt.

Für die Herkunft von KS aus einer latenten Zelle spricht, dass das Virusgenom extrachromosomal vorkommt, nur wenige Proteine exprimiert werden, keine Virionen produziert werden und sich dieser Status in den lytischen Zyklus über einen unbekanntem molekularen Mechanismus überführen lässt (Neipel F und Fleckenstein B 1999).

Durch die Induktion des lytischen Zyklus wird die Wirtszelle vom latenten in den produktiven Status überführt, sodass eine spezifische Kaskade zur Virionenproduktion beginnt.

#### **1.5.2 Die lytische Replikation von HHV-8**

Durch die Latenz kann sich das Virus für einen gewissen Zeitraum verstecken, maximal so lange wie die Wirtszelle beziehungsweise der Wirt lebt. Für den Fortbestand von HHV-8 ist ein Replikationsschritt nötig, um später neue Wirtszellen infizieren zu können. Die genauen authentischen Bedingungen unter denen HHV-8 von der Latenz zum lytischen Zyklus übergeht sind nicht bekannt. *In vitro* lassen sich latent HHV-8 infizierte Zelllinien durch chemische Reagenzien wie "Tetradecanoyl Phorbol Acetate" (TPA) oder Butyrat in den lytischen Zyklus überführen (Renne *et al.* 1996, Klass *et al.* 2005).

HHV-8-Gene im lytischen Zyklus werden in „immediate early“ oder primär lytisch, „early“ oder sekundär lytisch und „late“ oder tertiär lytisch eingeteilt. Im Gegensatz zur Latenz ist der exprimierte Gensatz im lytischen Zyklus sehr umfangreich. Es wird deshalb exemplarisch nur ein Beispiel für ein unmittelbar frühes Gen (ORF 50) und je ein biochemisch (ORF 21) oder strukturell wichtiges Gen (ORF 26) der späten lytischen Phase in Tabelle 2 vorgestellt.

Lytisches HHV-8-Gen	Funktionen
ORF 50	<ul style="list-style-type: none"> <li>– ist der Transaktivator für die lytische Replikation von HHV-8 und kann bei alleiniger Aktivierung das Virus aus der Latenz in den lytischen Zyklus überführen (Gradoville <i>et al.</i> 2000, Lukac <i>et al.</i> 1999, Lukac <i>et al.</i> 1998, Sun <i>et al.</i> 1998)</li> <li>– reguliert die Expression einiger viraler Gene, wie zum Beispiel von ORF 21 und ist auto-aktivierend (Zhang <i>et al.</i> 1998, Bowser <i>et al.</i> 2002, Chen <i>et al.</i> 2000, Curreli <i>et al.</i> 2002, Deng <i>et al.</i> 2002a, Ueda <i>et al.</i> 2002, Wang <i>et al.</i> 2001, Deng <i>et al.</i> 2000)</li> <li>– inhibiert durch direkte Proteininteraktion die p53 vermittelte Apoptose (Gwack <i>et al.</i> 2001)</li> </ul>
ORF 21	<ul style="list-style-type: none"> <li>– ist die virale Thymidinkinasen (TKs) mit eingeschränktem Substratbereich, im Gegensatz zu den TKs der Alphaherpesviren, die sämtliche Nukleoside phosphorylieren können (Gentry GA 1992, Gustafson <i>et al.</i> 1998, Gustafson <i>et al.</i> 2000, Lock <i>et al.</i> 2002, Tung PR und Summers WC 1994)</li> <li>– ein ca. 250 Aminosäuren langer N-terminale Bereich ist für den Verlust der Adhäsion der Zelle und Veränderung der Zellmorphologie verantwortlich (Gill <i>et al.</i> 2005)</li> <li>– wird durch "Replication and Transcription Activator" (RTA) induziert und spät im lytischen Zyklus exprimiert (Zhang <i>et al.</i> 1998, Nakamura <i>et al.</i> 2003, Krishnan <i>et al.</i> 2004, Lu <i>et al.</i> 2004)</li> </ul>
ORF 26	<ul style="list-style-type: none"> <li>– gehört als kleines Kapsidprotein zu den Strukturproteinen des Virions</li> <li>– hat eine Sequenzhomologie von 39% zum Epstein-Barr-Virus (EBV) BDLF1 Kapsidprotein und wird spät im lytischen Zyklus exprimiert (Chang <i>et al.</i> 1994, Nakamura <i>et al.</i> 2003, Krishnan <i>et al.</i> 2004, Lu <i>et al.</i> 2004).</li> </ul>

Tab. 2, Zusammenfassung ausgewählter lytischer HHV-8-Gene mit deren bekannten Funktionen

### 1.5.2.1 Biologie der lytischen Infektion und KS

In KS-Läsionen tritt selten eine spontane Induktion des lytischen Zyklus auf. Der in KS-Zellen ausgelöste lytische Zyklus wird, wie in normalen Wirtszellen, durch den HHV-8-Transaktivator RTA aktiviert (Katano *et al.* 2001). Viele der durch RTA induzierten lytischen Gene sind als pathogen eingestuft, wie zum Beispiel vIL-6, K9, vGPCR oder K1 (Lee *et al.* 1998, Yang *et al.* 2000, Montaner *et al.* 2003, Gao *et al.* 1997, Osborne *et al.* 1999, Muralidhar *et al.* 1998).

Durch die lytischen Gene wird in das Wachstum und Verhalten der Wirtszellen eingegriffen, um diese für die virale Replikation anzupassen. Weiterhin können autokrine oder parakrine Faktoren, wie zum Beispiel vIL-6, die Erstellung eines Mikromilieus in der Nähe lytischer Zellen begünstigen und so vermutlich die Entstehung von KS fördern.

Endothelzellen, die mit HHV-8 infiziert wurden, sind transformiert, proliferieren über eine längere Passagenzahl als nicht infizierte Endothelzellen, haben eine Telomeraseaktivität und wachsen unabhängig vom Zell-Zell-Kontakt. Allerdings konnte nur bei 1-6% der Endothelzellen eine HHV-8-Infektion nachgewiesen werden. Dies schlägt einen parakrinen Effekt, ausgehend von den infizierten Wirtszellen auf die Nachbarzellen vor, und verdeutlicht das Potential eines Mikromilieus, das durch HHV-8 generiert werden kann (Flore *et al.* 1998). Ebenso kann eine kontinuierliche HHV-8-Neuinfektion eine wichtige Rolle bei der Etablierung von KS-Läsionen spielen. Endothelzellen können durch HHV-8 aus Überständen einer lytisch induzierten PEL Zelllinie (BCBL-1) infiziert werden. Die HHV-8-Infektion ließ sich durch die Expression des latenten Gens LANA1 in den Endothelzellen detektieren. Weiterhin zeigten HHV-8 infizierte Endothelzellen eine Spindelzellmorphologie, wie sie in KS-Läsionen beobachtet wird. Je länger die HHV-8 infizierten Endothelzellen passagiert wurden, desto weniger LANA1 ließ sich nachweisen, was auf einen Rückgang der HHV-8-Infektionen hinwies. Der Rückgang der HHV-8-Infektionen ging mit dem Verschwinden der Spindelzellmorphologie einher und zeigt auf, dass die HHV-8-Neuinfektionen wichtig für die Etablierung und den Erhalt der Latenz und somit für die Ausbildung des KS sein kann (Grundhoff H und Ganem D 2004).

Die beschriebenen Theorien zeigen, dass die spontanen lytischen Ereignisse in KS-Läsionen notwendig sein können, damit HHV-8 neue Wirtszellen rekrutieren kann, um den Tumorstatus aufrecht zu erhalten (Wang CY und Sugden B 2004).

Darüber hinaus sind bei HHV-8 langsame oder unvollständige lytische Replikationen beobachtet worden. Dadurch könnte sich eine verlängerte Phase der Expression von lytisch-pathogenen Proteinen ergeben und dies zu einer verlängerten Aufrechterhaltung eines Mikromilieus in der KS-Läsion beitragen (Ciufo *et al.* 2001).

### **1.5.2.2 Der lytische Zyklus als therapeutischer Angriffspunkt**

Der lytische Zyklus ist nicht nur für die Produktion von neuen Virionen von Bedeutung, sondern kann auch direkt zum Erhalt von KS-Läsionen beitragen. Aus diesen Gründen ist der lytische Zyklus als Ziel für eine therapeutische Anwendung zur Verringerung der Viruslast und zur Inhibierung des möglichen onkogenen Potentials von HHV-8 interessant.

BCBL-1-Zellen sind eine von einem PEL-Patienten abstammende B-Zelllinie mit einer latenten HHV-8-Infektion (Renne *et al.* 1996). Der lytische Zyklus ist in BCBL-1-Zellen durch chemische Reagenzien wie TPA oder Butyrat induzierbar und kann durch die Expression von lytisch assoziierten HHV-8-Genen wie dem Kapsidprotein ORF 26 nachgewiesen werden. Weiterhin werden durch induzierte BCBL-1-Zellen authentische Virionen produziert, die andere Zellen infizieren können. Als Folge der Induktion ist während des lytischen Zyklus für BCBL-1-Wirtszellen eine Veränderung der Zellmorphologie, teilweise ähnlich zu apoptotischen Zellen, zu beobachten. Diese morphologischen Veränderungen werden als Kondensierung und Auflösung des Chromatins und als verändertes Cytoplasma mit kondensierten Mitochondrien beschrieben (Tinari *et al.* 2000). Zusätzlich lassen sich in lytischen BCBL-1-Zellen Zelltod begleitende Prozesse, wie die DNA-Fragmentierung, nachweisen (Klass *et al.* 2005).

Für eine mögliche therapeutische Anwendung ist eine hohe Wirksamkeit mit möglichst wenig Nebenwirkungen wichtig, um Kollateralschäden an gesunden Zellen zu minimieren. Der lytische Zyklus bietet die Möglichkeit einer selektiven Angriffsfläche, da die virale Replikation auch von viralen Proteinen abhängt, die nur in lytischen Zellen exprimiert werden und so die Nutzung dieser Mechanismen somit nur lytische Zellen treffen sollte. Zum Beispiel lässt sich durch Ganciclovir die virale DNA-Polymerase inhibieren (Kedes DH und Ganem D 1997). Die virale DNA-Polymerase ist essentiell für die Reproduktion des Virusgenoms und die Expression von spät assoziierten Genen im lytischen Zyklus (Gradoville *et al.* 2000, Wu *et al.* 2001, AuCoin *et al.* 2004). Durch Ganciclovir wird die virale Replikation inhibiert, was durch eine verminderte Produktion infektiöser Virionen nachweisbar ist. Die Behandlung von lytischen Zellen mit Ganciclovir änderte dabei aber nichts am Auftreten des Zelltodes der Wirtszelle, dessen Häufigkeit vergleichbar zu unbehandelten Zellen blieb. Dies wies auf einen durch die lytische Induktion abhängigen, aber von Ganciclovir nicht inhibierten Prozess hin, der die Wirtszelle während des lytischen Zyklus schädigt (Klass *et al.* 2005). Ein derartiger Zelltod assoziierter Prozess ließe sich ebenfalls als Angriffspunkt für eine Therapie nutzen,

um in die Virusreplikation regulierend einzugreifen. Neben der lytisch induzierten Apoptose sind morphologische Veränderungen beschrieben, die die Frage aufwerfen, ob ein HHV-8-Gen direkt an dem Auslösen des lytischen Zelltodes beteiligt ist (Klass *et al.* 2005).

## **1.6 HHV-8-Interaktionen mit den Signalwegen der Wirtszelle**

HHV-8 kann über verschiedene Proteine mit den Signalwegen der Wirtszelle wechselwirken. Einige der Signalwege aktivieren Transkriptionsfaktoren wie "Activating Protein" (AP)-1 oder NFκB und können an der Apoptoseregulation und Transformation der Wirtszelle teilnehmen weshalb sie für weitere Analysen interessant sind. Für HHV-8 K15 ist wie für das homologe EBV "Latent Membran Protein" (LMP)-1 eine Aktivierung von AP-1 beschrieben (Brinkmann *et al.* 2005, Kieser *et al.* 1997). Weiterhin induziert HHV-8-K15 und -K13 den NFκB-Transkriptionsfaktor. Wegen diesen bekannten HHV-8-Interaktionen wurde die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB durch andere HHV-8-Gene untersucht.

Im lytischen Zyklus ließen sich zur Apoptose ähnliche morphologische Veränderungen nachweisen. Dies lässt eine Interaktion von HHV-8 mit Zelltod assoziierten Signalwegen, die zum Beispiel p53 aktivieren können, vermuten. Zusätzlich kodiert HHV-8 für relativ viele Proteine, die mit p53 interagieren können. Für RTA, LANA1 oder LANA2 ist eine Inhibierung der p53-Transkriptionsaktivierung beschrieben, sowie für LANA1 und RTA eine direkte p53-Interaktion und Inhibierung der Apoptose (Gwack *et al.* 2001, Rivas *et al.* 2001, Friborg *et al.* 1999). Die relativ hohe Anzahl an p53 interagierenden HHV-8-Proteinen und das Auftreten von Zelltod begleitenden molekularen Prozessen im lytischen Zyklus von HHV-8 waren der Anlass nach p53 transkriptions-aktivierenden HHV-8-Genen zu suchen.

### **1.6.1 Signalwege der HHV-8-Interaktion**

Die Interaktionen eines Signalweges können viele verschiedene Schritte wie Protein-Protein-Interaktionen oder Modifikationen wie Phosphorylierungen oder transkriptionelle Aktivierungen umfassen. Die Induktion von AP-1, NFκB oder p53 lässt sich mit Hilfe der jeweiligen Transkriptionsaktivierung erfassen.

#### **1.6.1.1 Die Transkriptionsaktivierung von AP-1**

AP-1 wird mit der Regulation eines weiten Spektrums von biologischen Prozessen wie der Zellproliferation, Differenzierung sowie Apoptose assoziiert und hat onkogenes Potential (Jochum *et al.* 2001). AP-1 wirkt als zellulärer Biosensor und kann dadurch auch als Signalweg der Stressinteraktion betrachtet werden. Das Aktivator-Protein-1 besteht aus verschiedenen Dimeren von Mitgliedern der Fos-, Jun-, sowie einigen der "Activating Transcription Factor" (ATF)- und "Jun Dimerization"-Proteine (JDP) (Karsenty G und Wagner EF 2002, Jochum *et al.* 2001). Alle beteiligten Proteine haben eine konservierte "basic leucine zipper" (bZIP)-Domäne mit einem enthaltenen Leuzin-Zipper-Motiv als strukturelle Gemeinsamkeit. Durch das Leuzin-Zipper-Motiv interagieren die Proteine untereinander und bilden Hetero- oder Monodimere (Wagner EF 2001, Eferl R und Wagner EF 2003) (Abb. 5).

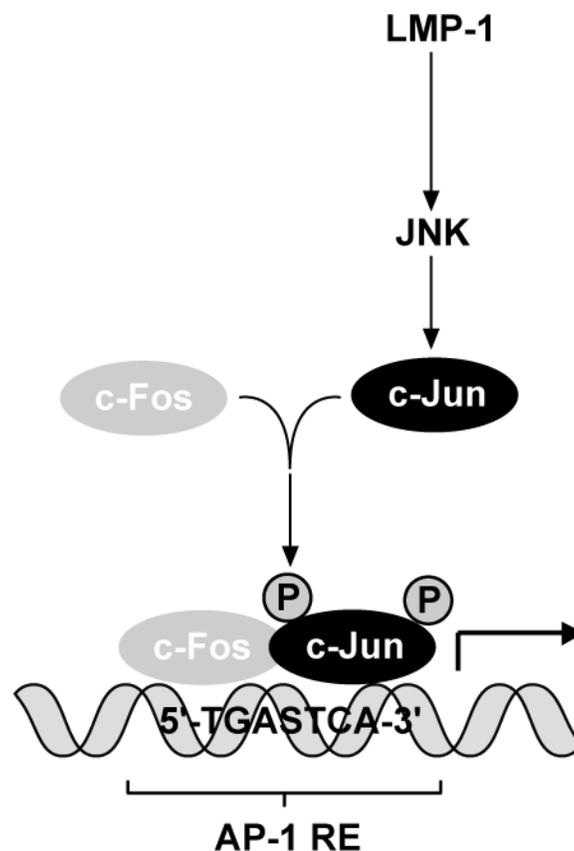


Abb. 5, Schematische Darstellung der Induktion von AP-1 durch LMP1

LMP-1 vermittelt über seine C-terminale Domäne die Induktion der c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Kaskade und diese die Phosphorylierung von c-Jun. Phosphoryliertes c-Jun dimerisiert zusammen mit c-Fos und führt zu einer verstärkten Transkriptionsaktivierung am AP-1-Responseelement (schwarzer Pfeil).

Der basische Anteil der bZIP-Domäne vermittelt die DNA-Bindung und damit die Wirkung des

Aktivator-Proteins als Transkriptionsfaktor. Die DNA-Bindungsstelle für AP-1 hat die Konsensussequenz 5'-TGASTCA-3' (Cohen *et al.* 1989, Angel P und Karin M 1991).

Die Regulation der AP-1-Transkriptionsaktivierung ist sehr komplex und kann über Transkriptions- oder Expressionsregulation der beteiligten Proteine sowie deren post-translationalen Modifikationen sowie den DNA-Bindungsseigenschaften der am Dimer beteiligten Proteine beeinflusst werden (Karin *et al.* 1997, Wisdom R 1999). Zum Beispiel kann LMP-1 über seine C-terminale Domäne die Induktion der c-Jun N-terminale Kinasen (JNK)-Kaskade vermitteln und dadurch c-Jun phosphorylieren (Kieser *et al.* 1997). Die Transaktivierung von c-Jun wird durch diese Phosphorylierung verstärkt und durch die Dimerisierung mit c-Fos zu AP-1 die Transkription von Promotoren mit TPA-Responseelement (TRE) stimuliert (Davis RJ 2000).

### **1.6.1.2 Die Transkriptionsaktivierung von NFκB**

NFκB ist hauptsächlich an Regulationsprozessen der Immunantwort beteiligt, spielt aber auch eine Rolle bei der Proliferation oder Apoptose (Ricciardi-Castagnoli P und Granucci F 2002, Ghosh *et al.* 1998, Karin M und Lin A 2002) und hat onkogenes Potential (Rayet B und Gelin C 1999, Orlowski RZ und Baldwin AS jr. 2002).

Der NFκB-Transaktivator-Komplex besteht aus p65/RelA, RelB, cRel, NF-B1 (p50/p105) oder NF-B2 (p52/p100) Dimeren, wie zum Beispiel p65/p50. Alle Mitglieder sind durch eine konservierte Rel-Homologe-Domäne (RHD) charakterisiert, die für die DNA-Bindung, Wechselwirkung bei der Dimerisierung und als Interaktionsstelle für die NFκB regulatorischen Proteine der IκB-Familie verantwortlich ist. Die IκB-Proteinfamilie umfasst IκB-α, IκB-β, IκB-γ/p105, IκB-δ/p100, IκB-ε und Bcl-3. Deren Mitglieder sind durch ein 30- bis 33-Aminosäuren langes Ankyrin-Wiederholungsmotiv charakterisiert, welches durch seine Helix-Loop-Helix-Struktur an die RHD der NFκB-Dimere binden kann (Mosavi *et al.* 2002). p105 und p100 sind Proteine mit einer RHD-Domäne und einem Ankyrin-Wiederholungsmotiv. Diese beiden Vorläuferstufen werden bei Phosphorylierung teildegradiert. So entsteht aus p105 p50 und aus p100 p52. Dabei wird das Ankyrinmotiv entfernt und dessen inhibitorische Wirkung aufgehoben.

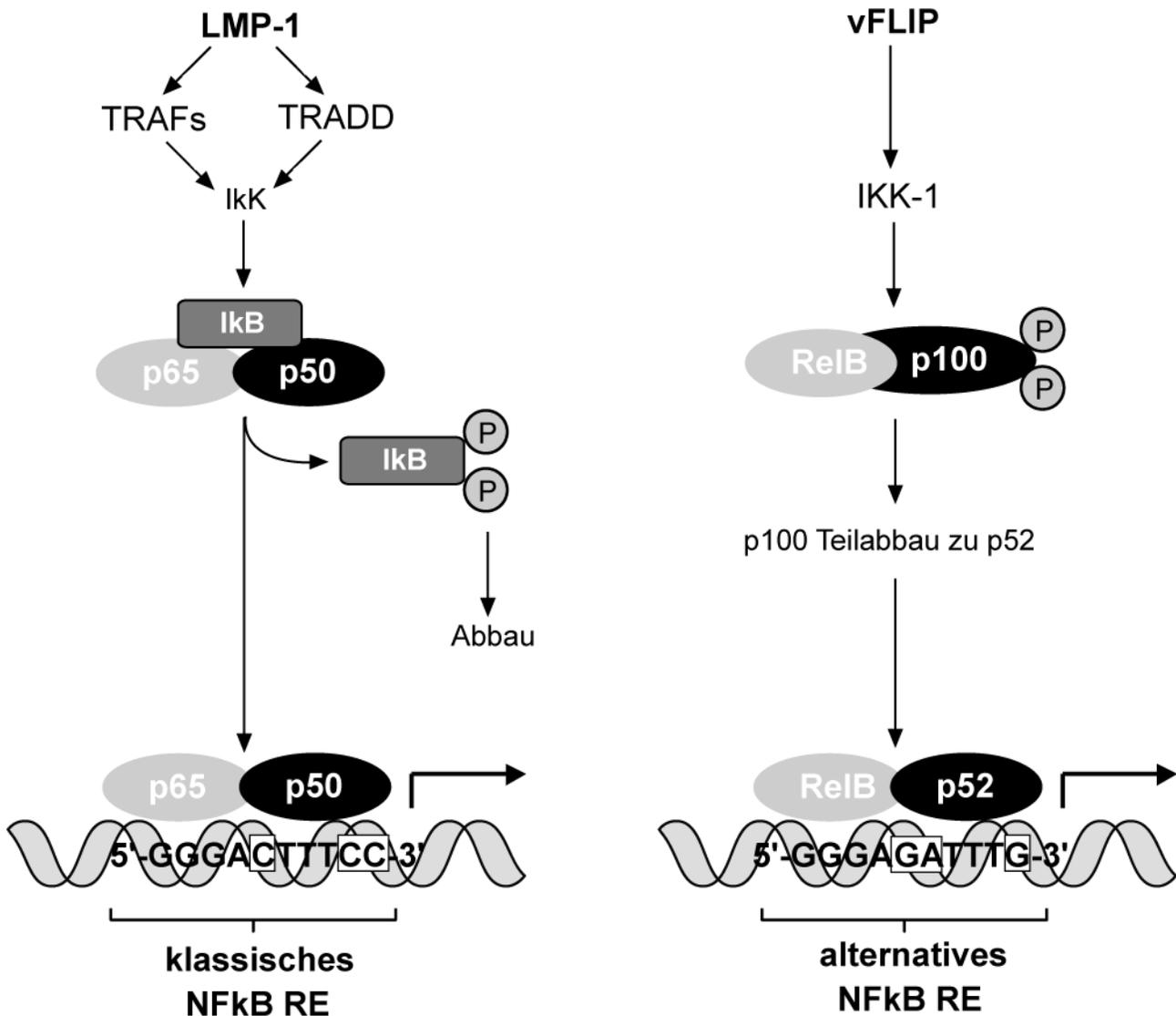


Abb. 6, Schematische Darstellung der klassischen NFκB-Aktivierung durch EBV LMP1 (links) und der alternativen durch HHV-8 vFLIP (rechts).

(links) LMP-1 induziert über den TNF Receptor Associated Death Domain (TRADD)- und TNF Receptor Associated Factor (TRAF)-Signalweg die Aktivierung der Iκ-Kinasen, welche IκB phosphorylieren, das anschließend ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut wird. Das freie NFκB-Dimer kann in den Kern translozieren und als Transaktivator am NFκB-Responseelement wirken (schwarzer Pfeil).

(rechts) vFLIP induziert die IκB-Kinase-1, welche p100 phosphoryliert und anschließend nach Ubiquitinierung zu p52 teildegradiert wird. Dabei werden die inhibitorischen Ankyrinmotive von p100 entfernt und das verbleibende p52 wirkt im Dimer zusammen mit RelB als Transaktivator durch Bindung am NFκB-Responseelement (schwarzer Pfeil).

Die Unterschiede in den klassischen und alternativen NFκB-Responseelementen sind weiß hinterlegt und umrahmt.

In nicht stimulierten Zellen liegen NFκB-Dimere gebunden an Proteine der IκB-Familie vor oder in Dimerkomplexen mit p100 oder p105 (Abb. 6). Durch das Ankyrin-Wiederholungsmotiv wird das nukleäre Lokalisierungssignal von NFκB maskiert, somit die Translokalisierung in den Zellkern verhindert und durch die Komplexierung NFκB in einem inaktiven Zustand gehalten. Bei der klassischen NFκB-Aktivierung werden Iκ-Kinasen (IKK) aktiviert, die IκB an Serin-32 und -36 phosphorylieren. Phosphoryliertes IκB wird durch die Ubiquitin-Ligase erkannt, für den Proteinabbau mehrfach mit Ubiquitin markiert, durch das Proteasom abgebaut und dadurch das ehemals gebundene NFκB-Dimer freigesetzt.

Bei der alternativen Aktivierung werden zum Beispiel Iκ-Kinasen aktiviert, die p100 phosphorylieren. Das phosphorylierte p100 wird poly-ubiquitiniert und im Proteasom teilweise zu p52 prozessiert und dadurch das Ankyrin-Motiv abgebaut. Das unmaskierte NFκB-Dimer kann dann an NFκB-DNA-Motive binden und als Transaktivator fungieren.

EBV LMP-1 kann NFκB über seine C-terminale "Carboxy-terminal Activating Region" (CTAR)-1 und -2 Region die klassische und alternative Aktivierung induzieren (McFarland *et al.* 1999, Mosialos *et al.* 1995, Devergne *et al.* 1996, Sandberg *et al.* 1997, Brodeur *et al.* 1997, Izumi KM und Kieff ED 1997a, Izumi KM und Kieff ED 1997b, Sylla *et al.* 1998). HHV-8 vFLIP induziert NFκB über die alternative Aktivierung (Sun *et al.* 2003, Matta *et al.* 2003).

### **1.6.1.3 Die Transkriptionsaktivierung von p53**

Zellulärer Stress oder DNA-Schädigungen können zur Aktivierung von p53 führen. p53 ist ein Tumorsuppressor, der den Zellzyklus anhalten kann, um zum Beispiel der Zelle Zeit zur Reparatur der DNA-Schäden zu geben. Bei Misslingen der Reparatur oder anhaltender Schädigung, initialisiert p53 durch Transkriptionsaktivierung oder direkte Interaktion den Zelltod, um die irreparable Zelle zu entfernen und eine mögliche onkogene Transformation, initialisiert durch die DNA-Schäden, zu verhindern (Polyak *et al.* 1997, Prives C und Hall PA 1999, Levine AJ 1997). Aktiviertes p53 wirkt als Tetramer selbst als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor mit 5'-RRRCWWGYYY-3' als Konsensusbindungssequenz (Stenger *et al.* 1992, Lane DP 1992, Friedman *et al.* 1993, el-Deiry *et al.* 1992). Ohne Stimulus liegt p53 in einem autoregulatorischen Gleichgewicht mit der Ubiquitin-Protein-Ligase "Murine Double Minute" (MDM)-2 vor (Abb. 7). Zum einem stimuliert p53 die eigene Transkription sowie die von MDM-2 (Deffie *et al.* 1993).

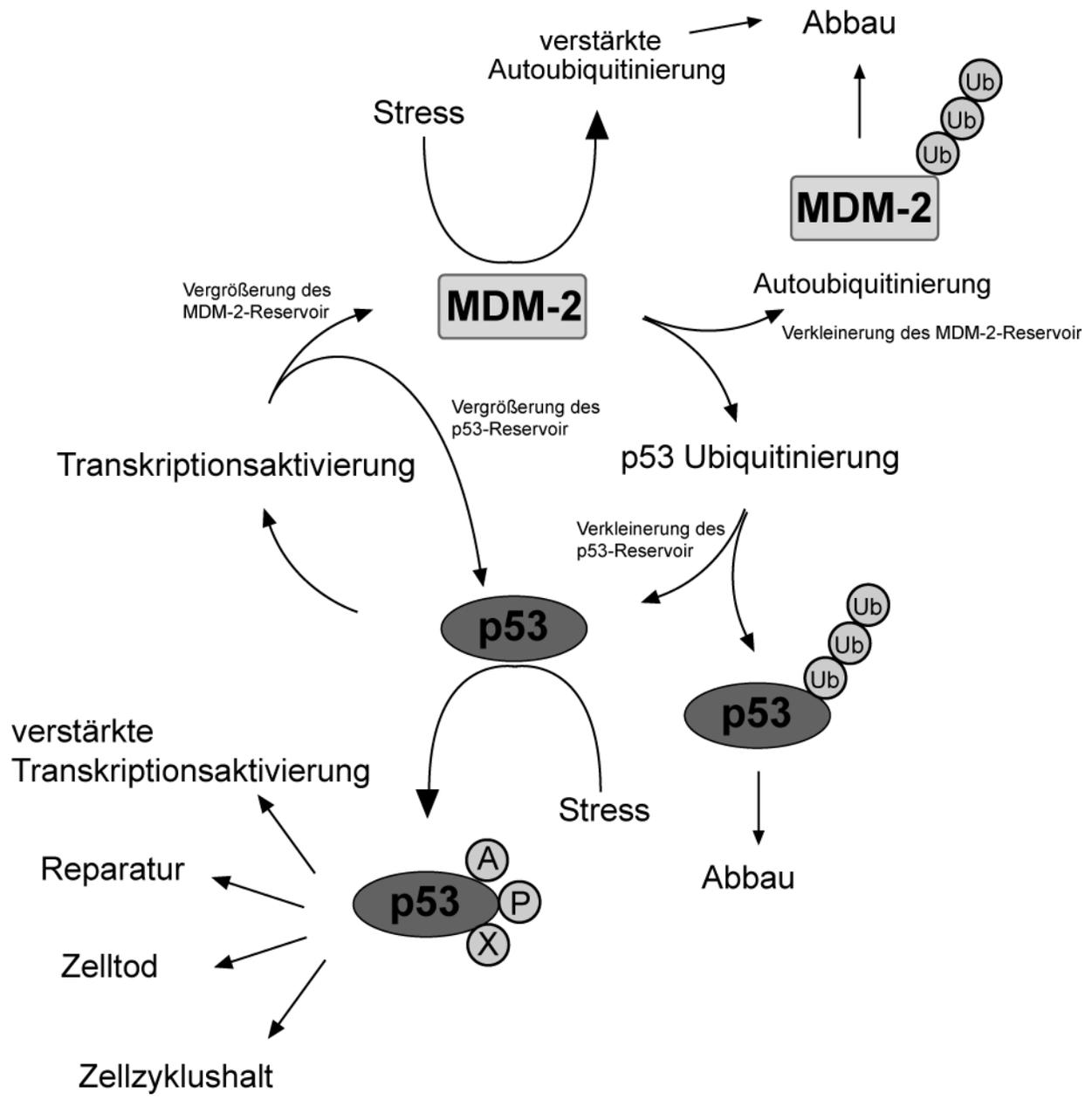


Abb. 7, Übersicht über das MDM-2-/p53-Gleichgewicht.

p53 induziert die eigene und die MDM-2-Entstehung durch Transkriptionsaktivierung. MDM-2 fördert über Ubiquitinierung den Abbau von p53 und den eigenen durch Autoubiquitinierung. Durch Stress wird p53 mittels Phosphorylierung (P), Acetylierung (A) oder andere posttranslationale Modifizierungen (X) stabilisiert und aktiviert. Im Gegenzug kann MDM-2 durch Stress zu erhöhtem Selbstabbau aktiviert werden. Aktiviertes p53 kann verschiedene Wirkungen, wie verstärkte Transkriptionsaktivierung, Reparatur der Zelle, den Zelltod oder den Zellzyklusarrest auslösen.

Im regulatorischen Gegenzug ubiquitiniert MDM-2 als Proteinligase p53 (Wu *et al.* 1993), blockiert dessen Transkriptionsaktivierung und transportiert p53 in das Zytosol (Freedman DA und Levine AJ 1998). Durch die Proteinligasefunktion von MDM-2 wird p53 für den Abbau über Ubiquitinierung markiert, was der Grund für eine sehr kurze Halbwertszeit von ca. 20 Minuten in der unstimulierten Zelle ist (Reich NC und Levine AJ 1984, Kubbutat MH und Vousden KH 1997, Haupt *et al.* 1997). Damit liegt p53, durch MDM-2 reguliert, nur in geringen Konzentrationen, ohne eigentliche aktive Funktion, im Zytosol der unstimulierten Zelle vor.

Zur weiteren Regulation kann MDM-2 sich selbst ubiquitinieren, limitiert damit die eigene Konzentration und verhindert eine Überreaktion durch eine starke Ansammlung von MDM-2.

Damit p53 seine Wirkungen ausführen kann, muss zuerst dessen Abbau verhindert werden. Einerseits kann dies durch eine verminderte Interaktion von MDM-2 mit p53 geschehen, die unter anderem durch den p53-Phosphorylierungsstatus reguliert wird. Ist zum Beispiel p53 an mehreren bestimmten Stellen phosphoryliert wird die Interaktion mit MDM-2 unterbrochen, es findet keine Markierung für den Abbau statt und keine MDM-2 Blockierung der Transkriptionsaktivierung (Sheih *et al.* 1997, Fuchs *et al.* 1998).

Andererseits fördert die erhöhte Degradation durch Autoubiquitinierung von MDM-2 die Stabilisierung von p53 indirekt (Honda *et al.* 1997, Fang *et al.* 2000). Die Eigenubiquitinierung ist durch die MDM-2-Phosphorylierung und -Sumoylierung reguliert. Bei einer erhöhten Sumoylierung von MDM-2 wird p53 verstärkt durch MDM-2 abgebaut und die MDM-2-Eigenmarkierung wird vermindert (Buschmann *et al.* 2000). Bei der Induktion durch Stresssignale wird die Sumoylierung blockiert, weniger p53 für den Abbau markiert und damit indirekt stabilisiert. Im Gegenzug ubiquitiniert sich MDM-2 verstärkt selbst und fördert dadurch seinen eigenen Abbau.

#### **1.6.1.4 Posttranslationale Modifikationen von p53**

Posttranslationale Modifikationen haben Einfluss auf die Stabilität, die Lokalisation, die DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität von p53. Die Bedeutung für die Regulation von p53/MDM-2 wurde bereits für die Ubiquitinierung, Phosphorylierung und Sumoylierung beschrieben.

## Domänenfunktion

## Postranslationale Modifikation

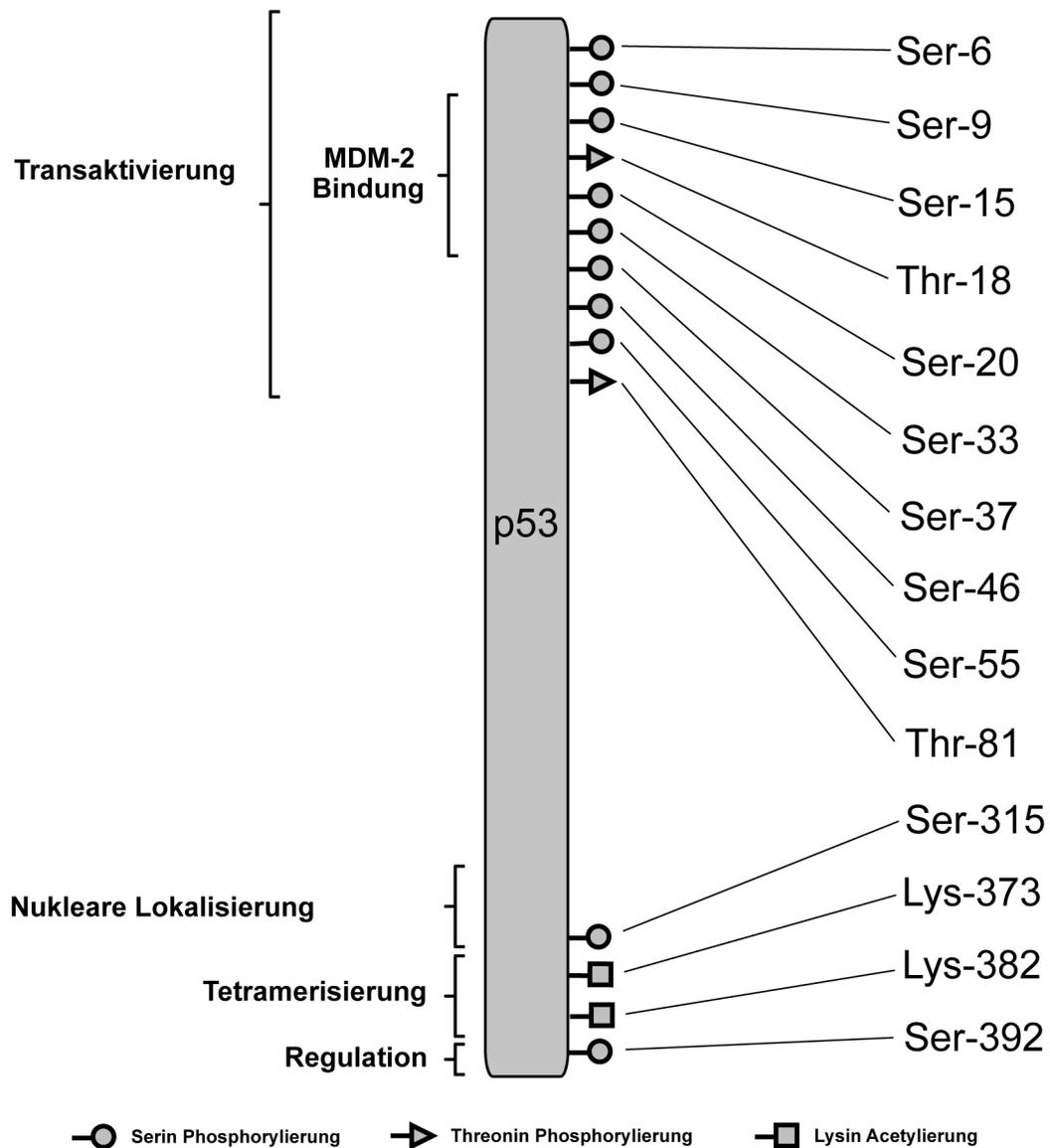


Abb. 8, Schematische Übersicht über ausgewählte p53-Modifikationsstellen und deren relative Lage zu den Funktionsdomänen.

(links) Schematisch dargestellt ist die relative Größe der p53-Domäne mit der entsprechenden Funktion.

(rechts) Posttranslationale Modifikationen von p53 wie Phosphorylierung (Serin (Ser) oder Threonin (Thr)) und Acetylierung (Lysin (Lys))

(unten) Bezeichnung der grafischen Symbole

Daneben ist die Acetylierung zusammen mit der Phosphorylierung bei p53 ein wichtiger Indikator für dessen Aktivierung und ein Hinweis für die stattfindenden Interaktionen. Das Muster der Modifikationen scheint die Funktion von p53 zu diktieren. p53 lässt sich zur Vereinfachung in einige wichtige Regionen unterteilen. C-terminal ist die Interaktionsdomäne für MDM-2, die auch für die Transaktivierung von p53 verantwortlich ist. Am N-Terminus wird unter anderem die DNA-Bindung und Tetramerisierung reguliert. Durch diese Einteilung lässt sich die funktionelle Bedeutung mancher Modifikationsstellen abschätzen (Abb. 8).

Durch Stresseinwirkungen auf die Zelle können, abhängig vom Stressfaktor, verschiedene Kinasen wie zum Beispiel "Ataxia-telangiectasia mutated large Protein"-Kinase (ATM), "Ataxia-telangiectasia Rad3-related"-Kinase (ATR), Caseinkinase-1 oder die DNA-abhängige Proteinkinase für die Phosphorylierung, sowie Histonacetyltransferasen wie "CREB Binding Protein" (CBP) /p300 und "p300/CBP-associated Factor" (PCAF) für die Acetylierung aktiviert werden (Meek DW 1999, Liu *et al.* 1999). Bei durch UV-Bestrahlung oder Ionisierung gestressten Zellen ist eine verstärkte Phosphorylierungen von Serin-6, -9, -15, -20, -33, -37 und -46 sowie Threonin-18, und -81 zu beobachten. Für einige der Phosphorylierungen ist die genaue Bedeutung nicht bekannt, aber alle Phosphorylierungen liegen im N-terminalen Bereich von p53, der für die Transaktivierung und MDM-2 Bindung von Bedeutung ist. Für die Phosphorylierung von Serin-15, Serin-20 und Threonin-18 ist bekannt, dass diese durch ATM oder ATR phosphoryliert werden, sich diese in oder nahe der MDM-2-Bindungsstelle befinden und durch diese Phosphorylierung die Interaktion mit MDM-2 unterbunden wird (Shieh *et al.* 1997, Waterman *et al.* 1998).

Weiterhin kann auch eine einzelne spezielle Phosphorylierung, wie zum Beispiel Serin-46, ausreichend sein um p53 für das Auslösen des Zelltodes zu aktivieren (Oda *et al.* 2000). Zusätzlich sind für den C-terminalen Bereich die Phosphorylierung von Serin-315 und -392 nach UV-Bestrahlung und für Serin-392 auch durch die Interferon induzierte "Double-Stranded RNA-activated Protein"-Kinase (PKR) beschrieben (Blaydes *et al.* 2001, Lu *et al.* 1998, Kapoor M und Lozano G 1998, Cuddihy *et al.* 1999a, Cuddihy *et al.* 1999b, Sakaguchi *et al.* 1998). Die Phosphorylierung von Serin-392 fördert die Oligomerisierung von p53 und ist durch die Phosphorylierung von Serin-315 gegenreguliert (Sakaguchi *et al.* 1997). Zusätzlich wurde die durch Casein-Kinase II (Hupp *et al.* 1993) oder CBP/p300-vermittelte Acetylierung (Gu *et al.* 1997) an Lysin-382 und -373 beobachtet. Durch diese Acetylierung können

Koaktivatoren an p53 binden und dessen Transkriptionswirkung verstärken (Avantaggiati *et al.* 1997, Lill *et al.* 1997).

Phosphorylierungen bei p53 sind nicht nur in stimulierten Zellen, sondern wie zum Beispiel von Threonin-55, auch in unstimulierten vorhanden (Gatti *et al.* 2000). Threonin-55 wird durch die Kinasefunktion von "TATA Box binding Protein-associated Factor" (TAF)-1 phosphoryliert und dadurch p53 für den proteolytischen Abbau über einen unbekanntem Mechanismus markiert (Li *et al.* 2004).

#### **1.6.1.5 p53 abhängige Apoptose**

Durch p53 kann unter anderem der Zellzyklus angehalten oder der programmierte Zelltod ausgelöst werden. Der durch p53 ausgelöste Zelltod wird hauptsächlich durch den mitochondrialen Signalweg vermittelt (Schuler M und Green DR 2001). Für die Vermittlung des Zelltodes werden zwei verschiedene p53-Initialisierungen beschrieben (Abb. 9). Einerseits kann durch die Wirkung als Transkriptionsfaktor, bei der p53 die Transkription von pro-apoptischen Genen wie "BCL-2-associated X Protein" (BAX), "p53 Upregulated Modulator of Apoptosis" (PUMA) oder Noxa initialisiert und bei Expression, ausgelöst durch die Eigenschaften der Proteine, der Zelltod initialisiert werden (Miyashita T und Reed JC 1995, Oda *et al.* 2000, Yu *et al.* 1999, Yu *et al.* 2003). Andererseits ist eine transkriptionsunabhängige Initialisierung des Zelltodes durch p53 bekannt (Yan *et al.* 1997). Dabei findet durch einen Stimulus eine schnelle Translokation von p53 zum Mitochondrium statt. Dort formiert das p53-Protein mit anti-apoptischem BCL-2 oder "BCL-2-like 1 protein"- "long" (BCL-xL) Komplexe und hebt vermutlich deren anti-apoptische Wirkung auf (Erster *et al.* 2004, Marchenko *et al.* 2000, Mihara *et al.* 2003).

Zusätzlich ist bekannt, dass aktiviertes p53 mit Hilfe seiner N-terminalen Regionen die Cytochrom-C-Abgabe am Mitochondrium stimulieren kann (Schuler *et al.* 2000). Damit könnte direkt interagierendes p53 frühe Ereignisse des Zelltodes initialisieren.

Der Zelltod wird durch Cystein-Aspartat-Proteasen, den Caspasen vermittelt. Diese speziellen Proteasen erkennen Aminosäuresequenzen mit Asparatresten, hydrolysieren Proteine als ihr Substrat und beteiligen sich am programmierten Zelltod durch schrittweises Zerstören der Zelle mit charakteristischen morphologischen Merkmalen.

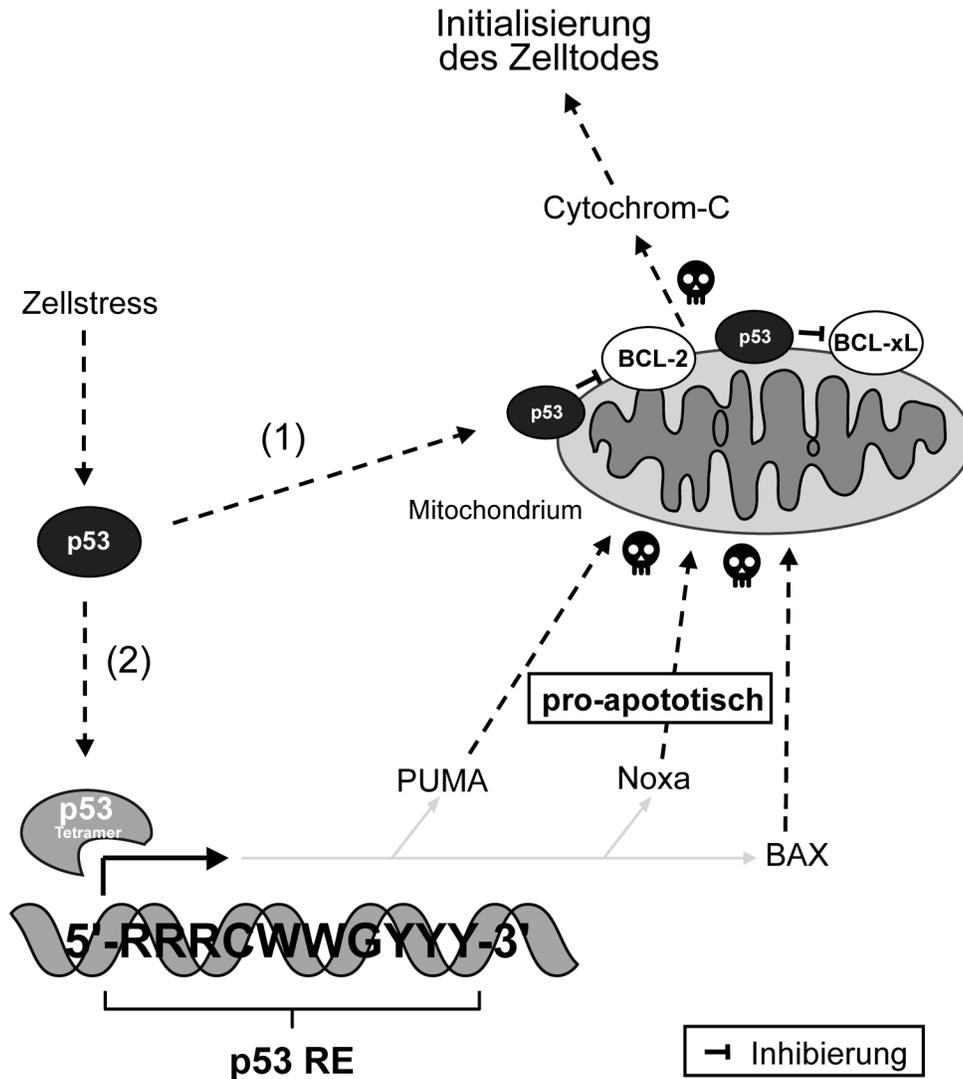


Abb. 9, Übersicht der p53-Interaktionen zum Auslösen des Zelltodes

Durch Zellstress kann p53 aktiviert werden um (1) direkt am Mitochondrium oder als (2) Transkriptionsfaktor zu interagieren. Bei der direkten Interaktion (1) kann p53 an BCL-2 oder BCL-xL binden und wahrscheinlich deren anti-apoptotische Funktion blockieren. Dadurch können am Mitochondrium pro-apoptotische Prozesse, wie die Depolarisation des mitochondrialen Potentials ablaufen.

Bei der Transkriptionsaktivierung (2) fungiert p53 als Transkriptionsfaktor und initialisiert die Entstehung von pro-apoptotischen Genen wie PUMA, Noxa oder BAX. Diese können am Mitochondrium durch pro-apoptotische Prozesse Cytochrom-C freisetzen, durch das die Zelltodkaskade initialisiert werden kann.

Bei einer intrinsischen Aktivierung von Caspasen werden zum Beispiel durch Stressfaktoren ausgelöst, die "Mitochondrion Permeability Transition Pores" MPTPs formiert und dadurch die Abgabe von Cytochrom-C ins Zytosol initialisiert. Freies Cytochrom-C aktiviert zusammen mit "Apoptotic Protease Activation Factor-1" (APAF)-1 und der Pro-Caspase-9 weitere Effektorcaspasen, die die Zerstörungskaskade innerhalb der Zelle initialisieren (Chohen GM 1997, Fan TJ 2005).

Die Möglichkeit von p53 einerseits durch einen schnellen transkriptions-unabhängigen Weg und den Zelltod andererseits durch die Transkription auszulösen, lässt die Kooperation beider Wege vermuten. Der eine ist, wahrscheinlich abhängig vom Stress auslösenden Faktor, eine schnelle aber begrenzte direkte Interaktion und die Transkriptionsaktiveringung eine langsame, dafür nachhaltige Interaktion von p53 zur Induktion des Zelltodes (Erster *et al.* 2004).

Weiterhin spielt neben dem Stressfaktor die Zielzelle selbst eine Rolle. So kann der gleiche Stress auslösende Faktor in verschiedenen Zelltypen entweder den Zellzyklusarrest oder den Zelltod auslösen (Polyak *et al.* 1996). Eine zusätzliche Rolle spielt der molekulare Zustand der Zelle, zum Beispiel wie stark die DNA geschädigt ist, die aktuelle Zellzyklusphase oder die Zusammensetzung des Proteoms. So haben unterschiedliche p53-Expressionslevel einen Einfluss auf die Entscheidung über das Auslösen des Zelltodes oder des Zellzyklusarrests. Zusätzlich wirken andere Zellzyklus regulative Proteine wie pRB je nach Expressionslevel, eigenem Aktivierungszustand und Zellzyklusphase regulierend und beeinflussen so die Balance zwischen den p53-Interaktionsmöglichkeiten (Chen *et al.* 1996, Haupt *et al.* 1995, Morgenbesser *et al.* 1994).

## **2. Fragestellung und Zielsetzung**

Das Humane-Herpesvirus-8 gehört zu den Viren, die an der Entstehung von Tumoren, wie KS, beteiligt sind. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind nicht vollständig aufgeklärt.

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist, die Induktion von ausgewählten Transkriptionsfaktoren AP-1, NFκB und p53 durch HHV-8-Gene zu untersuchen. Anschließend soll die Funktion der HHV-8-Gen-Interaktion mit der Wirtszelle analysiert werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid (29:1)	BioRad
Agarose	PEQlab
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Sigma
Bacto-Agar	Difco
“CompleteMini” Tabletten	Roche
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	MBI Fermentas
4',6'-Diamino-2-phenylindol (DAPI)	Molecular Probes
D <sub>c</sub> Protein Assay Reagenz A	BioRad
D <sub>c</sub> Protein Assay Reagenz B	BioRad
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM Medium	PAA
DNA Isolierungskit	Qiagen
DNA Längenstandard	MBI Fermentas
„Endofree“ Maxi Kit	Qiagen
Effectene®	Qiagen
Essence „fast&last“ nail polish	DM Drogerie
ECL Nachweisreagenz	Amersham Pharmacia
Ethidiumbromid	Roth
Fötale Kälberserum	Gibco
Gamma-Aminopropylsilane-Objektträger (GAPS-Slides)	Corning
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell
Gelatine Typ B 225 Bloom	Sigma
Glycin	Merck
Glycerol	Sigma
(L-)Glutamin	PAA
Hefeextract	Difco
Hybond P-Membran (PVDF)	Amersham Pharmacia
Kanamycin	Sigma
Kapillarröhrchen AD 1,55 LG 100MM	Hirschmann Laborgeräte
Laemmli Sample Buffer	BioRad
6x Loading Dye Solution	MBI Fermentas
2-β-Mercaptoethanol	Sigma
MES Puffer	Invitrogen
MilliQ Wasser	MilliQ plus PF
Miniscart 0,20 µm	Sartorius
MOPS Puffer	Invitrogen
Mowiol 4-88	Calbiochem
Natriumhypochlorit Lösung (6-14% CL aktiv)	Riedel-de Haën

Material	Hersteller
NuPAGE® Bis-Tris 4-12%	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (PS)	PAA
Pril	Henkel
Protein Molekulargewichtsmarker	NEB
Protein Molekulargewichtsmarker „Kaleidoskope“	BioRad
QIAEX II®	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
RIPA Puffer	Sigma
SDS	Roth
S.O.C. Medium	Invitrogen
TEMED	BioRad
Trypan Blue MT29500CI	Gibco
Trypton	Difco
Tween-20®	Sigma
„Western Blocking Reagenz“	Roche
Ziegenserum (Goat serum)	Jackson ImmunoResearch

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad „pro analysis“.

### 3.1.2 Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsenzyme	NEB / MBI Fermentas / Roche
Shrimp Alkaline Phosphatase	Roche
<i>Taq</i> Polymerase FirePol	Solis
<i>Pfx</i> Polymerase	Invitrogen
Trypsin/EDTA (TE)	PAA

### 3.1.3 Primäre Antikörper

Antigen Epitop	Spezies	Klonalität	Hersteller	Anwendung und Verdünnung
GAPDH	Maus (mouse)	monoclonal	Chemikon	WB 1:30000
Myc-Tag	Maus (mouse)	monoclonal	NEB	IZC 1:1000 WB 1:2000
p53	Hase (rabbit)	polyclonal	NEB	WB 1:1000
Phospho-p53 Serin-15	Hase (rabbit)	polyclonal	NEB	WB 1:1000
Phospho-p53 Serin-33	Hase (rabbit)	polyclonal	NEB	WB 1:1000

Antigen Epitop	Spezies	Klonalität	Hersteller	Anwendung und Verdünnung
Phospho-p53 Serin-46	Hase (rabbit)	polyclonal	NEB	WB 1:1000
Phospho-p53 Serin-392	Hase (rabbit)	polyclonal	NEB	WB 1:1000
Acetyl-p53 Lysin-382	Hase (rabbit)	polyclonal	NEB	WB 1:500

### 3.1.4 Sekundäre Antikörper

#### 3.1.4.1 gekoppelt Enzyme

Antigen Epitop	Spezies	Klonalität	Enzym	Hersteller	Anwendung und Verdünnung
Anti-Hase (rabbit)	Esel (donkey)	monoklonal	Meerrettich Peroxidase	Amersham Pharmacia	WB 1:2000
Anti-Maus (mouse)	Schaf (sheep)	monoklonal	Meerrettich Peroxidase	Amersham Pharmacia	WB 1:2000

#### 3.1.4.2 gekoppelte Fluorochrome

Antigen Epitop	Spezies	Klonalität	Fluorophor	Hersteller	Anwendung und Verdünnung
Anti-Hase (rabbit)	Ziege (goat)	monoklonal	Alexa-488	Moleculare Probes	IZC 1:2000
Anti-Hase (rabbit)	Ziege (goat)	monoklonal	Alexa-568	Moleculare Probes	IZC 1:2000
Anti-Maus (mouse)	Schaf (sheep)	monoklonal	Alexa-488	Moleculare Probes	IZC 1:2000
Anti-Maus (mouse)	Schaf (sheep)	monoklonal	Alexa-568	Moleculare Probes	IZC 1:2000

### 3.1.5 Vektoren und Plasmide

Vektor	Insert	Prokaryotische Resistenz	Hersteller oder Herkunft
pcDNA4 myc-His(6)-tagged Version "B"	leer	Ampicillin	Invitrogen
pcDNA3.1+	leer	Ampicillin	Invitrogen
pET3a-p53	humanes p53	Ampicillin	Dr. L. Wiesmüller (*)
p53ex	humanes p53	Ampicillin	Sonja Bauer (*)
pFRED-GFP143	GFP143	Ampicillin	Dr. H. Wolff
pHebo-LMP1	EBV-LMP1	Ampicillin	Dr. A. Kieser



Name	Sequenz 5' -> 3'	Schnittstelle
RE-p53-P3	GAAGATCTGACAGCCCGGGCATGTCCAAGGCAAGGCCAGG CAAGTCCAGGCAAGGCAAACGTACGCGTCG	MluI/BglII
p53_screen	ACGTTTGCCTTGCCTGGACTTGCCTGG	keine
TATA_short-P5	GATCTGGGTATATAATGGA	BglII/HindIII
TATA_short-P3	AGCTTCCATTATATACCCA	BglII/HindIII
TATA_long-P5	GAAGATCTAGACTCTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGAAT TCCAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAAAGCTTGGG	BglII/HindIII
TATA_long-P3	CCCAAGCTTTTTACCAACAGTACCGGAATGCCAAGCTGGAA TTCGAGCTTCCATTATATACCCTCTAGAGTCTAGATCTTC	BglII/HindIII
EBV-TK Primer 5	TAATAGATCTCGCCACCATGGCTGGATTTCCAGGAAAGGAG G	BglII
EBV-TK Primer 3	ATACCGCGGGTCCCGATTTCCCCTCTCAAATC	SacII
HHV-8tk-ND Primer 5	TAATAGATCTCGCCACCATGGCAGAAGGCGGTTTTGGAGC GGACTC	BglII
HHV-8tk-ND Primer 3	TATACCGCGGGCCGCGCTCCCTGAGACGGTCACTAC	SacII
HHV-8tk-KD Primer 5	TAATAGATCTCGCCACCATGGCCTTTAGTCTAGGGGCGTG AAATC	BglII
HHV-8tk-KD Primer 3	TATACCGCGGGACCCTGCATGTCTCCTCTAGGTGATTAAC	SacII
HHV-8tk_Site-I_SDM	GGGTAATGGGTGTGGCAAATCAACGCTGGTCAAC	keine
HHV-8tk_Site-IV_SDM	CCCCAGCAGTGGTGGTCCCTCTCATGCACC	keine
RT-ORF26-P5	GGACAGCAACACCCAGCTAGC	keine
RT-ORF26-P3	CGCAGGGCAGTACGTGGATCC	keine
RT-Beta-aktin-P5	GGATTCCCTATGTGGGCGACGAGG	keine
RT-Beta-aktin-P3	CACGGAGTACTTGGCTCAGGAGG	keine
RT-HHV-8tk-KD-P5	GGTGCCTCTTTGATAGGCATCTCC	keine
RT-HHV-8tk-KD-P3	CCGGAATATTTGTGGTTTGTACG	keine
RT-HHV-8tk-ND-P5	GGCCTCTGTGACTAGGGGAGGC	keine
RT-HHV-8tk-ND-P3	CCATTGACGCGTCTGCCGGCC	keine
RT-LANA-1-P5	GCGAAGGAAGCATGTCGCC	keine
RT-LANA-1-P3	GGAGGTGTAGTCTGCTGCG	keine

### 3.1.6.1 Oligonukleotide zur Erzeugung der HHV-8-Expressionsdatenbank und Sequenzierung

Name	Sequenz 5' -> 3'	Schnittstelle
HHV-8-orf002_P5	CGGAATTCGCCGAAGTCTCACTGAAGGGCGGGG	EcoRI
HHV-8-orf002_P3	GAAGATCTCGCCACCATGGATCCTACACTTTACTGTGTAGTTG CGGTTG	BglII
HHV-8-orf004_Seq	GGAGATTTTAAGCCTGATAAAGATTATTATGAG	keine

Name	Sequenze 5' -> 3'	Schnittstelle
HHV-8-orf004_P5	CGGAATTCCGCCACCATGGCCTTTTTAAGACAAAC	EcoRI
HHV-8-orf004_P3	TCCCCGCGGACGAAAGAACAGATAGTGAATAAGGTAATCAG	BglII
HHV-8-orf006_P5	TAATGGATCCCGCCACCATGGCGCTAAAGGGACCACAAAC	BamHI
HHV-8-orf006_P3	CGCGGATCCCAAATCCAGGTCAGAGAGCAGGGATGC	BamHI
HHV-8-orf007_P5	TAATGGATCCCGCCACCATGGCAAAGGAACTGGCGG	BamHI
HHV-8-orf007_P3	TCCCCGCGGGACCTGGGAGTCATTGTGGTTGCTC	SacII
HHV-8-orf009_P5	TAATGGATCCCGCCACCATGGATTTTTTCAATCCATTTATC	BamHI
HHV-8-orf009_P3	CGGAATTCGCGGGCGTGGGAAAAGTCAC	SacII
HHV-8-orf010_P5	CGCGGATCCCGCCACCATGCAGACAGAGGCAACGTTC	BamHI
HHV-8-orf010_P3	GGAATTCGCCGATTGCATGGGTTCTCGTGGCGGTCGG	EcoRI
HHV-8-orf011_P5	CGCGGATCCCGCCACCATGGCGCAGGAGTCAGAGCAG	BamHI
HHV-8-orf011_P3	CGGAATTCGCACTGCGTCCGGTGGCAACATACATTTTTCTGAA TGTTTG	EcoRI
HHV-8-orf017_P5	TCCCCGCGGCTGCTTGTTTCAGGAGCTCCTCGCAGAACATCTT G	SacII
HHV-8-orf017_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGAGCCTCCTAAGCCCCGG	BamHI
HHV-8-orf018_P5	CGCGGATCCCGCCACCATGCTCGGAAAATACGTGTGTG	BamHI
HHV-8-orf018_P3	TCCCCGCGGAACCGCGTGTGTTGTTAAACGCACCAAGG	SacII
HHV-8-orf019_P5	TCCCCGCGGAACGACCGCGAGGACCACC	SacII
HHV-8-orf019_P3	GGAAGATCTCGCCACCATGCTGACATCAGAAAGGTCCTATCT AAGGTACCC	BglII
HHV-8-orf020_P5	TCCCCGCGGTGGACCTGAACAAGCCGGTCC	SacII
HHV-8-orf020_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGTACGAGTTTTTACAGACTTTC	BamHI
HHV-8-orf021_P5	AAGATCTCGCCACCATGGCAGAAGGCGGTTTTGGAG	BglII
HHV-8-orf021_P3	TCCCCGCGGGACCCTGCATGTCTCCTCTAGGTG	SacII
HHV-8-orf023_P5	TCCCCGCGGGACGGTCAATAAAGCGTAGATTTTTAAAGGTTT CTG	SacII
HHV-8-orf023_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGTTACGAGTTCCGGACG	BamHI
HHV-8-orf024_Seq_P5	CTCCTGGAGAGCCTGAAGCATCTC	keine
HHV-8-orf024_Seq_P3	GACACGTTTAGCCCATCCTTGCTG	keine
HHV-8-orf024_P5	TCCCCGCGGGACCAGCGGACGGACGCAACGTACG	SacII
HHV-8-orf024_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGGCAGCGCTCGAGG	BamHI
HHV-8-orf026_P5	CGGAATTCGCCACCATGGCACTCGACAAGAGTATAGTGG	EcoRI
HHV-8-orf026_P3	TCCCCGCGGGCGTGGGAATACCAACAGG	SacII
HHV-8-orf027_P5	CGCGGATCCCGCCACCATGACATCACCAGGATG	BamHI
HHV-8-orf027_P3	CGGAATTCGCTTTAAAATTTAGAATCAAGGGAGGGGTGGATAG ATTGGGCC	EcoRI
HHV-8-orf028_P5	CGGGATCCCGCCACCATGAGCATGACTTCCCCGTC	BamHI

Name	Sequenze 5' -> 3'	Schnittstelle
HHV-8-orf028_P3	TCCCCGCGGATCTGGCATGTATATTGTACGGTAGGGCTCCTGGG	SacII
HHV-8-orf029_P5	TCCCCGCGGTTTGTGGGGATATGGGCTTGTACATGTGTCTATC	SacII
HHV-8-orf029_P3	CGGGATCCCGCCACCATGCTTCAGAAAGACGCCAAG	BamHI
HHV-8-orf030_P5	GAAGATCTCGCCACCATGGGTGAGCCAGTGGATCCTGG	BglII
HHV-8-orf030_P3	TCCCCGCGGTTTTCGCACCGGTGTCTAGGCG	SacII
HHV-8-orf031_P5	GGGATCCCGCCACCATGTCACAAAACAGAAAGACTC	BamHI
HHV-8-orf031_P3	TCCCCGCGGCGTATCTTTTCGTTGATAGCATGC	SacII
HHV-8-orf032_P5	CGGGATCCCGCCACCATGGATGCGCATGCTATCAAC	BamHI
HHV-8-orf032_P3	TCCCCGCGGGCCATAGCGGCCTCGAATGAACAC	SacII
HHV-8-orf033_P5	TATATAAGCTTCGCCACCATGGCTAGCCGGAGGCGCAAAC	HindIII
HHV-8-orf033_P3	CGGGATCCATAAGAACGTAAGCCCAGGGCCTTAAGTTTTTTACAC	BamHI
HHV-8-orf034_P5	CGGGATCCCGCCACCATGTTTGCTTTGAGCTCGCTC	BamHI
HHV-8-orf034_P3	TCCCCGCGGGAGTTGGTTGAGTCCATTCTCCTTGATCATG	SacII
HHV-8-orf035_P5	CGGGATCCCGCCACCATGGACTCAACCAACTCTAAAAG	BamHI
HHV-8-orf035_P3	TCCCCGCGGGGGAGTTTCAGGGCACACC	SacII
HHV-8-orf036_P5	GAAGATCTCGCCACCATGCGCTGGAAGAGAATGGAGAG	BglII
HHV-8-orf036_P3	CGGAATTCGCGAAAACAAGTCCGCGGGTGTGG	EcoRI
HHV-8-orf037_P5	GAAGATCTCGCCACCATGGAGGCCACCCCCACAC	BglII
HHV-8-orf037_P3	CGGAATTCGCCGGGCTGTGAGGGACGTTTGC	EcoRI
HHV-8-orf040_P5	CGGGATCCCGCCACCATGGCAACGAGCGAAGAAAC	BamHI
HHV-8-orf040_P3	CGGAATTCGCGAGCAGGGACAGTAGGTCTCACCTCAGGCTCC	EcoRI
HHV-8-orf042_P5	TCCCCGCGGTTTTGAAAAAAGGGAAACAATGGGGGGTTTG	SacII
HHV-8-orf042_P3	CGGGATCCCGCCACCATGTCCCTGGAAGGGC	BamHI
HHV-8-orf045_P5	ATTAGAATTCGCGTCCAGCCACGGCCAGTTATATGCACCGTTTC	EcoRI
HHV-8-orf045_P3	TATAGGATCCCGCCACCATGGCGATGTTTGTGAGGACCTC	BamHI
HHV-8-orf047_P5	TCCCCGCGGTTTTCCCTTTTGACCTGCGTGCG	SacII
HHV-8-orf047_P3	TAATGGATCCCGCCACCATGGGGATCTTTGCGCTATTTG	BamHI
HHV-8-orf054_P5	TAATGGATCCCGCCACCATGAACAACCGCCGAGGCTC	BamHI
HHV-8-orf054_P3	CGGAATTCGCAAACCCAGACGACCCAGCCCTTG	EcoRI
HHV-8-orf055_P5	TCCCCGCGGTGTGCAACCTATCGCGCTTTC	SacII
HHV-8-orf055_P3	CGGAATTCGCCACCATGTCGTCTCCATGGTACAC	EcoRI
HHV-8-orf056_Seq_P5	CCATAGACCAGATCAGGGGCAAAC	keine
HHV-8-orf056_Seq_P3	GAGTGCACCTCCTCGAATGTCCTG	keine
HHV-8-orf056_P5	GAAGATCTCGCCACCATGGAGACGACATAACCGCC	BglII

Name	Sequenz 5' -> 3'	Schnittstelle
HHV-8-orf056_P3	CGGAATTCGCACTGGCCAGTCCCCTGGTACC	EcoRI
HHV-8-orf057b_Seq_P5	CAGCGGCAGGATGACGACGTCAGACAG	keine
HHV-8-orf057b_P5	CGGGATCCCGCCACCATGGTACAAGCAATGATAGACATG	BamHI
HHV-8-orf057b_P3	TCCCCGCGGAGAAAGTGGATAAAAGAATAAACCCCTTGTTAAAT TTGGCC	SacII
HHV-8-orf057r_P5	CGGGATCCCGCCACCATGATAATTGACGGTGAGAGC	BamHI
HHV-8-orf057r_P3	TCCCCGCGGAGAAAGTGGATAAAAGAATAAACCCCTTGTTAAAT TTGGCC	SacII
HHV-8-orf058_P5	TCCCCGCGGGCCAACAACCTTTATTTATTACCGACAG	BamHI
HHV-8-orf058_P3	TAATGGATCCCGCCACCATGTGCCGCCTGGACAGTG	SacII
HHV-8-orf069_P5	CGGGATCCCGCCACCATGCCGAAATCAGTGTCCAG	BamHI
HHV-8-orf069_P3	TCCCCGCGGTAGGGCGTTGACAAGTGC GGTTCC	SacII
HHV-8-orf070_P5	TCCCCGCGGTACTGCCATTTCCATACGAATGGTAGGATG	SacII
HHV-8-orf070_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGTTTCCGTTTGTACCTTTAAG	BamHI
HHV-8-orf072_P5	CGGAATTCGCATAGCTGTCCAGAATGCGCAGATCAAAG	EcoRI
HHV-8-orf072_P3	GAAGATCTCGCCACCATGGCAACTGCCAATAACCC	BglII
HHV-8-K01_P5	CGCGGATCCCGCCACCATGTTCTGTATGTTGTTTG	BamHI
HHV-8-K01_P3	TCCCCGCGGGTACCAATCCACTGGTTGCGTATAGTCTTC	SacII
HHV-8-K02_P5	CGCGGATCCCTTATCGTGGACGTCAGGAGTCACGCTG	BamHI
HHV-8-K02_P3	CCCAAGCTTCGCCACCATGTGCTGGTTCAAGTTGTGG	HindIII
HHV-8-K03_P5	CCGGAATTCGCATGAAACATAAGGGCAGACGAAACAGCCG	EcoRI
HHV-8-K03_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGGAAGATGAGGATGTTC	BamHI
HHV-8-K04_P5	CCGGAATTCGCGCGAGCAGTGAAGTAAATTGCTGCATC	EcoRI
HHV-8-K04_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGGACACCAAGGG	BamHI
HHV-8-K04.1_P5	TCCCCGCGGGGGGCATAAACCTTTACCGGC	SacII
HHV-8-K04.1_P3	TAATCGGATCCCGCCACCATGTGGAGCATGTGCTG	BamHI
HHV-8-K04.2_P5	TCCCCGCGGTTGAAGCCAGGCGACCAG	SacII
HHV-8-K04.2_P3	TAATCGGATCCCGCCACCATGCAAATTAGCTTTGCCGAAG	BamHI
HHV-8-K05_P5	CCGGAATTCGCACCGTTGTTTTTTGGATGATTTTTCCGCAC	EcoRI
HHV-8-K05_P3	TAATGGATCCCGCCACCATGGCGTCCAAGGACGTAGAAG	BamHI
HHV-8-K06_P5	TCCCCGCGGAGCTATGGCAGGCAGCCGCTGCATCAGC	SacII
HHV-8-K06_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGGCCCCCGTCCACGTTTTATGCTG CG	BamHI
HHV-8-K07_P5	CGCGGATCCCGCCACCATGGGAACACTGGAGATAAAAAG	BamHI
HHV-8-K07_P3	TCCCCGCGGCAACTGGCCTGGAGATTGAATCC	SacII
HHV-8-K08_P5	CGCGGATCCCGCCACCATGCCAGAATGAAGGACATAC	BamHI
HHV-8-K08_P3	TCCCCGCGGTACCTGCTGCAGCTGTCTTGTGTATGCTTTC	SacII

Name	Sequenz 5' -> 3'	Schnittstelle
HHV-8-K09_P5	TCCCCGCGGTTGCATGGCATCCCATAACGGCTTCG	SacII
HHV-8-K09_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGGACCCAGGCCAAAGAC	BamHI
HHV-8-K10_Seq_P5	GCGAAACCATCATGTTACAATTGG	keine
HHV-8-K10_Seq_P3	CATATATCCTCTCCTTGAAGGTTCC	keine
HHV-8-K10_P5	TCCCCGCGGATGTAGACTATCCCAAATGGAGCC	SacII
HHV-8-K10_P3	TAATGGATCCCGCCACCATGGGGTCCTCTGGGACGC	BamHI
HHV-8-K10.7_P5	TCCCCGCGGCCTTGGTCTTCTCCGATGCTTCTCGAGCCGTAC AC	SacII
HHV-8-K10.7_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGGCGGGACGCAGGCTTAC	BamHI
HHV-8-K11_P5	TCCCCGCGGGTCTCTGTGGTAAATGGGGCAAGG	SacII
HHV-8-K11_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGCACAGTTTGTTTTTTGAAG	BamHI
HHV-8-K11.1_P5	TCCCCGCGGCCTCTGGGCTTTTTTCTAAGGCTCCTTCTAAGT GCC	SacII
HHV-8-K11.1_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGCCTCGCTACACGGAGTC	BamHI
HHV-8-K12_A_P5	TCCCCGCGGGTGCGCGCCCGTTGCAACTC	SacII
HHV-8-K12_A_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGGATAGAGGCTTAACGGTGTTTGT G	BamHI
HHV-8-K13_P5	TCCCCGCGGTGGTGTATGGCGATAGTGTGGGAGTGTGATG	SacII
HHV-8-K13_P3	CGCGGATCCCGCCACCATGGCCACTTACGAGGTTCTCTG	BamHI
HHV-8-K15_3AG_P5	CGGGATCCCGCCACCATGAAGACACACATATTCTTCTGGAATT TATGG	BamHI
HHV-8-K15_3AG_P3	CGGAATTCCTGCTCCTGCTCCTGCGTTCCTGGGAAATAAAA CCTC	EcoRI
HHV-8-K15_STOP_P5	CGGGATCCCGCCACCATGAAGACACACATATTCTTC	BamHI
HHV-8-K15_STOP_P3	CGGAATTCCTAGTTCCTGGGAAATAAACCTCCTCATACAGGT CG	EcoRI
HHV-8-K15_P5	CGGGATCCCGCCACCATGAAGACACACATATTCTTC	BamHI
HHV-8-K15_P3	CGGAATTCGCGTTCCTGGGAAATAAACCTCCTCATACAG	EcoRI

### 3.1.7 Biologische Materialien

#### 3.1.7.1 Bakterienstämme

Name	Herkunft	Gentypisierung
XL1-blue	Stratagene	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI<sup>q</sup> ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>

### 3.1.7.2 Eukaryotische Zelllinien

Name	Herkunft	ATCC Nummer
BC-1	ATCC	CRL-2230
BCP-1/BCBL-1	ATCC	CRL-2294
HEK293T	ATCC	CRL-11268
HEK293	ATCC	CRL-1573
HeLa	ATCC	CCL-2
SaOs-2	ATCC	HTB-85

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Allgemeine Puffer, Lösungen und Medien

(Luria Bertani) LB-Medium:

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub>

Die Lösung wurde nach dem Mischen autoklaviert.

LB-Agar:

LB-Medium wurde zusätzlich mit 12 g Bacto-Agar versetzt.

Zur Selektion plasmidtragender *E.coli*-Kulturen wurde dem LB-Medium/-Agar Ampicillin oder Kanamycin zugefügt.

Ampicillin: 100 µg/ml Endkonzentration

Kanamycin: 35 µg/ml Endkonzentration

10x PBS:

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub>

Die Lösung wurde nach dem Mischen autoklaviert.

TE-Puffer:

1 M Tris/HCl (pH=8.0) 10 ml

0,5 M EDTA 2 ml

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub>

### 3.2.2 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Zelllinien (siehe Tabelle) wurden generell bei 5 % CO<sub>2</sub>, 37°C und in gesättigter Luftfeuchte kultiviert. Die verwendete Medienzusammensetzung ist für jede Zelllinie in der Tabelle aufgeführt.

Zelllinie	Medium	FKS-Zusatz	adhärent	andere Zusätze
HEK293T	DMEM, (Hochglukose)	10 %	ja	2 mM L-Glutamine, 100 U penicillin/streptomycin
HEK293	DMEM, (Hochglukose)	10 %	ja	2 mM L-Glutamine, 100 U penicillin/streptomycin
HeLa	DMEM, (Hochglukose)	15 %	ja	2 mM L-Glutamine, 100 U penicillin/streptomycin
BCBL-1	RPMI (Hochglukose)	20 %	nein	2 mM L-Glutamine, 100 U penicillin/streptomycin
BC-1	RPMI (Hochglukose)	20 %	nein	2 mM L-Glutamine, 100 U penicillin/streptomycin
SaOS-2	DMEM, (Hochglukose)	20 %	ja	2 mM L-Glutamine, 100 U penicillin/streptomycin

Die adhärent wachsenden Zellen wurden spätestens ab einer Konfluenz von 80% ausgedünnt. Dazu wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, das PBS vollständig entfernt und mit 500 µl TE bis zum Ablösen der Zellen überschichtet. Die abgelösten Zellen wurden mit der Zelllinie entsprechenden Zellkulturmedium aufgenommen und verdünnt neu ausgesät. Nicht adhärent wachsenden Zellen wurden spätestens ab 10<sup>6</sup> Zellen pro ml durch Aufteilen in neues Zellkulturmedium verdünnt.

### 3.2.2.2 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Zur Kryokonservierung wurden  $5 \times 10^6$  Zellen geerntet und in 1 ml Einfriermedium (siehe Tabelle) in Kryoröhrchen portioniert und bei  $-80^\circ\text{C}$  in einem Kryogefäß abgekühlt. Für die Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen durch flüssigen Stickstoff gekühlt bei  $-196^\circ\text{C}$  gelagert. Zum Wiederverwenden der Zellen wurden diese bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und in Zellkulturmedium transferiert. Nach dem Absiedeln der Zellen wurde das Zellkulturmedium gegen frisches ersetzt.

Zelllinie	Medium	FKS-Zusatz	DMSO
HEK293T	DMEM, (Hochglukose)	20 %	10 %
HEK293	DMEM, (Hochglukose)	20 %	10 %
HeLa	DMEM, (Hochglukose)	20 %	10 %
BCBL-1	RPMI, (Hochglukose)	30 %	10 %
BC-1	RPMI, (Hochglukose)	30 %	10 %
SaOS-2	DMEM, (Hochglukose)	20 %	5 %

### 3.2.2.3 Transiente Transfektion von adhärennten eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden mit den in der Tabelle angegebenen Zelldichten und Transfektionsvolumen ca. 12 h vor der Transfektion ausgesät. Für die Transfektion wurde die in der Tabelle aufgeführte DNA-Menge, den Herstellerangaben nach, mit Transfektionspuffer verdünnt und mit einem DNA zu Effectene Verhältniss von 1:10 ( $\mu\text{g DNA} : \mu\text{l Transfektionsmittel}$ ) gevortext. Nach der Bildung der Transfektionskomplexe wurde der Transfektionsansatz mit 1/3 des Transfektionsvolumens mit Zellkulturmedium aufgefüllt, auf die Zellen transferiert und für 48 h inkubiert.

Bei HeLa- und SaOS-2-Zellen wurde 4 h nach der Zugabe des Transfektionsansatzes auf die Zellen das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und neues vorgewärmtes Vollmedium dazugegeben.

Zelllinie	Gefäß	Zelldichte pro Vertiefung	DNA-Menge	Transfektionsvolumen
HEK293T/HEK293	6 Lochplatte	$1 \times 10^6$	1,25 µg	2 ml
	12 Lochplatte	$5 \times 10^5$	0,5 µg	1 ml
	24 Lochplatte	$2 \times 10^5$	0,3 µg	0,5 ml
	Chamber Slides	$10^4$	0,15 µg	0,5 ml
HeLa/SaOS-2	6 Lochplatte	$2 \times 10^5$	1,25 µg	2 ml
	12 Lochplatte	$4 \times 10^4$	0,5 µg	1 ml
	Chamber Slides	$5 \times 10^3$	0,15 µg	0,3 ml

### 3.2.2.4 Assay für die Induktionssaktivierung von Transkriptionsfaktoren

HEK293T-Zellen wurden für die Analyse der Signalwegsaktivierung Ko- oder Tripletransfiziert. Für den Assay wurden 12er oder 24er Lochplatten verwendet. Die Aufteilung der totalen DNA Menge für die Ko- und Tripletransfektion ist in der Tabelle aufgeführt.

Transfektion	Lochplattengröße	Totale DNA Menge	Reporterplasmid	Expressionsplasmid
doppel	12	0,5 µg	0,25 µg	0,25 µg
	24	0,3 µg	0,15 µg	0,15 µg
triple	12	0,5 µg	0,1 µg	je 2x 0,2 µg

Die Zellen wurden wie beschrieben transient transfiziert und 48 h inkubiert. Anschließend wurde die signalwegsabhängige Expression des GFP143 Reportergens durch dessen Fluoreszenz mit Hilfe des Thermo Ascent CF Fluoreszenzlesers ( $E_m=485$  nm /  $E_x=527$  nm) gemessen.

### 3.2.2.5 Assay zur Messung der Depolarisierung des mitochondrialen Potenzials

Transfizierte HEK293-Zellen wurden kurz zentrifugiert und das Altmedium gegen phenolrotloses Medium mit JC-1 (1x) ersetzt. Nach 20 min Inkubation wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des Thermo Ascent CF Fluoreszenzlesers ( $E_m=544$  nm /  $E_x=590$  nm) gemessen.

Ein Fluoreszenzsignal bedeutet, dass der JC-1 Farbstoff aggregieren kann und das mitochondriale Potenzial intakt ist.

### **3.2.2.6 Immunzytochemie**

Den in Chamber Slides gewachsenen Zellen wurde das Medium entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 4 % PFA + 2 % Sucrose in PBS (pH=7.2) für 10 min fixiert, anschließend mit 0,5 % Triton in PBS für 5 min permeabilisiert und zweimal mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung wurde für 1 h mit 10 % FKS in PBS geblockt und die Zellen mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle für Verdünnungen) mit 5 % FKS über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper entfernt, zweimal mit PBS gewaschen und der Sekundärantikörper mit 5 % FKS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Sekundärantikörper entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit der DAPI Färbelösung (1 µg/ml) für 1 min inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und die Objektträger mit Glycerol/PBS (50 % / 50 %) eingedeckelt und mit Hilfe von Essence „fast&last“ Nagellack versiegelt. Für eine zusätzliche Aktinfärbung konnte mit Phalloidintoxin vor der DAPI Färbung mit 5 µl Stocklösung (6,6 µM) in 200 µl PBS für 25 min inkubiert werden.

### **3.2.2.7 Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen**

#### **3.2.2.7.1 Zellkulturaufnahmen**

Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe des Axiovert-25 Mikroskopes (Zeiss) mit HBO50/ac Option und einer MCD-Lens-Adapter verbundenen Coolpix-995 Digitalkamera (Nikon) gemacht. Es wurden die CP-Achromat 10x/0,25 Ph1Var1 und LD A-Plan 32x/0,40 Ph1/Var1 Objektive verwendet und zusätzlich für Fluoreszenzaufnahmen das Em=470 nm / Ex=530 Filterpaar.

#### **3.2.2.7.2 Immunzytochemieaufnahmen**

Für Fluoreszenzaufnahmen von Einzelzellen wurde das IX81 Mikroskop (Olympus) mit U-LH100HG Option und der F-view (SIS) Digitalkamera benutzt. Es wurde das Uplan Apo 20x/0,80 Öl Objektiv mit den Em=345 nm / Ex=455 nm (DAPI), Em=495 nm / Ex=519 nm (Alexa488) und Em=578 nm / Ex=599 nm (Alexa568) Filterpaaren verwendet.

### **3.2.2.8 Proteinzellextrakt (RIPA-Puffer-Extrakt)**

RIPA-Puffer-Lösung:

RIPA-Buffer R0278 (Sigma), versetzt mit einer "protease inhibitor complete" Tablette (Roche) pro 10 ml Volumen.

Für den Proteinzellextrakt mit dem Radio-Immuno-Precipitation Assay (RIPA)-Puffer wurden die Zellen von 6er Lochplatten geerntet. Dazu wurden die Platten auf Eis gestellt, das Medium entfernt und mit 150 µl TE überschichtet. Die abgelösten Zellen wurden in 1 ml 4°C Vollmedium aufgenommen, in ein 1,5 ml ERG übertragen und bei 1200 rpm 4°C für 3 min zentrifugiert. Das Medium wurde danach entfernt, die Zellen resuspendiert, mit 4°C PBS gewaschen und bei 1200 rpm 4°C für 3 min zentrifugiert. Nach nochmaligem Wiederholen des Waschschrilles wurde das PBS entfernt, das Zellpellet resuspendiert, mit 150 µl RIPA-Puffer überschichtet, sanft angemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Lösung bei 4°C, 15000 rpm für 45 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml ERG übertragen. Der Proteinextrakt wurde bei -80°C gelagert. Für die Herstellung von Proteinzellextrakt von Suspensionszellen wurden  $4 \times 10^6$  Zellen pro Extraktion und das selbe Protokoll verwendet.

### **3.2.2.9 Zellzahluntersuchung mit eukaryotischen Zellen**

#### **3.2.2.9.1 Adhärente Zellen**

Für die Zellzahluntersuchung von adhärennten Zellen wurden diese in 6er Lochplatten ausgesät. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 300 µl TE überschichtet. Die abgelösten Zellen wurden in 1,2 ml Vollmedium aufgenommen und in ein 2 ml ERG übertragen. Zusätzlich wurden diese mit 0,3 ml einer 0,4 % Trypanblau Stocklösung für 15 Min inkubiert und anschließend mit Hilfe einer Neubauerzählkammer die Anzahl der blau gefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl ermittelt.

#### **3.2.2.9.2 Suspensionszellen**

Für die Zellzahluntersuchung von Suspensionszellen wurden diese aufgeschüttelt und direkt mit Hilfe einer Neubauerzählkammer deren Anzahl ermittelt.

### 3.2.3 DNA-Technologie

#### 3.2.3.1 Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung wurden LB-Übernachtskulturen mit Hilfe von Einzelkolonien angeimpft. Alle LB-Medien wurden mit dem Antibiotika versetzt, das mit der Resistenzkassette des zu vermehrenden Plasmids korrespondierte. Die Plasmid tragenden Bakterien wurden durch Zentrifugieren bei 6000 rpm pelletiert und mit Hilfe des *Qiaprep Spin Miniprep-Kits* oder *Qiaprep Endofree Maxiprep-Kits* die Plasmid-DNA den Herstellerangaben nach isoliert. Die Plasmid-DNA die für die Arraytransfektion und die transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen verwendet werden sollte, wurde auf eine 1 µg/µl Stocklösung eingestellt.

#### 3.2.3.2 PCR

##### 3.2.3.2.1 PCR für die Plasmidklonierung

In der Polymerase Kettenreaktion (PCR) für gentechnische Arbeiten wurden die “proof reading” *Pfx* Polymerase (Invitrogen) mit dem beiliegenden PCR-Puffer verwendet. Dazu wurden die korrespondierenden Primerpaare in den angegebenen Standardansatz zugefügt.

Template	250 ng genomische DNA oder 50 ng Plasmid DNA
Pfx-Polymerase	1 Einheit
Puffer (10x)	5 µl
Primer P5	10 pmol
Primer P3	10 pmol
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
dNTP	1 mM
ad H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> 50 µl	

Die Amplifizierungsreaktion wurde nach folgendem Schema in einem PCR-Cycler durchgeführt.

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
Denaturierung und Aktivierung	5 Min	94°C	1x
Denaturierung	30 s	94°C	30x
Hybridisierung	30 s	50-65°C	
Synthese	pro 1 kb Fragmentlänge 60 s	68°C	
Endsynthese	10 Min	68°C	1x

Das Ergebnis wurde durch das Laufverhalten der Fragmente in einem Agarosegel überprüft.

### 3.2.3.2.1 PCR für den Nachweis von cDNA-Fragmenten

In der Polymerase Kettenreaktion (PCR) für den Nachweis von cDNA-Fragmenten wurden die *Taq* FirePol (Solis) mit dem beiliegenden PCR-Puffer verwendet. Dazu wurden die korrespondierenden Primerpaare in den angegebenen Standardansatz zugefügt.

Template	0,1 µg cDNA
Taq FirePol	1,5 Einheiten
Puffer (10x)	5 µl
Primer P5	10 pmol
Primer P3	10 pmol
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
dNTP	1 mM
ad H <sub>2</sub> O <sub>MiliQ</sub>	50 µl

Die Amplifizierungsreaktion wurde nach folgendem Schema in einem PCR-Cycler durchgeführt.

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
Denaturierung und Aktivierung	20 Min	94°C	1x
Hybridisierung	30 s	55°C	30x
Synthese	pro 1 kb Fragmentlänge 60 s	72°C	
Endsynthese	10 Min	72°C	1x

Das Ergebnis wurde durch das Laufverhalten der Fragmente in einem Agarosegel überprüft.

### 3.2.3.3 Reinigung von PCR Fragmenten

Zum Entfernen von Enzymen, Nukleotiden oder Primern aus einem PCR-Ansatz und zum Umpuffern wurde der *PCR Purification Kit* (Qiagen) den Herstellerangaben nach benutzt.

### 3.2.3.4 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des Shimadzu UV-160 UV-Vis-NIR Spectrophotometers bestimmt. Dazu wurden die Proben 1:100 verdünnt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Aus dem Absorptionswert wurde nach Herstellerangaben die Nukleinsäurenkonzentration errechnet. Zusätzlich wurde aus dem  $A=260/A=280$  Quotienten die Reinheit der DNA- oder RNA-Präparation abgeschätzt. DNA mit einem Quotienten größer als 1,8 und RNA größer als 2,0 wurden weiter verwendet.

### 3.2.3.5 Enzymatische Spaltung von DNA-Molekülen

Das präperative Spalten wird für gentechnische Arbeiten eingesetzt und bedingt einen möglichst quantitativen und qualitativen Umsatz. Im Gegensatz dient das analytischen Spalten lediglich der Überprüfung durch einen limitierten qualitativen Umsatz.

#### 3.2.3.5.1 Präperativ

Für das präperative Spalten von DNA-Molekülen wurden die Restriktionsendonukleasen mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer im Standardansatz verwendet.

DNA-Menge	X µg
Restriktionsendonuklease	pro 1 µg DNA 2 Einheiten
Puffer (10x)	x 10
BSA (100x)	x 100
ad H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> X µl	pro 1 µg DNA 20 µl Reaktionsvolumen

Die Inkubation erfolgte bei der für die Restriktionsendonuklease angegebenen optimalen Temperatur für 5 h oder über Nacht. Das Ergebnis durch das Laufverhalten der Fragmente in einem Agarosegel überprüft.

### 3.2.3.5.2 Analytisch

Das analytische Spalten von DNA-Molekülen entsprach dem präoperativen Standardansatz mit auf 0,5 Einheiten reduzierter Enzymmenge pro µg DNA und einem um die Hälfte reduziertem Reaktionsvolumen. Das Ergebnis durch das Laufverhalten der Fragmente in einem Agarosegel überprüft.

### 3.2.3.6 Dephosphorylierung von DNA-Molekülen

Zur Dephosphorylierung von enzymatisch gespaltenen Plasmiden wurde die *Shrimp Alkaline Phosphatase* im angegebenen Standardansatz mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

DNA-Menge	X µg
Shrimp Alkaline Phosphatase	pro 1 µg DNA 1 Einheit
Puffer (10x)	x 10
ad H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> X µl	pro 1 µg DNA 15 µl Reaktionsvolumen

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 3 h.

### 3.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose Gelelektrophorese verwendet. Dazu wurde 1 % Agarose für die Trennung von Fragmenten zwischen 0,5 bis 10 kb und 3% für Fragmente kleiner als 0,5 kb verwendet. Der TAE-Puffer wurde mit der Agarose vermischt und in der Mikrowelle langsam bis zum kompletten Auflösen der Agarose aufgekocht. Die Lösung wurde um das verdampfte Wasser wieder aufgefüllt und kurz bis vor das Gelieren abgekühlt. Es wurde pro 100 ml Agaroselösung 0,5 µl Ethidium Bromid Stammlösung zugegeben, homogen vermischt und in die Gießkammer mit Geltascheneinsätzen gegossen. Nach dem Gelieren wurde das Agarosegel in die Laufkammer überführt, mit TAE Puffer vollständig überschichtet und die Geltascheneinsätze entfernt. Es wurden die DNA-Fragmente mit Auftragspuffer versehen, in die Geltaschen aufgetragen und bis zum gewünschten Trenneffekt 5-10 Volt/ cm Spannung angelegt. Danach wurden das Gel unter UV-Licht dokumentiert.

TAE Puffer (50x):

Tris	2,0 M
Eisessig	1,0 M
EDTA	0,1 M
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	

DNA Auftragspuffer (6x):

Sucrose	40 %
Bromphenolblau	0,25 %
Xylen-Cyanol	0,25 %

### 3.2.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um bestimmte durch die Agarosegelelektrophorese aufgetrennte Fragmente zu isolieren, wurden diese aus dem Agarosegel unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und der Gelblock in ein 2 ml ERG transferiert. Zum Herauslösen wurde der *QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit* den Herstellerangaben nach verwendet. Zur Elution wurden entgegen den Herstellerangaben 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> verwendet.

### 3.2.3.9 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden vom Inhausservice am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF) durch Herrn U. Linzner (Bio DV, GSF) hergestellt.

### 3.2.3.10 Ligation von DNA-Molekülen

Für das Zusammenfügen von DNA-Fragmenten wurde der *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) den Herstellerangaben nach angesetzt. Dafür wurden 150 ng PCR-Amplifikate oder synthetische Oligonukleotide und 50 ng Zielploid mit zueinander kompatiblen Enden in der Ligrationsreaktion verwendet. Es wurde entgegen den Herstellerangaben für 2 h bei RT inkubiert.

### 3.2.3.11 Transformation von Bakterien mit Plasmiden

Zur Transformation wurden chemisch kompetente XL1 Blue Bakterien (Stratagene) dem Herstellerprotokoll folgend verwendet. Zur Retransformation von Plasmiden wurden 20 µl kompetente Bakterien und zur Transformation von ligierten Plasmiden 50 µl verwendet. Die Reagenzienmengen wurden an das Volumen der kompetenten Bakterien angepaßt und sind in der Tabelle aufgeführt.

Reagenzien	zur Retransformation	zur Transformation
XL1 Blue kompetente Bakterien	20 µl	50 µl
β-Mercaptoethanol	0,3 µl	0,85 µl
Plasmid-DNA	20 ng	100 ng
SOC-Medium	300 µl	450 µl

Die transformierten Bakterien wurden entsprechend der Resistenzkassette des zu vermehrenden Plasmids auf Antibiotika enthaltene LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den Agarplatten wurden Einzelklone durch Ausstechen der Kolonien und Anzucht in LB-Medium hergestellt.

SOC-Medium:

Hefeextrakt	0,5 g
Trypton	2,0 g
MgCl <sub>2</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	

Nach dem Sterilisieren wurde 1 ml einer 2 M steril-filtrierten Glukoselösung zugesetzt.

### 3.2.3.12 Langzeitkonservierung von Bakterienkulturen

Für die Langzeitkonservierung wurden 700 µl der LB-Bakterienkulturen entnommen, mit 300 µl sterilem Glycerin versetzt und homogenisiert. Anschließend wurden die Aliquots bei -80°C gelagert.

### 3.2.3.13 Ortsgerichtete Mutagenese

Für die ortsgerechte Mutagenese zum Erzeugen der HHV-8 $tk$ - $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT wurde der *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) verwendet. Dazu wurden 100 ng S1 (5'-GGGTAATGGGTGTG**GCC**AAATC-AACGCTGGTCAAC-3') und S4 (5'-CCCCAGCAGTGGTGGT**CCC**TCTCATGCACC-3') Oligonukleotide in einem Reaktionsansatz zugegeben und dem Herstellerprotokoll, für Plasmide länger als 5 kb, folgend verfahren. Für die Vermehrung und Selektion wurden 50 µl XL-1 Blue chemisch kompetente Bakterien mit 3 µl des Reaktionsansatzes transformiert. Die aus Einzelklonen isolierten Plasmide wurden sequenziert.

### 3.2.3.14 Präparation von genomischer DNA

Zur Präparation von genomischer DNA wurden 10<sup>6</sup> BCBL-1- oder BC-1-Zellen geerntet und der *Wizard®SV Genomic DNA Purification System Kit* (Promega) den Herstellerangaben nach verwendet. Es wurde mit 250 µl H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> eluiert und die genomische DNA bei -80°C gelagert.

### **3.2.4 RNA-Technologie**

#### **3.2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA**

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurden  $10^6$  BCBL-1-Zellen geerntet und das *SV Total RNA Isolation System* (Promega) den Herstellerangaben nach verwendet. Es wurde mit 35  $\mu$ l  $H_2O_{MilliQ}$  eluiert und die RNA bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **3.2.4.2 cDNA Synthese**

Die cDNA wurde durch Einsatz von 1  $\mu$ g Gesamt-RNA mit Hilfe des *First Strand cDNA Synthesis Kit* (MBI Fermentas) synthetisiert. Es wurde das Herstellerprotokoll unverändert verwendet. Für die nachfolgende PCR zum Nachweisen von cDNA-Fragmenten wurde 1  $\mu$ l des cDNA-Ansatzes verwendet. Dies entspricht ca. 0,1  $\mu$ g revers umgeschriebener total RNA.

### **3.2.5 Protein-Technologie**

#### **3.2.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das *DC Protein Assay System* (BioRad) wie vom Hersteller angegeben in 96er Lochplatten mit flachem Boden verwendet. Die Absorptionsmessung wurde bei 750 nm im 3550-UV Microplate Reader (BioRad) mit der Referenzwellenlänge von 570 nm durchgeführt.

#### **3.2.5.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen**

##### **3.2.5.2.1 Diskontinuierliche SDS-Page**

Für die SDS-Page wurde das Trenngel je nach erforderlicher Auftrennungsleistung wie in der Tabelle angegeben zusammengesetzt, in den Gießstand überführt und Platz für das Sammelgel lassend, mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren der acrylamidhaltigen Lösung wurde das Isopropanol restlos entfernt und mit  $H_2O_{MilliQ}$  gespült. Es folgte das Eingießen des nach den Angaben in der Tabelle gemischten Sammelgels und anschließendes Einsetzen der Geltaschenkämme.

Geltyp	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
Finale Acrylamidmix-konzentration in Prozent	10 %	12 %	15 %	5 %
30 % Acrylamidmix (29:1)	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml	0,33 ml
H <sub>2</sub> O <sub>MiliQ</sub>	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml	1,4 ml
1,5 M Tris pH 8.8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
1,0 M Tris pH 6.8	-	-	-	0,25 ml
10% SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
10% APS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml

Nach dem Polymerisieren des Sammelgeles und dem Entfernen der Geltaschenkämme wurden die SDS-PAGE-Gele aus dem Gießstand in die Laufkammer überführt. Die Proteinproben wurden mit 2x SDS-Probenpuffer (BioRad) bei 100°C für 3 Min denaturiert und in die Geltaschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel in 1x Tris/Glycin SDS-Laufpuffer (BioRad).

### 3.2.5.2.2 NuPage

Als Alternative zu den SDS-Page Gelen wurden NuPage-Gele (Invitrogen) mit dem MOPS-Laufpuffer (Invitrogen) den Herstellerangaben nach verwendet. Nach dem Einsetzen in die Laufkammer wurden die Geltaschenkämme entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült. Die Proteinproben wurden mit 2x SDS-Probenpuffer (BioRad) bei 100°C für 3 Min denaturiert und in die Geltaschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte den Herstellerangaben folgend bei konstanter Voltzahl.

### 3.2.5.3 Elektroblothen von Proteinen

Die durch SDS-PAGE oder NuPage aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der Tankblotapparatur (Amersham Pharmacia) auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Gele wurden freigelegt, das Gel ohne Einschlüsse auf die Membran gelegt mit jeweils 2 lauffuffergetränkten Whatmanpapieren umschichtet und in den Tankblot eingesetzt. Die

Proteine wurde bei festgelegten 250 mA für 2 h auf die PVDF-Membran elektrotransferiert. Dabei wurde die Apparatur durch ständiges Rühren des Laufpuffers gleichmäßig temperiert.

#### 3.2.5.4 Westernblot

Die aufgetrennten und kovalent auf eine Membran gebundenen Proteine wurden mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Dafür wurde die Membran bei 4°C über Nacht oder für 1-2 h bei RT mit 1x Blocklösung (Roche) in PBS ruhend blockiert. Danach wurde die Blocklösung entfernt, dreimal mit 1x PBS unter Schwenken für jeweils 10 Min gewaschen und mit dem Primärantikörper, gelöst in PBS, mit 0,5x Blocklösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Primärantikörperlösung entfernt, dreimalig mit 1x PBS für 10 Min gewaschen und mit dem Sekundärantikörper, gelöst in PBS, mit 0,5x Blocklösung 1 h bei RT inkubiert. Fortführend wurde die Sekundärantikörperlösung entfernt und vier Mal mit 1x PBS für 10 Min gewaschen. Die Membran wurde mit dem *ECL Detection System* (Amersham) den Herstellerangaben nach behandelt, in eine Belichtungskammer zwischen zwei Folien fixiert und einem ECL-Röntgenfilm exponiert.

#### 3.2.5.5 (Polyacrylnitril)-Chromatografie-Affinitätskinetik-Elektrophorese

Die (PAN)-CAKE wurde unter Verwendung des aufgeführten Standardansatz durchgeführt.

NaHCO <sub>3</sub>	7,5 g
α(1-4)Amylose/ α(1-4)-α(1-6) Amylopektin 26%/74%	175 g
Saccharose	20 g
NaCl	0,5 g
Ovum-Lösung (steril)	1 Einheit
Triglyzerin [IZ~130]	10 ml
Milchpulverlösung in H <sub>2</sub> O (1x)	250 ml

25 ml der homogenisierten Lösung wurden mit Hilfe eines Polytetrafluorethylen (PTFE) beschichteten Aluminiumtiegels auf Stufe "6" des Elektroheizgerätes bis zur Stabilisierung der Masse und dem beidseitigen halbmaximalen ( $T_{\max=50}$ ) Ablaufen der Maillard-Reaktion inkubiert. Anschließend wird das Produkt der Tiegelreaktion mit einer konzentrierten Lösung aus *acer saccharum* sättigend überschichtet.

### **3.2.6 Array-Technologie**

#### **3.2.6.1 Herstellung des Glaspins**

Zum Herstellen der Glaspins wurden Kapillarröhrchen (Hirschmann) mit einem Durchmesser von 1,55 mm benutzt. Der zu ersetzende Stahlpin hat einen Durchmesser von 1,5 mm. Es wurden Kapillarröhrchen herausgesucht, die ohne Hängen zu bleiben durch die Bohrungen des Druckkopf fielen. Diese wurden in ca. 3 cm lange Glasröhrchen geschnitten und mit Hilfe eines Gasbunsenbrenners (GASI – Schütt, maximaler Brennstufe) auf einer Seite eine halbrunde Glasperle geschmolzen. Die auf einer Seite mit einer Glasperle verschlossenen Glasröhrchen wurden überprüft, ob sie ohne Hängen zu bleiben durch die Bohrungen des Druckkopf fielen. Bei den durch passenden Glasröhrchen wurde von der Glasperle aus 2,4 cm danach eine Markierung gesetzt. Oberhalb der Markierung wurde ein Schaft aus einem 5 cm langem Tesafilm möglichst parallel und dicht umwickelt.

Zur Selektion der Druckfläche wurden die hergestellten Glaspins zu 16er Gruppen in den Druckkopf eingesetzt und mit Hilfe des Arrayroboters Hydrogeldruckpunkte auf unbeschichteten Glasobjektträgern erzeugt. Die Druckpunkte wurden durchgetrocknet und unter einem Phasenkontrastmikroskop auf die Größe und Gleichmäßigkeit der Druckpunkte hin untereinander verglichen. Es wurden die Glaspins weiterverwendet, die in der Lage waren gleichmäßig runde Druckpunkte von 600 µm Durchmesser in Wiederholung zu erzeugen.

#### **3.2.6.2 Erzeugen von Mikroarrays für die Arraytransfektion**

Die Mikroarrays wurden unabhängig von der Transfektionsmethode mit dem gleichen Druckprotokoll erzeugt. Dazu wurde der MicroGrid II Arrayroboter (BioRobotics) benutzt. Da dieser Roboter über keine Umwelteinheit verfügte, konnte weder die Temperatur, noch die Luftfeuchtigkeit im Roboter reguliert werden. Aus diesem Grund wurde entgegen der Druckvorschrift der Erstveröffentlichung nur Einzelpunkte ohne Wiederholung gedruckt, da beim Einsatz von Spaltkapillarpins die Gefahr des Verstopfens bestand. Gedruckt wurde auf kommerzielle Gamma-Amino-Silan-Objektträger (Corning).

##### **3.2.6.2.1 Reinigung der Pins**

Die Stahl oder Glaspins wurden vor jedem Lauf mit Hilfe von Ultraschall gereinigt. Dafür wurde das Ultraschallbad Transsonic T310 mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$  befüllt und der Druckkopf mit

eingehängten Pins auf den Ablagetisch platziert, so dass die Pins bis zur Hälfte ins Wasser tauchten. Es wurde für 10 Min sonifiziert bis die Pins frei von Ablagerungen waren. Anschließend wurden der Druckkopf entnommen und trocken gelassen. Zusätzlich wurden die Glaspins regelmäßig entkalkt. Dazu wurden 500 µl einer 25% Eisessiglösung in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$  in 96 Lochplatten gefüllt und die Glaspins mit der Glasperle vorraus bis zum vollständigen Auflösen der Kalkablagerungen inkubiert. Abschließend wurde der Glaspins zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$  abgespült und die Pins getrocknet.

### **3.2.6.2.2 Reinigung des Roboters**

Der Roboter wurde nach den Vorschriften des Herstellers regelmäßig gereinigt und der Haupttank mit Hilfe von Natriumhypochlorit desinfiziert.

### **3.2.6.2.3 Drucken von Mikroarrays**

Das Steuerprogramm des Roboters wurde gestartet und ein Testlaufprogramm geladen. Das MilliQ-Waschwasser der Hauptwaschstation und das der Wasserbäder wurde vor jedem Drucklauf gewechselt. Anschließend wurden mit Hilfe des Testprogramms die Wasserkreisläufe auf Funktionalität geprüft und durch visuelle Prüfung die Dichtigkeit der Anlage beurteilt. Der Druckkopf wurde mit der gewünschten Anzahl an Pins in den Roboter eingesetzt (maximal 16) und überprüft, ob sich die Pins im Druckkopf frei vertikal bewegen und dabei ohne Hängen zu bleiben in die Ausgangsposition zurückfallen. Die Objektträgerplatte wurde auf Funktionalität durch das Einlegen von Testobjektträgern und korrekte Fixierung der Objektträger überprüft. Es wurde eine leere 384 Quellplatte und ein neuer unbeschichteter Objektträger an der ersten Halteposition für Objektträger in den Roboter eingesetzt, sowie überprüft ob der Wascheinsatz der Hauptwaschstation bündig anliegt. Das Testprogramm wurde gestartet und überprüft ob der Roboter an der Waschstation, der Quellplatte und am Objektträgers die Kalibrierungspunkte korrekt positionierte. Nach Durchlauf wurde das Testprogramm beendet und die leere Quellplatte sowie der Objektträger entfernt. Die Objektträgerplatte wurde an den Auflageflächen der Objektträger mit 70% Ethanol feucht abgewischt, trocken gelassen und die zu bedruckenden Objektträger eingelegt. Es wurde die 384 Quellplatte mit den Drucklösungen eingesetzt, der Roboter geschlossen und das Druckprogramm gestartet. Das nach der

Programmierung der Steuersoftware erzeugte Steuerskript des Druckprogramms ist im Anhang (Tabelle VI a+b) aufgeführt.

Es wurde vier Mal pro Druckvorgang gewaschen, um die Hydrogellösung restlos zu entfernen. Zusätzlich wurde die Amplitude beim Eintauchen der Pins in die Wasserbäder erhöht (1 cm) und die schnellst mögliche vertikale Bewegung des Druckkopfes gewählt, um einen maximalen Wascheffekt zu erzielen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Druckkopf nicht in die Wasserbäder eintauchten oder die maximale Amplitude der Waschwasserbewegung den Druckkopf anfeuchtete. Der Abstand der Druckpunkte zu einander betrug beim 600 µm Glaspin 1,1 mm.

#### 3.2.6.2.4 Reverse-Transfektion

Für die Reverse-Transfektion wurde das veröffentlichte Protokoll mit den erwähnten Anpassungen beim Druckvorgang benutzt (Ziauddin J und Sabatini DM 2001).

Dazu wurde pro Probe der unten aufgeführte Standardansatz der DNA-Hydrogellösung abhängig von der DNA-Konzentration benutzt.

2% Hydrogel Stocklösung	5 µl								
1ug/ul DNA Stocklösung	0,5 µl	1 µl	1,5 µl	2 µl	2,5 µl	3 µl	3,5 µl	4 µl	4,5 µl
DNA-Endkonzentration	0,01 µg/µl	0,02 µg/µl	0,03 µg/µl	0,04 µg/µl	0,05 µg/µl	0,06 µg/µl	0,07 µg/µl	0,08 µg/µl	0,09 µg/µl
H <sub>2</sub> O <sub>MiliQ</sub>	44,5 µl	44 µl	43,5 µl	43 µl	42,5 µl	42 µl	41,5 µl	41 µl	40,5 µl

2 % Hydrogel Stocklösung:

2 % Gelatine (Type B: 225 Bloom (Sigma)) wurden in sterilen H<sub>2</sub>O<sub>MiliQ</sub> bei 60°C im Wasserbad für 15 Min gelöst. Das Hydrogel wird auf 37°C abgekühlt und mit Hilfe eines 0,45 µm Sterilfilters filtriert. Die Lösung wurde zu 2 ml portioniert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Nach dem Zusammenfügen der Hydrogellösung in 1,5 ml ERG wurden diese kurz bei 1000 rpm an zentrifugiert und 45 µl je Probe in eine Vertiefung einer 384 Lochplatte auf den Boden, ohne Luftblasen zu bilden, gegeben. Nach dem Abhandeln der Druckvorbereitungen wurde die Lochplatte in den Roboter eingestellt und der Drucklauf gestartet. Die bedruckten Objektträger wurden möglichst aseptisch aus dem Roboter entnommen und einzeln in 50 ml Falcons bis zur Reverse-Transfektion bei 4°C gelagert.

Die gedruckten Objektträger wurden aus dem 50 ml Falcons entnommen und in 85 mm Zellkulturschalen einzeln platziert. Es wurden CoverWell Abdeckungen auf die Objektträger, ohne die bedruckte Fläche zu beschädigen, geklebt. Die CoverWells bilden ein abgeschlossenes Reservoir um die Transfektionslösung aufzunehmen. Danach wurde die Transfektionslösung eingefüllt, 20 Min inkubiert und diese anschließend wieder entfernt. Es folgte das Abnehmen der CoverWells und Übertragen der transfektionskompetenten Objektträger in 10x10 cm Zellkulturschalen. Diese können drei Objektträger aufnehmen, wobei nicht genutzter Platz durch sterile Leerobjektträger aufgefüllt wurde. Pro 10x10 cm Zellkulturschale wurde eine Portion eines Standardansatz mit  $10^7$  HEK293T-Zellen langsam an einer Ecke der Zellkulturschale, ohne direkt auf die gedruckten Objektträger zu treffen, hinzugefügt. Die 10x10 cm Zellkulturschale wurde möglichst ruhend, in einem Zellkulturschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchte für 2 h inkubiert. Danach wurden die Objektträger einzeln in 85 mm Zellkulturschalen mit vorher eingefüllten 15 ml Vollmedium umgesetzt und für bis zu 44 h bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchte inkubiert.

Standardansatz Transfektionslösung für ein CoverWell:

In ein 1,5 ml ERG wurde zu 150 µl EC-Puffer 10 µl Enhancer zugegeben, gemischt und für 5 Min inkubiert. Danach wurde 25 µl Effectene Transfektionsreagenz zugefügt, für 4 Sekunden gemischt und dies in die CoverWells eingefüllt.

Standardansatz HEK293T-Zellen zum Aussähen in der Reverse-Transfektion:

HEK293T-Zellen mit höchstens 80 % Konfluenz wurden 2x mit PBS gewaschen, das PBS vollständig entfernt und mit 4°C TE bis zum Ablösen der Zellen überschichtet. Die abgelösten

Zellen wurden mit Vollmedium aufgenommen, resuspendiert und in ein 50 ml Falcon überführt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ermittelt. Für eine 10x10 cm Zellkulturschale wurden  $10^7$  HEK293T-Zellen in ein 50 ml Falcon gegeben und auf 40 ml mit 37°C vorgewärmten Vollmedium aufgefüllt. Diese Portion konnte bei 37°C 30 Min gelagert werden und sollte alle 10 Minuten, sowie kurz vor der Zugabe auf die transfektionskompetenten Objektträger, kopfüber geschwenkt werden, um die Zellen resuspendiert zu halten.

### 3.2.6.2.5 Lipidtransfektion

In der Lipidtransfektion wird das Transfektionsmittel zusammen mit dem DNA-Hydrogelgemisch auf die Objektträger gedruckt und macht daher eine Behandlung mit dem Transfektionsmittel nach dem Drucken überflüssig (Ziauddin J und Sabatini DM 2001). Die Zellen können nach dem Drucken und Durchtrocknen des Objektträgers direkt auf den dann transfektionskompetenten Objektträger gegeben werden. Für die Lipidtransfektion wurde pro Probe der unten aufgeführte DNA-Standardansatz mit 15 µl Gesamtvolumen in einem 1,5 ml ERG hergestellt.

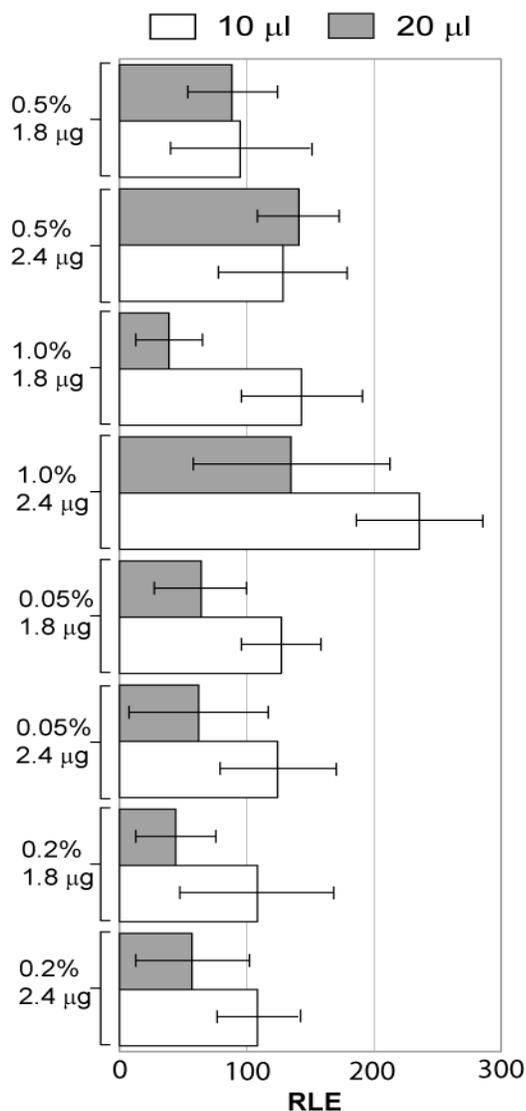
1 µg/µl DNA Stocklösung	1,8 µl	2,4 µl
Ad 15 µl EC (0,3 M Sucrose) Stocklösung	13,2 µl	12,6 µl

EC-Puffer mit 0,3 M Sucrose:

0,3 M Sucrose wurde in EC-Puffer bei RT gelöst, anschließend mit Hilfe eines 0,45 µm Sterilfilters filtriert und zu 10 ml portioniert. Der sterile EC-Puffer mit 0,3 M Sucrose wurde bei 4°C gelagert.

Anschließend wurde 1,5 µl Enhancer dazu gegeben, gemischt und für 5 Min bei RT inkubiert. Danach wurden 5 µl Effectene Transfektionsreagenz hinzugegeben, gemischt und für 10 Min bei RT inkubiert. Abschließend wurde 22 µl Hydrogel mit Stockkonzentrationen von 0,05, 0,2, 0,5 und 1 % dazu gegeben, um Endkonzentrationen von 0,025, 0,1, 0,25 und 0,5 Hydrogel zu erhalten. Dieser Reagenzienmix wurde sanft gemischt, bei 1000 rpm abzentrifugiert und zu

10 oder 20  $\mu\text{l}$  in 384 Lochplatten luftblasenfrei auf den Boden pipettiert. Es wurde die vorher erwähnte Druckmethode verwendet. Die fertig gedruckten Arrays wurden in 10x10 cm Zellkulturschalen gelegt, freie Plätze durch sterile Leerobjektträger aufgefüllt und HEK293T-Zellen wie unter "Reverse-Transfektion" beschrieben direkt hinzugegeben.



Für die Etablierung der Arraytransfektion mit dem 600  $\mu\text{m}$  Glaspin wurde als optimal 2,4  $\mu\text{g}$  DNA mit 1% Hydrogel gedruckt aus 10  $\mu\text{l}$  Quellvolumen ermittelt (siehe rechts).

Etablierung der Arraytransfektion mit dem 600  $\mu\text{m}$  Glaspin in Abhängigkeit von der DNA- und Gelkonzentration sowie des verwendeten Quellvolumens

Zur Etablierung der Arraytransfektion mit dem 600  $\mu\text{m}$  Glaspin wurden 1,8  $\mu\text{g}$  und 2,4  $\mu\text{g}$  DNA eines konstitutiv GFP143 exprimierenden Plasmids pro Druckansatz mit 0,05 %, 0,2%, 0,5% oder 1% Gelstockkonzentration benutzt und entweder aus 20  $\mu\text{l}$  oder 10  $\mu\text{l}$  Quellvolumen gedruckt. 44 h nach dem Aussäen der Zellen wurde die Fluoreszenz ausgelesen und der RLE nach für 10  $\mu\text{l}$  (weiße Balken) oder 20  $\mu\text{l}$  (graue Balken) Quellvolumen dargestellt (Balkendiagramm). Als Ergebnis wurde 1,0% Stockgelkonzentration, 2,4  $\mu\text{g}$  DNA gedruckt aus 20 oder 10  $\mu\text{l}$  Quellvolumen erhalten. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Arrays.

### 3.2.6.3 Quantitative Erfassung der Fluoreszenz von Objektträgern

Für die Erfassung der Fluoreszenz von arraytransfizierten Objektträgern wurden diese mit 4 % PFA + 2 % Sucrose in PBS (pH=7.2) für 10 Min bei RT fixiert, mit Glycerol/PBS (50 % / 50 %) ganzflächig eingedeckelt und die Glasabdeckung mit Nagellack befestigt. Die fixierten

Objektträger wurden kopfüber in die Haltevorrichtung des Fuji FLA-8000 Fluoreszenzlesegerätes eingespannt und bei  $E_m=473$  nm und  $E_x=530$  nm mit der Herstellersoftware die Fluoreszenz ermittelt.

### **3.2.7 Bioinformatik**

#### **3.2.7.1 Vergleichen von Proteinsequenzen**

Die Proteinsequenzen der Thymidinkinasen von HSV-1 (NP\_044624), HSV-2 (BAA23731), Varizella-Zoster-Virus (VZV) (AAT07718), EBV (CAD53451) und HHV-8 (AAB62622) wurden mit Hilfe von ClustalW 1.82 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) verglichen. Als Darstellung wurde das "boxshade" Layout genutzt (<http://bioweb.pasteur.fr/cgi-bin/seqanal/boxshade.pl>).

#### **3.2.7.2 Quantitative Auswertung von Arrayaufnahmen**

Die Fluoreszenzaufnahmen des Arrays wurden mit Hilfe der AIDA Software Version 3.52 (Raysoft) unter Berücksichtigung des Druckschemas ausgewertet. Für die Hintergrundmessung wurde die Methode des lokalen Rings gewählt.

#### **3.2.7.3 Ermittlung von linearen Signalmotiven**

Für die Vorhersage von linearen Signalmotiven, durch Vergleiche zu bekannten Motiven, wurde die 200 Aminosäuren lange N-terminale Proteinsequenz der HHV-8 $tk$  mit Hilfe von [www.elm.eu.org](http://www.elm.eu.org) analysiert (Puntervoll *et al.* 2003).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Die Arraytransfektion als Hochdurchsatzmethode zur Identifizierung transkriptionsaktivierender Gene des Humanen-Herpesvirus-8

Als Hochdurchsatzanalyse soll eine HHV-8-Expressionsbank aller Einzelgene und ein über die Fluoreszenz eines Reportergenes erfassbares modulares Reportersystem etabliert werden. Mit Hilfe der Arraytransfektion, soll die HHV-8-Expressionsbank auf die Induktion der Reporterplasmide systematisch durchsucht werden.

#### 4.1.1 Klonierung der HHV-8-Expressionsbank

Für die Erzeugung der HHV-8-Expressionsbank wurden bereits annotierte HHV-8-Einzelgene (Russo *et al.* 1996, Neipel *et al.* 1997), sogenannte "Open Reading Frames" (ORFs), isoliert und in den kommerziell erhältlichen Expressionsvektor pcDNA4 (Invitrogen), der für einen C-terminalen Myc/His-Tag kodiert, eingesetzt.

Als HHV-8-Virustemplate wurde isolierte genomische DNA aus BCBL-1-Zellen verwendet. BCBL-1 ist eine humane B-Zelllinie, die von einem an dem Primären-Effusionslymphom erkranktem Patienten stammt (Renne *et al.* 1996) und das HHV-8-Genom stabil ins B-Zellgenom integriert hat. Für die PCR-Amplifizierung der HHV-8-ORFs wurden Primer konstruiert, die den zu isolierenden Genabschnitt genau eingrenzten. Vor das viral kodierte Start-ATG wurde ein Teil einer künstlichen Kozak-Konsensussequenz (CGCCACC) gelegt. Die Primer wurden jeweils mit einer Schnittstelle für Restriktionsendonukleasen und einem kurzen Überhang versehen. Das viral kodierte Stop-Kodon wurde nicht verwendet, um dem C-terminalen Tag im Expressionsplasmid nutzen zu können. Der verwendete Expressionsvektor pcDNA4 kodiert für einen kombinierten Myc/His-Tag mit einem sich anschließenden Stop-Kodon. Es wurde darauf geachtet, dass die konstruierten Primer ein Fragment amplifizieren, welches, in den Expressionsvektor eingesetzt, ein Fusionsgen aus HHV-8-Genabschnitt mit C-terminaler Tag-Erweiterung ergibt.

Die Expressionsplasmide wurden sequenziert und vorrangig sequenzidentische Konstrukte und Konstrukte mit Punktmutationen, die keine Änderung in der Aminosäureabfolge ergaben, genutzt. Expressionsplasmide für die nach mehrfachen Klonieren keine sequenzidentischen Konstrukte erzeugt werden konnten, wurden als vorläufige Kandidaten

zur Vervollständigung der Expressionsbank verwendet. Die erzeugten Expressionsplasmide isolierter HHV-8-Gene sind in der Nummerierung der ORFs und Sequenzidentität sortiert aufgelistet. Die Plasmide die durch Dr. M. Bauer und M. Manoharan (Abteilung Molekulare und Experimentelle Chirurgie, Universität Erlangen) kloniert wurden sind aufgeführt (Anhänge, Tabelle I). Die Expressionsbank wurde durch Plasmide anderer Gruppen (Material, 3.1.5.1 HHV-8-Expressionsplasmide externer Herkunft) erweitert. Zusammengenommen ergab dies eine Expressionsbibliothek von 69 Plasmiden mit 64 unterschiedlichen HHV-8-Genen, von denen 62 mit einem C-terminalen Myc/His-Tag versehen sind.

Es konnte keine vollständige Expressionsbank aller Einzelgene von HHV-8 erstellt werden, da für die fehlenden Konstrukte keine nutzbaren PCR-Fragmente erzeugt werden konnten. Die PCR ist bei der hier verwendeten Methode zur Konstruktion der Expressionsplasmide der limitierende Schritt. Unter den fehlenden ORFs befinden sich auch besonders viele lange Gene, wie z.B. das Große Kapsid Protein, kodiert vom 7,4 kb langem ORF 64. Optimierung der PCR oder Veränderung der Klonierungsstrategie können die fehlenden ORFs ergänzen, um die HHV-8-Expressionsbank zu vervollständigen. Die hergestellte Expressionsbank umfasst ca. 70% aller annotierten ORFs von HHV-8.

#### **4.1.2 Expressionsanalyse der HHV-8-Expressionsbank**

Die erzeugten HHV-8-Expressionsplasmide wurden einer Expressionsanalyse unterzogen. Dies ist möglich, da fast alle Konstrukte mit einem C-terminalen Myc/His-Tag versehen wurden. Dabei sollte gezeigt werden, dass durch Überexpression des jeweiligen Expressionsplasmids in Zielzellen ein Protein in der korrespondierenden Größe entsteht. Es wird dann davon ausgegangen, dass es sich bei der beobachteten Überexpression um die Entstehung des auf dem eingebrachten Plasmid kodierten Proteins handelt.

Für die Expressionsanalyse wurden "Human Embryonic Kidney" (HEK)293T-Zellen mit jeweils einem Expressionsplasmid transfiziert, Zellextrakte erstellt und durch PAGE die Proteine ihrem apparenten Laufverhalten nach aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine im PAGE-Gel durch den Westernblot und mit Hilfe der Myc-Sequenz des Myc/His-Kombinationstags die Expression nachgewiesen.

Das Molekulargewicht der Proteine wurde mit Hilfe der Aminosäuresequenz und einem

Programm errechnet (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). Für die zusätzliche Proteinsequenz des Myc/His-Kombitags wurde jeweils 3 kDa hinzu addiert, woraus sich das Gesamtmolekulargewicht ergab (Anhänge, Tabelle II).

Zusammenfassend konnten von 62 Myc/His-getaggten Proteinen 42 mit Hilfe des Westernblots nachgewiesen werden (Anhänge, Tabelle II und Abb. I, II und III). Das entspricht ca. 70 % der Expressionsplasmide aus der HHV-8-Expressionsbank, die ungefähr der Hälfte der annotierten HHV-8-Einzelgene entsprechen.

Zu fast allen Proteinen wurden die vorher berechneten Größen mit korrespondierenden Banden und passendem apparentem Laufverhalten wiedergefunden. Da die gesamte Expressionsbank auf der gleichen Klonierungsstrategie beruht und sich die Mehrheit der Expressionsplasmide als expressionsfähig erwies, wurden auch jene Konstrukte, die sich durch den Westernblot nicht nachweisen ließen, unter Vorbehalt weiterverwendet.

#### 4.1.3 Beschreibung des modular anpassbaren Reportersystems

Das Ziel der Hochdurchsatzanalyse ist es die Induktion von Transkriptionsfaktoren durch HHV-8-Gene zu erfassen. Als Reportersystem dafür wurden Reporterplasmide ausgewählt, die cis-aktive Transkriptionsaktivierungen anzeigen können (Abb. 10).

Bei zusätzlicher Verwendung eines mit Hilfe der Fluoreszenz auslesbaren Reportergens liegt der Vorteil dieses Assaysystems bei einer sehr einfachen Detektion ohne zusätzliche Nachweisschritte.

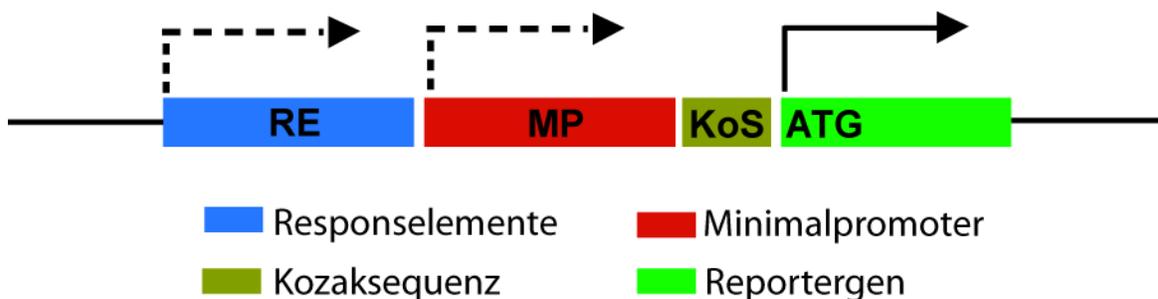


Abb. 10, Schematische Übersicht über die funktionellen cis-aktiven Elemente des Reporterplasmids. Die Elemente sind einzeln beschriftet mit, Responseelement (RE), Minimalpromoter (MP), Kozaksequenz (KoS) und Reporterogen (Start-ATG eingezeichnet). Die Transkriptionsaktivierung (gestrichelte Pfeile) und Translationsaktivierung (schwarzer Pfeil) ist dargestellt.

Dabei wird durch eine Kombination aus einem spezifischen Responseelement (RE) und einem Minimalpromotor (MP), die Transkription der Reporter-gen-mRNA angetrieben. Nach Bildung der mRNA findet die Translation des Reportergens durch deren Initialisierung an der Kozaksequenz und dem Start-ATG statt. Die Expression des Reportergens kann erfasst werden und gibt darüber Auskunft, wie stark die Kombination des Responseelements und des Minimal-Promotors aktiviert wurde. Als Reporter-gen wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP - U55761) gewählt.

Als Fallstudie zur Konstruktion des modularen Reportersystems wurde die NFκB-Transkriptionsaktivierung genutzt, da der molekulare Mechanismus wissenschaftlich gut aufgeklärt ist, die verwendeten HEK293T-Zellen als Modellzellen zur Erforschung von NFκB genutzt werden konnte und ein erprobtes NFκB-Responseelement bekannt ist (pNFκB-d2eGFP; Clontech).

#### **4.1.3.1 Optimierung des NFκB-Reporterplasmids**

Als Ursprungsplasmid wurde das kommerziell erhältliche NFκB-Reporterplasmid pNFκB-d2eGFP (Clontech) mit sechs sich wiederholenden NFκB konsensus Responseelementen (Abb. 10+11 B, blaue Sequenz) und einem TK-Minimalpromoter verwendet. Das ursprünglich d2eGFP wurde durch die stärker fluoreszierende Variante GFP143 (U55761) ersetzt.

Als Initialtest wurde das p(NF-RE)-mpTK-GFP143 Reporterplasmid mit dem Leervektor pCMV als primäre Negativkontrolle, die Expressionsplasmide p65, p50 oder vFLIP in HEK293T-Zellen transfiziert, das resultierende Fluoreszenzsignal des GFP-Reportergens mit Hilfe eines Mikroplatten-Fluorometers ermittelt, der Hintergrund korrigiert und als Diagramm dargestellt.

Es wurden HEK293T-Zellen aufgrund der sehr guten Transfektionseffizienz und relativ hohen Toleranz gegenüber pro-apoptotischen Genen gewählt. Die Toleranz gegen pro-apoptotische Gene ist wichtig, da bei einer Induktion eines zugehörigen Transkriptionsfaktors sich dies über die Induktion des Reportergens noch nachweisen lassen muss und die transfizierten Zellen nicht sofort ohne erkennbares Reportersignal sterben sollten.

Als Positivkontrolle für die Induktion des NFκB-Signalweges fand p65 und HHV-8 vFLIP Verwendung. p65 ist ein der NFκB-Familie zugehöriges Protein mit einer Transaktivierungsdomäne. vFLIP wurde verwendet um zu testen ob sich eine bekannte,

durch ein HHV-8-Gen initialisierte Induktion von NFκB, beobachten lässt. Zusätzlich wurde für die Fallstudien p50 der NFκB-Familie als sekundäre Negativkontrolle benutzt, da dieser Variante die Transaktivierungsdomäne fehlt und keine Induktion erwartet wurde.

A

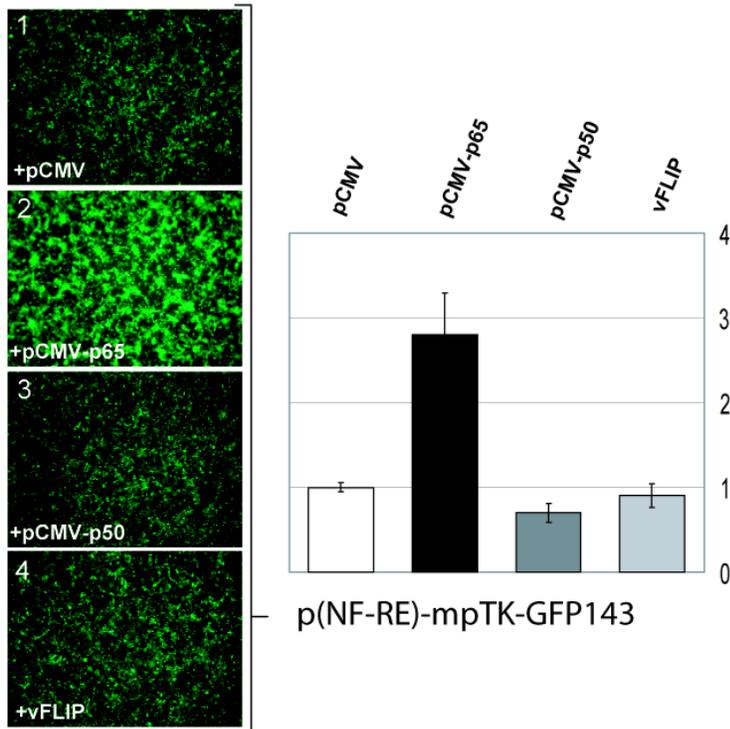
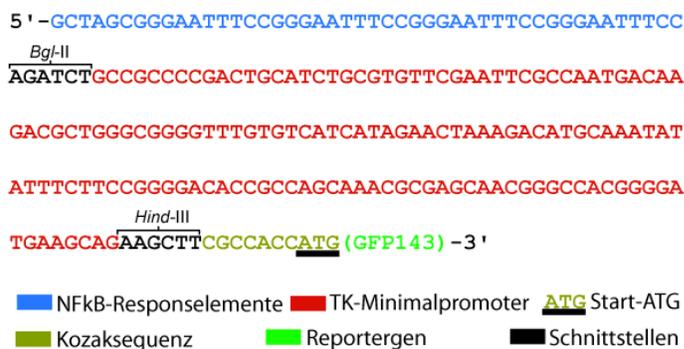


Abb. 11, Das NFκB-Reporterplasmid p(NF-RE)-mpTK-GFP143 ist nur durch p65 induzierbar.

(A) HEK293T-Zellen wurden mit pCMV (weiß), p65 (schwarz), p50 (grau) oder vFLIP (hellgrau) Expressionsvektoren und p(NF-RE)-mpTK-GFP143 in 12er Lochplatten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde das Fluoreszenzsignal des GFP-Reportergens mit Hilfe eines Mikroplatten-Fluorometers ermittelt, der Hintergrundwert korrigiert und der Induktion als Diagramm dargestellt. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Zusätzlich wurden repräsentative Fluoreszenzbilder aufgenommen (1 bis 4).

B



(B) Sequenzübersicht über die signalwegdetektierenden Elemente des Reporterplasmids p(NF-RE)-mpTK-GFP143. NFκB-Responselemente (blau), TK-Minimalpromoter (rot), Kozaksequenz (gelb), Start-ATG des Reportergens (gelb und unterstrichen), Reportergen GFP143 (grün) und Schnittstellen zwischen den Funktionselementen (schwarz) sind dargestellt.

Es konnte zwar die Induktion von NFκB nachgewiesen werden (Abb. 11, Bild 2 und schwarzer Balken), jedoch nur knapp dreifach für die primäre Positivkontrolle p65 im Vergleich zu der pCMV-Leervektor und p50 Negativkontrolle (Abb. 11, Bild 1 und Bild 3, weißer und dunkelgrauer Balken). Darüber hinaus ließ sich für vFLIP keine zusätzliche Aktivierung von NFκB (Bild 4, hellgrauer Balken) im Vergleich zur pCMV-Negativkontrolle

beobachten.

Zur Optimierung wurde der TK-Minimalpromoter durch einen TATA-Minimalpromotor ersetzt. Diese TATA-Minimalpromotersequenz (Abb. 12 B, rote Sequenz) wurde mit Hilfe von vergleichenden Sequenzanalysen der zufällig ausgewählten Minimalpromotoren von AP-1-LUC (Clontech), NFκB-LUC (Clontech), Myc-TA-LUC (Clontech), pNFAT-TA-LUC (Stratagene), pTRE-TA-SEAP (Stratagene), ermittelt (Anhänge, Abb. IV).

#### **4.1.3.2 Das Reporterplasmid p(NF-RE)-mpTATA-GFP143 ist durch die Aktivierung von p65 und vFLIP induzierbar**

Das optimierte p(NF-RE)-mpTATA-GFP143 Reporterplasmid wurde mit dem Leervektor pCMV als primäre Negativkontrolle bzw. mit den Expressionsplasmiden p65, p50 oder vFLIP in HEK293T-Zellen transfiziert, das Fluoreszenzsignal des GFP-Reportergens mit Hilfe eines Mikroplatten-Fluorometers ermittelt, der Hintergrund korrigiert und als Diagramm dargestellt.

Mit dem p(NF-RE)-mpTATA-GFP143 Reporterplasmid konnte die Induktion des NFκB-Signalweges durch p65 gezeigt werden (Abb. 12 A, Bild 2, schwarzer Balken). Dabei wurde die Induktion etwa dreihundertfach höher im Vergleich zur primären Negativkontrolle pCMV (Abb. 14 A, Bild 1, weißer Balken) und p50 (Bild 3, grauer Balken) als sekundäre Negativkontrolle, gemessen. Die Induktion durch vFLIP (Bild 4, hellgrauer Balken) ließ sich ca. zehnfach erhöht gegenüber der primären Negativkontrolle pCMV ermitteln.

Damit konnte gezeigt werden, dass das p(NF-RE)-mpTATA-GFP143 Reporterplasmid, mit dem geänderten TATA-Minimalpromoter eine sehr geringe Basalaktivität aufwies, sich sehr hoch induzieren ließ und durch die Erfassung weniger starker Induktionen, wie die von vFLIP, sehr sensitiv die Transkriptionsaktivierung von NFκB ermittelt werden konnte.



#### 4.1.4.1 Nachweis der Induktion von AP1 über das plasmidkodierte Indikatorsystem p(AP-1-RE)-mpTATA-GFP143

p(AP-1-RE)-mpTATA-GFP143 entstand durch den modularen Austausch der NFκB-Responseelemente durch ein AP-1 spezifisches Responseelement aus dem kommerziellen pAP-1-LUC Vektor (Clontech) (Abb. 13 B, blaue Sequenz). Als Positivkontrolle für die Induktion wurde LMP1 genutzt. Für LMP1 wird die Induktion des NFκB- sowie des AP-1-Signalweges beschrieben (Kieser et al. 1997, McFarland et al. 1999, Mosialos et al. 1995, Devergne et al. 1996, Sandberg et al. 1997, Brodeur et al. 1997, Izumi KM und Kieff ED 1997a, Izumi KM und Kieff ED 1997b, Sylla et al. 1998).

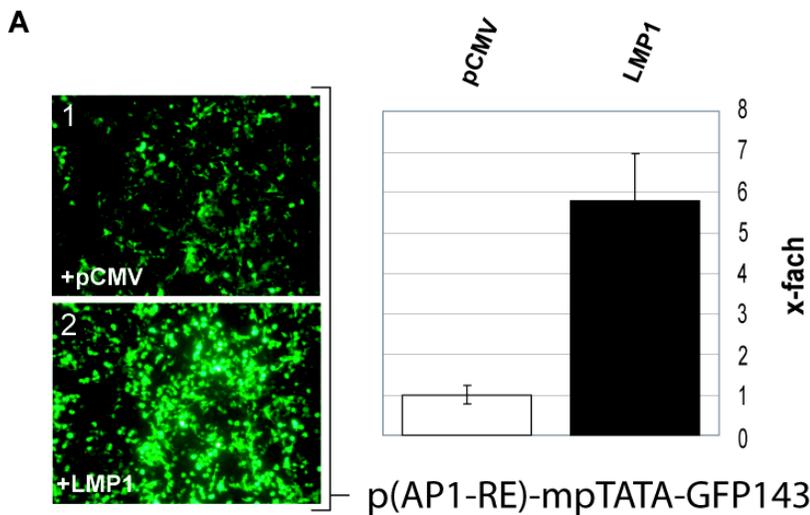
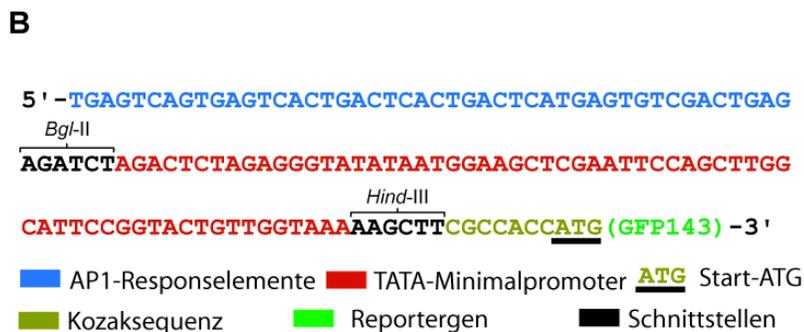


Abb. 13, Das Reporterplasmid p(AP-1-RE)-mpTATA-GFP143 für den Aktivator-Protein-Signalweg ist durch LMP1 induzierbar.

(A) HEK293T-Zellen wurden mit pCMV (weiß) oder LMP1 (schwarz) Expressionsvektoren und p(AP-1-RE)-mpTATA-GFP143 in 12er Lochplatten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde das Fluoreszenzsignal des GFP-Reportergens mit Hilfe eines Mikroplatten-Fluorometers ermittelt, der Hintergrundwert korrigiert und die Induktion als Diagramm dargestellt. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Zusätzlich wurden repräsentative Fluoreszenzbilder aufgenommen (1 und 2).



(B) Sequenzübersicht über die signalwegdetektierenden Elemente des Reporterplasmids p(AP-1-RE)-mpTATA-GFP143. Es sind AP-1-Responselemente (blau), TATA-Minimalpromoter (rot), Kozak-sequenz (gelb), Start-ATG des Reporter-gens (gelb und unterstrichen), Reportergen GFP143 (grün) und Schnittstellen (schwarz) zwischen den Funktionselementen dargestellt.

Als Funktionsdemonstration wurde der pCMV-Leervektor und ein Expressionsvektor für LMP1 zusammen mit dem Reporterplasmid p(AP-1-RE)-mpTATA-GFP143 in HEK293T-Zellen transfiziert, das Fluoreszenzsignal des GFP-Reportergens mit Hilfe des Mikroplatten-Fluorometers gemessen und um den Hintergrund korrigiert als Diagramm dargestellt. Unter Verwendung von p(AP-1-RE)-mpTATA-GFP143 und der Positivkontrolle LMP1 konnte eine ca. sechsfach erhöhte Induktion (Abb. 13 A, Bild 2, schwarzer Balken) gegenüber der Negativkontrolle pCMV (Bild 1, weißer Balken) ermittelt werden. Damit wurde das Reportersystem erfolgreich für AP-1 adaptiert.

#### **4.1.4.2 Nachweis der Induktion von p53 über das plasmidkodierte Indikatorsystem p(p53-RE)-mpTATA-GFP143**

Beim Reporterplasmid p(p53-RE)-mpTATA-GFP143 wurden, wie für das AP-1-Reporterplasmid, die ursprünglichen NFκB-Responseelemente durch spezifische Elemente zur Bindung des p53-Tetramer (Abb. 14 B, blaue Sequenz) aus dem kommerziellen pp53-TA-LUC Vektor (Clontech) ausgetauscht. Als Positivkontrolle für die Induktion wurde ein p53-Expressionsplasmid verwendet (Sonja Bauer, Abteilung Virale Vaskulopathie, Institut für Molekulare Virologie).



#### **4.1.5 Die Umkehrtransfektion als Hochdurchsatz-Transfektionstechnik**

Wie gezeigt ließ sich das modulare Reportersystem sehr einfach durch andere Responseelemente erweitern, um die Aktivierung von NFκB, AP-1 und p53 nachzuweisen. Theoretisch eröffnet sich dadurch die Möglichkeit durch weitere Responseelemente die Aktivierung von sehr vielen Transkriptionsfaktoren und die Induktion verschiedenster Signalwege zu erfassen. Zusätzlich können sich Transkriptionsfaktoren einer Familie in Abhängigkeit von der Aktivierung unterschiedlich zusammensetzen. Zum Beispiel ist bei der klassischen NFκB-Aktivierung p65/p50 involviert, welches sich im Vergleich zu RelB/p52 bei der alternativen NFκB-Aktivierung bevorzugt an ein etwas unterschiedliches Responseelement bindet. Um solche Unterschiede bei der Bindung von Transkriptionsfaktoren zu erfassen, kann die Verwendung verschiedener sich ähnelnder Responseelementen für die Detektion der Induktion einer Transkriptionsfaktorfamilie sinnvoll sein. Dabei kann es notwendig werden, sehr viele verschiedene Reporterplasmide für das Erfassen der Aktivierung einer Transkriptionsfaktorfamilie zu nutzen.

Bei der Suche nach HHV-8-Induktoren verschiedener Transkriptionsfaktoren kann es damit, in Abhängigkeit von der Größe der Expressionsbank, der Anzahl der Reporterplasmide und den statistischen Wiederholungen, nötig sein zahlreiche Transfektionen durchzuführen. Um genügend Spielraum für die Anzahl der Transfektionen zu haben, ist der Einsatz einer Hochdurchsatztechnik für die Transfektion sinnvoll.

Sabatini und Ziauddin veröffentlichten 2001 die Technik der „Reverse-Transfektion“, welche originär durch Sonja Bauer und Dr. E. Naschberger (Abteilung Virale Vaskulopathie, Institut für Molekulare Virologie) im Labor etabliert wurde. Bei dieser Technik wird ein DNA-Hydrogel mit dem Transfektionsmittel als Druckpunkte geordnet auf einen Objektträger aufgebracht (Abb. 15, A). Nach dem Antrocknen der Druckpunkte wird der transfektionskompetente Objektträger in eine Zellkulturschale gegeben und eukaryotische Zellen, wie HEK293T, darüber ausgesät. Die Zellen siedeln ab und beginnen nach dem Anwachsen einen Zellrasen zu bilden. Nach 40-44 h ist der Zellrasen vollständig geschlossen und die gedruckten Punkte sind von einem Zellrasen bedeckt. Die Zellen, die auf den Druckpunkten wuchsen, wurden transfiziert und bilden lokal begrenzte Transfektionspunkte innerhalb des Zellrasens. Beim Verwenden von GFP als Expressionsplasmid können grün fluoreszierende Zellen als punktuelle Ansammlung im Zellrasen beobachtet werden (Abb. 15, B).

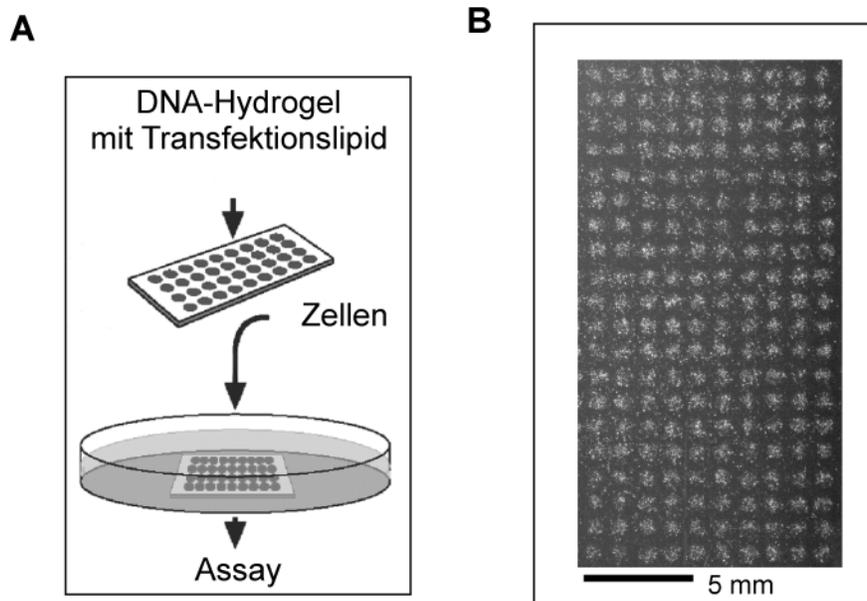


Abb. 15, (A) Schematische Übersichtsdarstellung der Reverse-Transfektion und (B) Fluoreszenzbild einer unter optimalen Bedingungen erzeugten 200er GFP143-Transfektionspunktematrix.

(A) (von oben nach unten) Auf einem Gamma-Amino-Silan beschichtetem Glasobjektträger wird ein DNA-Hydrogel-Gemisch mit Transfektionslipid geordnet aufgedruckt. Der getrocknete und transfektionskompetente Objektträger wird in eine Zellkulturschale platziert und eukaryontischen Zellen darüber ausgesät. Nach der Bildung eines geschlossenen Zellrasens wurden die Zellen, die auf den gedruckten Hydrogelpunkten wuchsen, transfiziert.

(B) Unter Verwendung von 1,0% Stockgelkonzentration, 2,4 µg GFP143 DNA und 10 µl Quellvolumen wurde eine 200 Punktematrix gedruckt, HEK293T-Zellen ausgesät und 44 h nach der Arraytransfektion die Fluoreszenz ausgelesen und das aufgenommene Fluoreszenzbild gezeigt.

Bei dieser Technik konnten die bisher verwendeten HEK293T-Zellen ebenfalls wegen der sehr guten Transfektionseffizienz und hohen Toleranz gegenüber pro-apoptischen Genen verwendet werden. Diese Umkehrtransfektion ist durch die Verwendung von Robotern in der Lage sehr viele Druckpunkte zu bewältigen, wobei jeder Druckpunkt einem Transfektionsereignis entspricht. Da es sich bei der Umkehrtransfektion um eine Arrayanwendung handelt und die Transfektion direkt auf dem Objektträger stattfindet, wird diese Methode hier als Arraytransfektion bezeichnet.

Bei der Arraytransfektion werden die Zellen, die innerhalb des Druckpunktes absiedeln und darauf proliferieren transfiziert. Die Transfektionsfläche wird damit durch den Durchmesser des Druckpunktes definiert. In der Erstveröffentlichung wurden Stahlpins mit 120 µm Durchmesser verwendet. Beim Testen des Reportersystems in der Arraytransfektion stellte sich der Durchmesser als zu klein für eine reproduzierbare Transfektion heraus.

Deswegen wurde ein Glaspin mit einem größerem Durchmesser für eine vergrößerte Transfektionsfläche selbst konstruiert, weil zum damaligen Zeitpunkt keine Stahlpins mit diesem Durchmesser kommerziell erhältlich waren. Der Glaspin wurde wie im Methodenteil beschrieben hergestellt und auf eine Druckgröße von 600 µm Durchmesser selektiert. Für die Arraytransfektion mit dem 600 µm Glaspin wurde 2,4 µg DNA mit 1% Hydrogel in 10 µl Quellvolumen verwendet.

#### **4.1.5.1 Das Reportersystem in der 600-µm-Arraytransfektion**

Die Nutzung des Reportersystems in der Arraytransfektion mit Hilfe des 600-µm-Glaspins wurde als Fallstudie mit dem NFκB-Reporterplasmid getestet. Es soll gezeigt werden, ob sich die Aktivierung der NFκB-Transkriptionsaktivierung durch vFLIP in der Arraytransfektion verfolgen lässt und welches Ergebnis sich bei der Verwendung von 600 µm Druckpunkten grundsätzlich erzielt werden kann. Für die Durchführung wurden die vorher ermittelten Parameter für das Drucken mit dem 600-µm-Glaspin genutzt. Abweichend davon wurde für die Ko-Transfektion die DNA-Gesamtkonzentration für die jeweiligen Plasmide gleichmäßig 1:1 aufgeteilt angewendet.

Die Aktivierung von NFκB durch p65 konnte sehr gut erfasst werden (Anhänge, Abb. V, Spur 1) und ist ca. siebenfach höher als die der pCMV-Negativkontrolle (Spur 2). Die schwache Aktivierung durch vFLIP lässt sich ebenfalls detektieren (Anhänge, Abb. V, Spur 3 mit weißem Pfeilen, grauer Balken), obwohl nur wenige Assayereignisse zu erkennen sind und die Fluoreszenzintensität nur knapp über der Negativkontrolle lag (Spur 2, weißer Balken).

Zusammengefasst konnte eine HHV-8-Expressionsbank hergestellt werden, deren Expressionsfähigkeit zu ca. zwei Drittel nachgewiesen wurde. Weiterhin wurde von einem NFκB-Reporterplasmid ausgehend ein eigens für die Arraytransfektion optimiertes Reportersystem erzeugt, das sich durch einfaches modulares Austauschen der Responseelemente für die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren anpassen ließ. Der 600 µm Glaspin konnte zusammen mit dem auf Reporterplasmiden basierenden Assaysystem in der Arraytransfektion angewendet werden. Somit konnte erfolgreich die Grundvoraussetzung geschaffen werden, mit der Arraytransfektion unter Verwendung des plasmidbasierenden Reportersystems und 600 µm großen Druckpunkten, die vorhandene HHV-8-Expressionsbank nach Transkriptionsfaktor induzierenden Genen zu durchsuchen.

## 4.2 Durchsuchen einer HHV-8-Expressionsbank mit Hilfe der Arraytransfektion nach transkriptionsaktivierenden Genen

Aus der Kombination der Arraytransfektion mit dem modularen Reportersystem ergibt sich ein Hochdurchsatzanalysesystem, das zur Identifizierung der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch die Expression von HHV-8-Genen genutzt werden kann.

Als erste Suche nach Transkriptionsfaktor induzierenden HHV-8-Genen wurde die zu diesem Zeitpunkt aktuelle HHV-8-Expressionsbank auf die Induktion von NFκB, p53 und AP-1 überprüft. Diese "tagesaktuelle" HHV-8-Expressionsbank umfasste 30 verschiedene HHV-8-Gene (Anhänge, Tabelle III, IV oder V). Zusätzlich wurden Positivkontrollen mit LMP1 für die AP-1-, LMP1 und vFLIP für die NFκB-, sowie p53 für die p53-Aktivierung verwendet. GFP143 diente gleichzeitig als Transfektionskontrolle und als Orientierungshilfe innerhalb der Arraymatrix. Die Suche war durch die Reporterplasmide auf das Erfassen der Transkriptionsaktivierung von NFκB, p53 und AP-1 beschränkt und könnte nach erfolgreichen Erprobung des Analysesystems für die Erfassung der Induktion andere Transkriptionsfaktoren erweitert werden. Die Analyse wurde dreimal unabhängig durchgeführt (Abb. 16) und pro Ansatz ein Matrixblock gedruckt. Nach der Arraytransfektion wurden die Objektträger fixiert, die Fluoreszenz ermittelt und um den lokalen Hintergrund korrigiert. Die Rohdaten wurden für jeden Arrayblock um die Leerfelder und Positionskontrollen bereinigt und nach der höchsten Induktionsintensität für jeden Signalweg sortiert. Anschließend wurde verglichen, ob sich die drei höchstinduzierenden Kandidaten (Anhänge, Tabelle III, IV und V, grün hinterlegt) in den drei unabhängigen Ansätzen des gleichen Signalweges wieder finden lassen (dunkelgrün hinterlegt) und sich so die Reproduzierbarkeit demonstrieren lässt. Für jeden Signalweg konnte zumindest ein Kandidat identifiziert werden, der mindestens zweimal in einem unabhängig Arrayexperiment gefunden wurde. Dies ist K4.2 und ORF 55 für die AP-1-Aktivierung (Anhänge, Tabelle III, AP-1, dunkelgrün), ORF 22 für NFκB-Aktivierung (Anhänge, Tabelle IV, NFκB, dunkelgrün) und ORF 21 für die p53-Aktivierung (Anhänge, Tabelle V, p53, dunkelgrün). K4.2 ist vermutlich ein transmembraner Typ-1-Zellrezeptor mit unbekannter Funktion (Zhu *et al.* 1999) und ORF 55 ein zu EBV BSRF-1 homologes Gen mit unbekannter Funktion. Bei ORF 22 handelt es sich um das Glykoprotein „B“ (gB) und bei ORF 21 um die Thymidinkinase von HHV-8 (Fields 4<sup>th</sup> Edition). Die Suche von Transkriptionsfaktor induzierenden Genen mit Hilfe

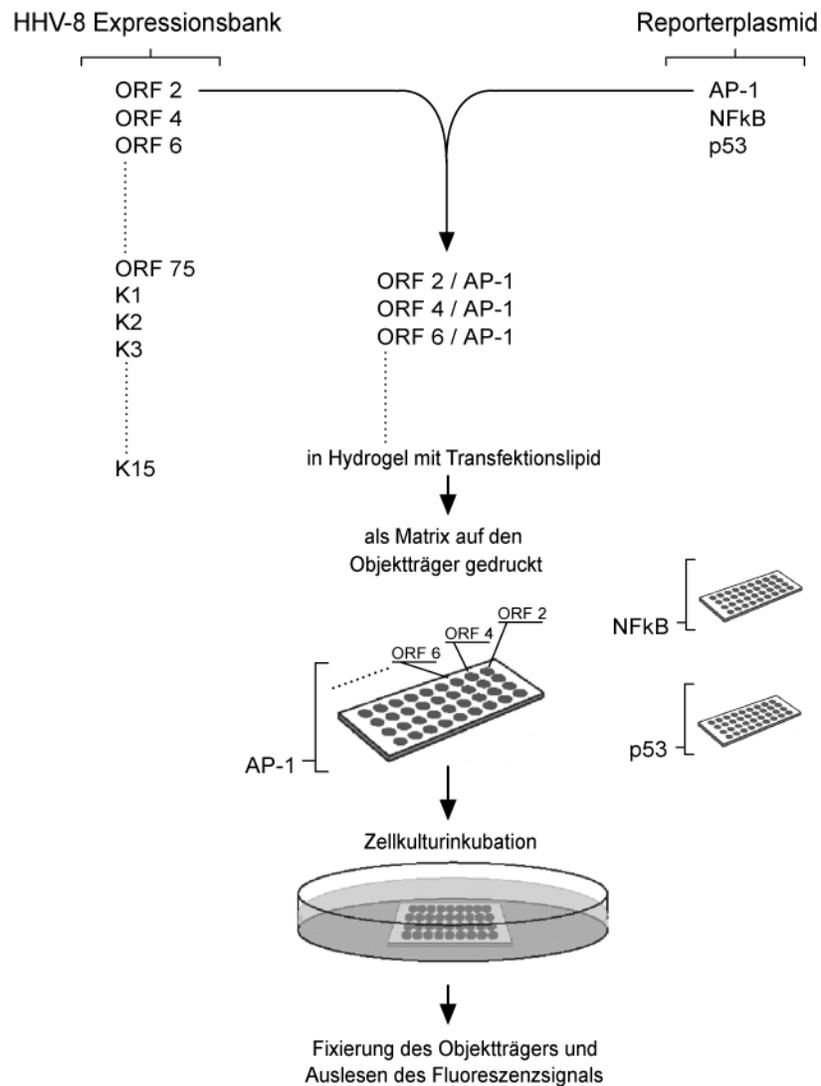


Abb. 16, (A) Schematische Übersichtsdarstellung der Suche nach transkriptionsaktivierenden HHV-8-Genen mit Hilfe der Arraytransfektion

(A) (von oben nach unten) Die einzelne Expressionsplasmide werden mit je einem Reporterplasmid in Hydrogel mit Transfektionslipid vermischt. Diese werden als Matrix angeordnet auf einem anionischem beschichtetem Glasobjektträger aufgedruckt. Der getrocknete und transfektionskompetente Objektträger wird in eine Zellkulturschale platziert und eukaryontischen Zellen darüber ausgesät. Nach der Bildung eines geschlossenen Zellrasens wird der Objektträger fixiert und die Induktion über die Fluoreszenz des Reportergens ermittelt.

von Reporterplasmiden und der Arraytransfektion ist eine relativ neue und daher weitestgehend unerprobte Technik. Da die internen Abweichungen zum Teil noch hoch sind, wurden die ermittelten Kandidaten einer zusätzlichen Verifizierung unterzogen. Dabei soll mit Hilfe der konventionellen Lochplattentransfektion die Induktionsfähigkeit der ermittelten HHV-8-Gene bestätigt oder als falschpositiv aufgezeigt werden.

#### 4.2.1 Verifizierung der Induktion durch K4.2, ORF 22 und ORF 21

Die mit Hilfe der Arraytransfektion und dem Reporterplasmidsystem als Transkriptionsfaktor induzierend identifizierten Gene wurden unabhängig von der Arraytransfektion mit Hilfe der konventionellen Lochplattentransfektion auf ihre Wirkung zur Induktion des entsprechenden Transkriptionsfaktors überprüft. Hierfür wurde zuerst jeweils ein Kandidat pro Transkriptionsfaktor ausgewählt. K4.2 wurde für die AP-1-, ORF 22 für die NFκB- und ORF 21 für die p53-Aktivierung überprüft. Die Analyse von ORF 55 für AP-1 sollte bei positivem Verlauf der Verifizierung nachgeholt werden.

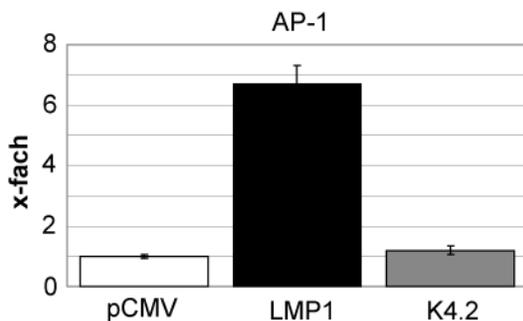


Abb. 17, K4.2 induziert in der konventionellen Lochplattentransfektion AP-1 nicht.

HEK293T-Zellen wurden mit der Negativkontrolle pCMV (weißer Balken), der Positivkontrolle LMP1 (schwarzer Balken) oder K4.2 (grauer Balken) und p(AP-1-RE)-mpTATA-GFP143 in 12er Lochplatten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde das induktionsabhängige GFP143 Fluoreszenzsignal mit Hilfe eines Mikroplatten-Fluorometers ermittelt, der Hintergrundwert korrigiert und die Induktion als Diagramm dargestellt. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Das Expressionsplasmid für HHV-8 **K4.2**, pCMV als Negativkontrolle und LMP1 als Positivkontrolle wurden mit dem Reporterplasmid p(AP-1)-mpTATA-GFP143 in HEK293T-Zellen konventionell in Lochplatten transfiziert, das Fluoreszenzsignal des GFP-Reportergens mit Hilfe eines Mikroplatten-Fluorometers ermittelt, um den Hintergrund korrigiert und als Diagramm dargestellt (Abb. 17). LMP1 induzierte AP-1 (schwarzer Balken) im Gegensatz zur pCMV-Negativkontrolle (weißer Balken) um das ca. siebenfache. Die Induktion von K4.2 (grauer Balken) lag nicht wesentlich über der der Negativkontrolle. Damit konnte K4.2 nicht bestätigt werden und wurde durch die Arraytransfektion als falsch positiv identifiziert.

Bei der Überprüfung der NFκB-Aktivierung durch **ORF 22** wurde experimentell wie beim Falschpositivtest von K4.2 vorgegangen. Die verwendeten Negativ- und Positivkontrollen waren die gleichen wie bei der Untersuchung von K4.2, zusätzlich wurde vFLIP als schwach induzierendes HHV-8-Gen als Positivkontrolle genutzt. LMP1 induziert die Transkriptionsaktivität von NFκB (Abb. 18, schwarzer Balken) im Gegensatz zur Negativkontrolle pCMV (weißer Balken) sehr stark.

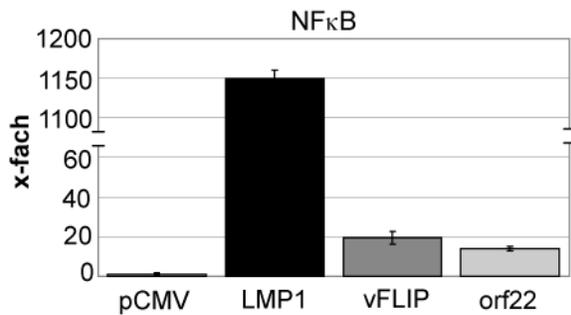


Abb. 18, ORF 22 induziert in der konventionellen Lochplattentransfektion den NFκB-Transkriptionsfaktor schwächer als vFLIP.

HEK293T-Zellen wurden mit pCMV (weißer Balken), LMP1 (schwarzer Balken), vFLIP (dunkelgrauer Balken) oder ORF 22 (hellgrauer Balken) und p(p53-RE)-mpTATA-GFP143 in 12er Lochplatten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde das induktionsabhängige GFP143 Fluoreszenzsignal mit Hilfe eines Mikroplatten-Fluorometers ermittelt, der Hintergrundwert korrigiert und die Induktion als Diagramm dargestellt. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

vFLIP induziert (grauer Balken) NFκB im Gegensatz zur Positivkontrolle LMP1 nur ca. zwanzigfach. Diese Induktion war in der Größenordnung vergleichbar zu der für ORF 22 ermittelten (hellgrauer Balken). Damit ist es möglich, mit Hilfe der Arrayanalyse ein NFκB induzierendes Gen von HHV-8 zu finden.

**ORF 21** wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Kandidaten vorher mit p53 als Positiv- und pCMV als Negativkontrolle analysiert. p53 induzierte die eigene Transkriptionsaktivierung (Abb. 19, schwarzer Balken) im Gegensatz zur Negativkontrolle pCMV (weißer Balken). Die durch den Array ermittelte ORF 21-Induktion der p53-Transkriptionsaktivierung konnte in der konventionellen Transfektion bestätigt werden (grauer Balken).

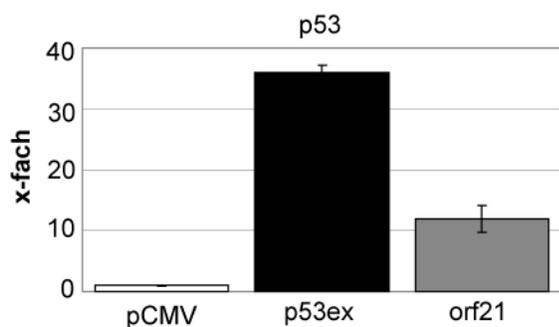


Abb. 19, Bestätigung der ORF 21 initialisierten Induktion der p53-Transkriptionsaktivierung mit Hilfe der konventionellen Lochplattentransfektion.

HEK293T-Zellen wurden mit pCMV (weißer Balken), p53 (schwarzer Balken) oder ORF 21 (grauer Balken) und p(p53-RE)-mpTATA-GFP143 in 12er Lochplatten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde das induktionsabhängige GFP143 Fluoreszenzsignal mit Hilfe eines Mikroplatten-Fluorometers ermittelt, der Hintergrundwert korrigiert und die Induktion als Diagramm dargestellt. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse der Verifizierung zeigen auf, dass das Durchsuchen einer Expressionsbank mit Hilfe des Multi-Signalwegarrays prinzipiell funktioniert, da ORF 22 als NFκB und ORF 21 als p53 induzierend zugeordnet werden konnten. Da ein HHV-8-Gen als p53 induzierend

identifiziert werden konnte wurde zuerst die Gesamtexpressionsbank auf die Induktion des p53-Signalweges mit Hilfe der konventionellen Lochplattentransfektion analysiert.

#### **4.2.2 Suche nach p53 induzierenden HHV-8-Genen mit Hilfe der konventionellen Lochplattentransfektion**

Die gesamte HHV-8-Expressionsbank (Anhänge, Tabelle I) wurde mit Hilfe der konventionellen Lochplattentransfektion und dem p53-Reporterplasmid auf die Induktionen durch HHV-8-Gene systematisch einzeln durchsucht. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit dem Expressionsplasmid des jeweiligen Kandidaten, der p53-Expressionsvektor als Positivkontrolle, sowie dem Leervektor pCMV als Negativkontrolle und dem p53-Reporterplasmid p(p53)-mpTATA-GFP143 transfiziert. Das induktionsabhängige GFP143-Signal des Reporterplasmids wurde mit Hilfe eines Mikroplatten-Fluorometers ermittelt, der Hintergrund korrigiert und entsprechend der höchsten Induktion sortiert dargestellt (Abb. 20). ORF 21 wurde als das mit Abstand am stärksten p53 transkriptionsaktivierend induzierende HHV-8-Gen identifiziert (Abb. 20, oberste Position, grauer Balken). Die Positivkontrolle (schwarzer Balken) induzierte die p53-Transkriptionsaktivierung stark im Gegensatz zur pCMV-Negativkontrolle (weißer Balken).

Trotz der Fahndung mit der erweiterten HHV-8-Expressionsbank konnte kein anderes HHV-8-Gen, das die p53-Transkription stärker induziert als ORF 21 ermittelt werden. Damit kann die Suche mit Hilfe der Arraytransfektion als Erfolg gewertet werden, da ORF 21 mit dieser neuen Hochdurchsatztechnik richtig identifiziert werden konnte.

Die Zusammenhänge der anderen induzierenden HHV-8-Gene ORF 22 und ORF 55 wurde nicht weiter verfolgt. ORF 21 sollte weiterführend im Bezug auf die p53-Induktion und die biologische Bedeutung näher charakterisiert werden.

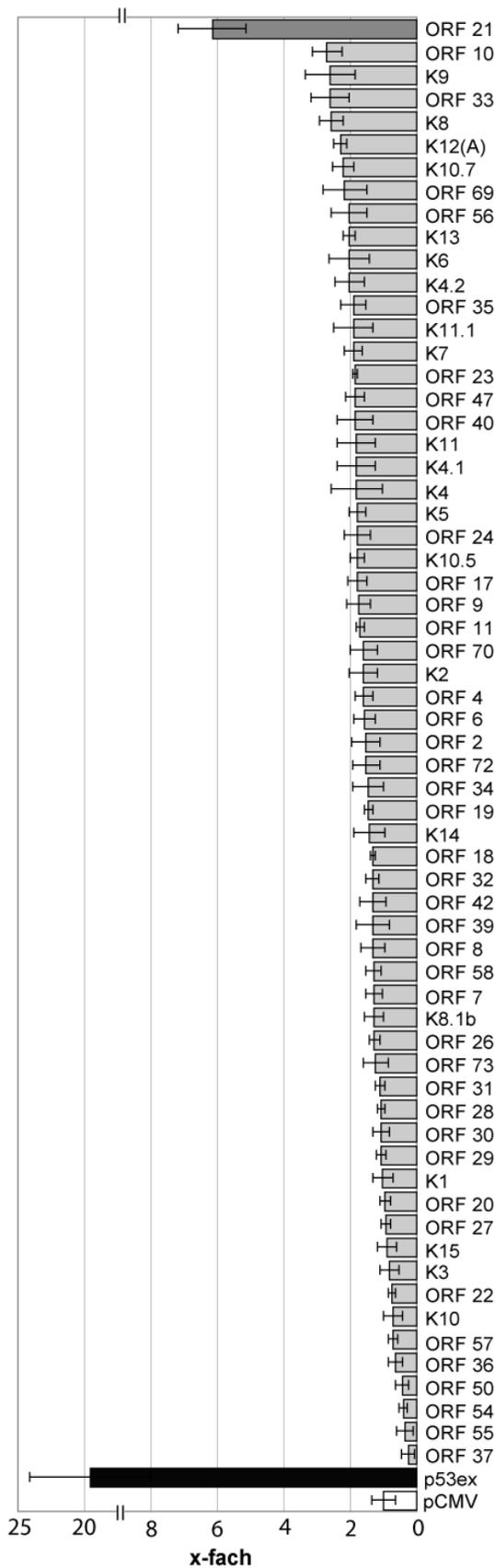


Abb. 20, ORF 21 induziert von 64 Kandidaten die p53-Transkription am stärksten.

Die einzelnen Expressionsplasmide der HHV-8-Expressionsbank, sowie die Negativkontrolle pCMV oder p53-Positivkontrolle wurden zusammen mit dem p53-Reporterplasmid p(p53-RE)-mpTATA-GFP143 in HEK293T-Zellen in 48 er Lochplatten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde das induktionsabhängige GFP143 Fluoreszenzsignal mit Hilfe eines Mikroplatten-Fluorometers ermittelt, der Hintergrundwert korrigiert und die Induktion als Diagramm dargestellt. Stärkster Induktor aus der Expressionsbank ist ORF 21 (oberste Position, dunkelgrauer Balken), neben der Postivkontrolle p53ex (schwarzer Balken) und im Gegensatz zur Negativkontrolle pCMV-Leervektor (weißer Balken). Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

### 4.3 Charakterisierung der HHV-8tk-Wirkung

#### 4.3.1 HHV-8tk induziert p53 als Transkriptionsfaktor und die Entstehung von Zellinseln

Aus einer HHV-8-Expressionsbank wurde „Open Reading Frame“-21 als am stärksten die p53-Transkriptionsaktivierung induzierend identifiziert. ORF 21 ist die virale Thymidinkinase mit Homologien zur TK aus EBV. Beide Gammaherpesviren-Thymidinkinasen unterscheiden sich strukturell zu den Thymidinkinasen der Alphaherpesviren. Die TK der Gammaherpesviren ist N-terminal verlängert und der N-terminale Teil scheint keinen Beitrag zur biochemischen Funktion zu leisten (Holton RH und Gentry GA 1996, Gustafson *et al.* 1998). Für den HHV-8tk- N-Terminus wurde gezeigt, dass dieser ca. 250 Aminosäuren lange Bereich für den Verlust der Adhäsion der Zelle und Veränderung der Zellmorphologie verantwortlich ist (Gill *et al.* 2005).

Die berichtete Veränderung der Zellmorphologie durch die HHV-8tk und die ermittelte Transkriptionsinduktion von p53 sollte gleichzeitig analysiert werden um festzustellen, ob diese beiden Effekte kongruent lokalisieren. Dies würde einen Hinweis geben, dass die in der Literatur erwähnte morphologische Veränderung und die gefundene Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor in einem Zusammenhang stehen könnten. Hierzu wurde ein p53-Expressionsvektor als Positivkontrolle (p53ex), der Leervektor pCMV als Negativkontrolle oder der HHV-8tk-Expressionsvektor zusammen mit dem p53-Reporterplasmid p(p53-RE)-mpTATA-GFP143 in HEK293T-Zellen transfiziert. Anschließend wurden Phasenkontrastbilder der Zellmorphologie und Fluoreszenzbilder der p53 induktionsabhängigen GFP143-Expression aufgenommen (35x).

Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen 48 h nach der Transfektion für die p53ex Positiv- und pCMV-Negativkontrolle keine Veränderung und einen geschlossenen Zellrasen (Abb. 21, 1a+2a). Dies steht im Gegensatz zur 48 h Transfektion der HHV-8tk bei der sich Zellinseln bildeten (Abb. 24, 3a). Die 48 h Aufnahmen der Fluoreszenz zeigte für die Positivkontrolle eine häufige und die Negativkontrolle eine geringe zufällige Verteilung von Zellen mit einer Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor (Abb. 21, 1b+2b).

Dagegen konnte für die HHV-8tk eine auf abgerundeten Zellansammlungen begrenzte und sehr deutliche Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor beobachtet werden (3b).

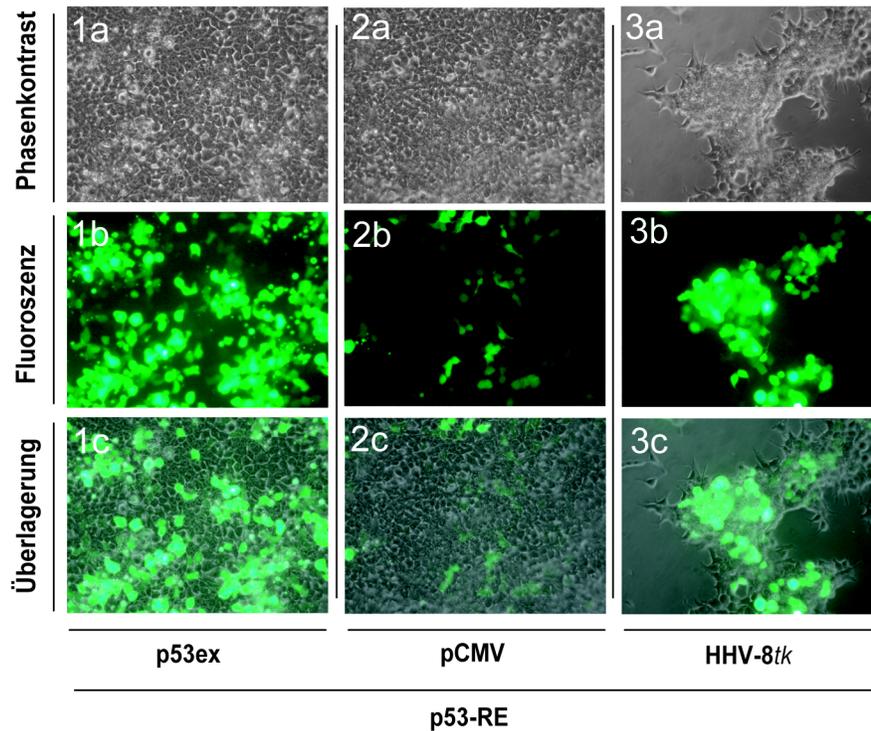


Abb. 21, Die HHV-8tk induziert p53 als Transkriptionsfaktor und die Entstehung von Zellinseln bei HEK293T-Zellen.

HEK293T-Zellen wurden mit dem p53-Expressionsplasmid (p53ex), dem Leervektor (pCMV) oder HHV-8tk zusammen mit p(p53-RE)-mpTATA-GFP143 transfiziert. Nach 48 h wurden Phasenkontrast- (Serie 'a') und Fluoreszenzbilder (Serie 'b') aufgenommen und übereinander gelagert (Serie 'c') (35x).

Die HHV-8tk induziert p53 als Transkriptionsfaktor nach 48 h und generiert die Entstehung von Zellinseln (3a) die sich mit dem Fluoreszenzinduktionssignal (3b) überlagern lässt (3c).

Die Überlagerung der Zellmorphologie mit dem Fluoreszenzinduktionssignal ergab für die Positiv- sowie Negativkontrolle (Abb. 21, 1c+2c) keine Auffälligkeiten wie bei der HHV-8tk (3c). Die HHV-8tk transfizierten Zellen zeigten dagegen eine kongruente Überlagerung der p53-Induktion als Transkriptionsfaktor und den kugelig abgerundeten Zellansammlungen in den Zellinseln.

### 4.3.2 HHV-8tk verringert die Zellzahl

Bei der Analyse der Transkriptionsinduktion von p53 wurde, im Gegensatz zu den positiv- oder negativkontroll transfizierten Zellen, ein verändertes Zellwachstum als Zellinseln bei HHV-8tk transfizierten Zellen beobachtet (Abb. 21, Serie 3).

Zur weiterführenden Analyse wurde die Zellzahl von p53ex, pCMV und HHV-8tk transfizierten Zellen durch Zählen der Zellen über 48 h hinweg verfolgt (Abb. 22, (A)) und die dazugehörige Morphologie des Zellrasens über den gleichen Zeitraum beobachtet (B).

Die HEK293T-Zellen waren zum Transfektionszeitpunkt gleichmäßig zufällig verteilt (Abb. 22, (B), 1a, 2a und 3a) und es wurde mit  $56 \times 10^4$  die gleiche Zellzahl für jeden Ansatz ermittelt ((A), 0 h). 24 h nach der Transfektion mit p53ex oder pCMV konnte weder ein Unterschied in der Zellzahl für p53 mit  $193 \times 10^4$  oder pCMV mit  $184 \times 10^4$  transfizierten Zellen gefunden (Abb. 22, (A) 24 h), noch eine Veränderung in der Morphologie des Zellrasens beobachtet ((B), 1b und 2b) werden.

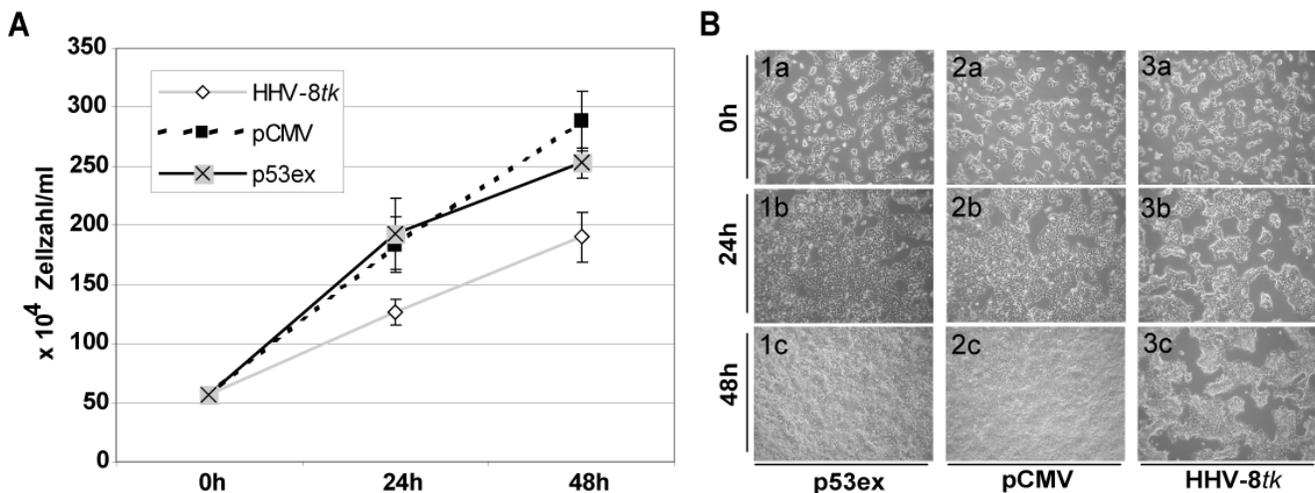


Abb. 22, Die HHV-8tk beeinflusst das Zellwachstum und die Zellrasenmorphologie.

(A) HEK293T-Zellen wurden mit p53-Expressionsplasmid (p53ex / schwarze Linie), dem Leervektor (pCMV / gestrichelte schwarze Linie) oder HHV-8tk (HHV-8tk / graue Linie) transfiziert. Die Zellen wurden zum Transfektionszeitpunkt und aller 24 h, bis zur Konfluenz des Zellrasens der Negativkontrolle (48 h nach der Transfektion), gezählt. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Diese Abbildung ist ein Teildarstellung der Abbildung 32 (C).

(B) Zusätzlich wurde von p53ex (1), pCMV (2) und HHV-8tk (3) transfizierten Zellen an allen Zählzeitpunkten (0 h Serie 'a', 24 h Serie 'b' und 48 h Serie 'c') repräsentative Phasenkontrastbilder aufgenommen (10x).

HHV-8tk reduziert das Zellwachstum ((A) graue Linie) um ca. ein Drittel und fördert die Bildung von Zellinseln ((B), 3c).

Im Gegensatz dazu wiesen HHV-8 $tk$  transfizierte Zellen eine um ca. ein Drittel reduzierte Zellzahl mit  $127 \times 10^4$  Zellen ((A) 24 h) auf und wuchsen als Zellinseln (Abb. 22, (B), 3b). Der zellzahlverringende Effekt der HHV-8 $tk$  konnte auch nach weiteren 24 h mit nur  $190 \times 10^4$  ermittelten Zellen, im Gegensatz zu p53 mit  $253 \times 10^4$  oder pCMV mit  $289 \times 10^4$  Zellen, gezählt (Abb. 22, (A) 48 h) und beobachtet ((B) 1c, 2c, vs. 3c ) werden.

Die Transfektion der Thymidinkinase von HHV-8 verringert die Zellzahl und führte, im Gegensatz zur Positiv- und Negativkontrolle, zur Bildung von Zellinseln. Die p53-Überexpression in der HEK293T-Zelllinie führte zu keiner morphologischen Veränderung des Zellrasens oder einer ähnlich deutlichen Abnahme der Zellzahl wie bei der HHV-8 $tk$ .

#### **4.3.3 HHV-8 $tk$ löst die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials aus**

Die Aktivierung von p53 wird unter anderem mit dem Zellzyklusarrest und dem Auslösen des Zelltodes assoziiert. Für die HHV-8 $tk$  wurde die Transkriptionsinduktion von p53 und die Veränderung der Zellmorphologie festgestellt. Es soll zusätzlich untersucht werden, ob die HHV-8 $tk$  am Auslösen des Zelltodes beteiligt sein könnte.

Bei der Analyse des Zelltodes ist es möglich verschiedene typische Ereignisse zu beobachten. Zu den frühen Ereignissen gehört zum Beispiel die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials. Es wurde das mitochondriale Potential mit Hilfe des JC-1 Farbstoffes analysiert. Bei bestehendem mitochondrialen Potential aggregiert der kationische Farbstoff im Mitochondrium, verändert durch diese Zusammenlagerung das Emissionsspektrum von grün zu rot und zeigt durch rot fluoreszierende Mitochondrien an, dass die Zelle über ein intaktes mitochondriales Potentials verfügt (Biocarta, JC-1 Handbuch). Als Zelltodpositivkontrolle wurde der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin benutzt (Omura *et al.* 1977). Das ursprünglich aus *Streptomyces staurosporeus* isolierte Alkaloid bindet an die Adenosin-Triphosphat (ATP)-Bindestelle von Proteinkinasen und inhibiert dadurch deren Wirkung (Ruegg und Burgess 1989). Die Inhibierung von Proteinkinasen durch Staurosporin führt dann zum Auslösen des programmierten Zelltodes (Tan *et al.* 1998).

Für den Assay zur Messung des mitochondrialen Potentials wurden statt HEK293T-Zellen HEK293-Zellen verwendet, da diese nahe zu einander verwandt sind und der Assay mit HEK293-Zellen von F. Pogoda (Abteilung Virale Vaskulopathie, Institut für Molekulare Virologie) etabliert und durchgeführt wurde.

Die HHV-8*tk* wird in der Literatur mit dem Auslösen des Verlusts der Zelladhäsion assoziiert. Weiterhin ist für die Apoptose der Verlust der Zelladhäsion als Merkmal beschrieben (Gill *et al.* 2005 , Marchetti *et al.* 1996a,b). Der verwendete Assay basiert auf dem Ermitteln der Fluoreszenz von aggregierten JC-1 in Zellen, die auf dem Boden von Zellkulturplatten fixiert sind. Vor jeder Messung wurden die Zellkulturplatten kurzzeitig zentrifugiert, um sich eventuell ablösende und abgelöste Zellen auf den Boden zu fixieren und das mitochondriale Potential aller Zellen messen zu können.

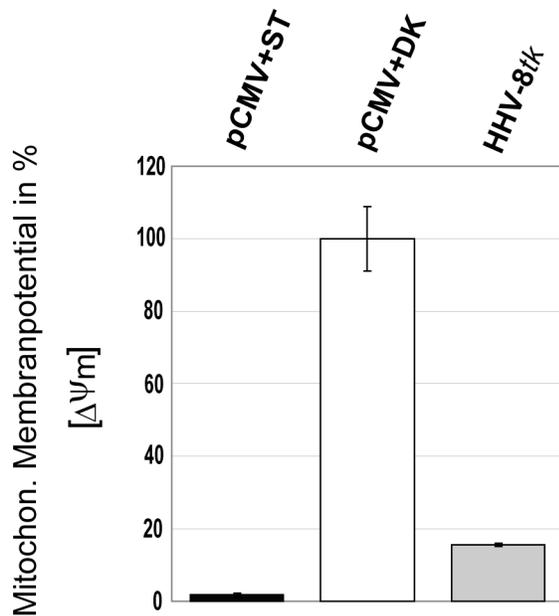


Abb. 23, HHV-8*tk* induziert die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials.

HEK293-Zellen wurden mit Leervektor (pCMV) oder HHV-8*tk* transfiziert. Nach 24 h wurde die pCMV-Transfektion mit Staurosporin (ST) oder mit der DMSO-Kontrolle (DK) zusätzlich inkubiert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit JC-1 gefärbt, dadurch der Zustand des mitochondrialen Potentials erfasst, und das JC-1 Fluoreszenzsignal mit Hilfe des Plattenlesers bei 590 nm ermittelt. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Die Negativkontrolle (pCMV+DK) repräsentiert 100 % der lebenden Zellen mit intaktem mitochondrialem Potential. HHV-8*tk* (grauer Balken) induziert die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials, wie die Staurosporin Positivkontrolle (schwarzer Balken) im Gegensatz zur Leervektor Negativkontrolle (weißer Balken). Diese Abbildung ist eine Teildarstellung der Abbildung 31.

HEK293-Zellen wurden mit dem HHV-8*tk*-Expressionsvektor und zwei Ansätze des Leervektor pCMV transfiziert. Als Positivkontrolle wurde 24 h später eine der zwei Leervektortransfektion mit 200 nM Staurosporin behandelt (pCMV+ST).

Die andere Leervektortransfektion diente als Negativkontrolle und wurde nur mit dem Lösungsmittel DMSO (pCMV+DK), in der Konzentration die in der Positivkontrolle enthalten war, versehen. Weitere 24 h später wurde mit Hilfe einer JC-1-Färbung die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials [Δψm] ermittelt. JC-1 lagert sich rot fluoreszierend in Mitochondrien mit intakten Potential an. Die Negativkontrolle (Abb. 23, pCMV-DK) repräsentiert 100 % der Zellen, die unter diesen experimentellen Bedingungen ein intaktes mitochondriales Potential aufweisen. Im Vergleich dazu löst die HHV-8*tk* (Abb. 23, grauer Balken) die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials um ca. 80% aus und damit ähnlich stark wie die Staurosporin-Positivkontrolle (schwarzer Balken), die ca. 95%

Depolarisierung des mitochondrialen Potentials verursachte. Die Negativkontrolle pCMV+DK (weißer Balken) zeigt zusätzlich, dass der Depolarisierungseffekt weder durch die Transfektion, noch durch das Lösungsmittel von Staurosporin (DMSO) hervorgerufen wurde.

#### **4.3.4 HHV-8tk erhöht den endogenen p53-Spiegel und die p53-Serin-392-Phosphorylierung**

Die transkriptionelle Aktivierung des p53-Signalweges durch die HHV-8tk wurde bereits durch die Aktivierung des p53-Reporterplasmids gezeigt. Einer transkriptionellen Aktivierung von p53 geht eine Stabilisierung von p53 und posttranslationale Modifikationen bestimmter Aminosäuren voraus (Schuler M und Green D R 2001). Es soll überprüft werden, ob sich eine Erhöhung des endogenen p53-Spiegels und damit eine Akkumulation von p53 nachweisen läßt. Dies wäre ein Hinweis auf eine p53-Stabilisierung, induziert durch die HHV-8tk. Weiterhin sollen wichtige Phosphorylierungs- und Acetylierungsstellen von p53 analysiert werden. Die Veränderung der p53-Phosphorylierung oder Acetylierung kann, abhängig von der betreffenden Stelle, Auskunft über die Relevanz und Bedeutung der Aktivierung von p53 geben.

Für die Analyse wurden HEK293T-Zellen mit p53 als Antikörperbindungskontrolle, einem GFP143 Expressionsvektor als Negativkontrolle oder einem HHV-8tk-Expressionsvektor transfiziert, 48 h nach der Transfektion Proteinzellextrakt präpariert und mit Hilfe eines Westernblots analysiert. Es wurde der endogene p53-Spiegel ermittelt und die Phosphorylierung von p53 an Serin-15, -46 und -392 verfolgt, sowie die Acetylierung von Lysin-382. Weiterhin wurde die Expression der Myc-getaggen Proteine GFP143 und HHV-8tk analysiert und die aufgetragenen Proteinmengen durch Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase (GAPDH) überprüft.

Von den zu vergleichenden Westernblotbanden wurden das Signal mit Hilfe der densitometrischen Dichtemessung ermittelt. Die Messung wurde auf die jeweils zugehörige GAPDH-Expression standardisiert und zeigt als einfache Erhöhung GFP143 transfizierte (Abb. 24, (B) Diagramme, schwarze Balken) im Vergleich zu HHV-8tk transfizierten Zellen (weiße Balken).

Die verstärkte Phosphorylierungen von p53-Serin-15 und -46 kann über eine blockierte MDM-2-Bindung Auskunft geben. Serin-15 liegt innerhalb der MDM-2-Bindestelle und Serin-46 in

deren Nähe. Durch deren Phosphorylierung wird die p53-/MDM-2-Interaktion verhindert, der MDM-2 induzierte p53-Abbau unterbunden und p53 stabilisiert. Dies wäre ein Hinweis auf eine verstärkte Stabilisierung und Aktivierung von p53 (Shieh *et al.* 1997, Waterman *et al.* 1998, Oda *et al.* 2000, Sakaguchi *et al.* 1997). Zusätzlich fördert die Phosphorylierung von Serin-392 die Oligomerisierung von p53, was für die Interaktion von p53 als Transkriptionsfaktor nötig ist. Die Acetylierung von Lysin-382 weist auf eine Transkriptionsverstärkung von p53 als Transkriptionsfaktor hin (Avantaggiati *et al.* 1997, Lill *et al.* 1997).

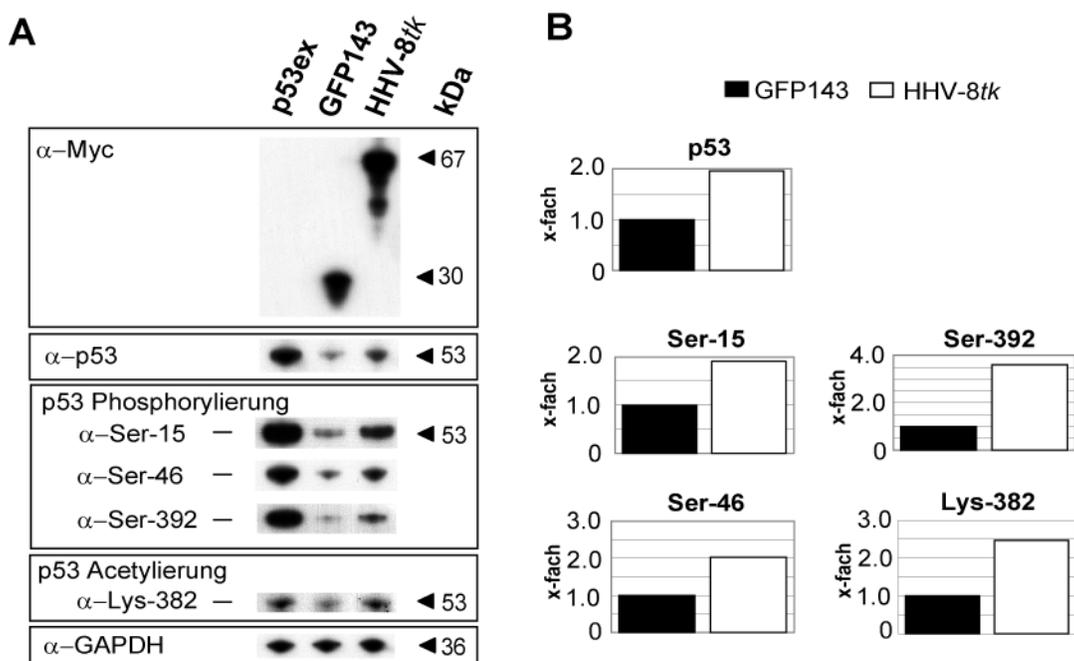


Abb. 24, HHV-8tk erhöht das zelluläre p53-Proteinlevel und induziert die Phosphorylierung von Serin-392 überproportional zur Erhöhung des endogenen p53-Niveaus in HEK293T-Zellen.

(A) Westernblotanalyse von p53ex, GFP143 oder HHV-8tk transfizierten HEK293T-Zellen. Die Proteinzell-extrakte wurden 48 h nach der Transfektion erstellt. Es wurde die Expression der Myc-getaggten Proteine GFP143 (30 kDa) und HHV-8tk (67 kDa) nachgewiesen (α-Myc Panel), der endogene (GFP143 und HHV-8tk) oder in Kombination mit dem exogenen (p53ex) p53-Level (α-p53 Panel), die p53-Phosphorylierung von Serin-15, -46 und -392 (p53 Phosphorylierungs-Panel) sowie die p53-Acetylierung von Lysin-382 (p53-Acetylierungs-Panel). Der GAPDH-Expressionsnachweis zeigt den Auftrag gleicher Proteinmengen (α-GAPDH Panel). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Westernblot von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

(B) Densitometrische Dichtemessung der jeweiligen Westernblotbanden aus (A). Die Messung wurde auf die jeweils zugehörige GAPDH-Expression standardisiert und zeigt als einfache Erhöhung GFP143 transfizierte Zellen (schwarze Balken) gegen HHV-8tk (weiße Balken).

HHV-8tk erhöht das zelluläre p53-Proteinlevel zweifach und induziert die Phosphorylierung von Serin-15 (2x), -46 (2x) und -392 (3,5x) sowie die Acetylierung von Lysin-382 (2,5x) in HEK293T-Zellen

Die HHV-8*tk*-Transfektion in HEK293T-Zellen erhöhte das endogene p53-Level (Abb. 24, (A) p53-Panel, (B) p53, weißer Balken) um das Doppelte, im Gegensatz zur GFP143-Negativkontrolle (schwarzer Balken), die das p53-Basislevel in HEK293T-Zellen repräsentiert. Die Überexpression von exogenen p53 kann für alle Analysen beobachtet werden und dient als Positiv- und Bindungskontrolle des jeweils verwendeten Antikörpers. Bei HHV-8*tk* transfizierten Zellen ließ sich im Gegensatz zur GFP143-Transfektion die Phosphorylierung von Serin-15 mit (Abb. 24, (B) Ser-15 2x), Serin-46 (Ser-46 2x) und Serin-392 (Ser-392 3,5x), sowie die Acetylierung von Lysin-382 (Lys-382 2,5x) ermitteln. Auf Proteinlevel konnte damit eine durch die HHV-8*tk* ausgelöste Akkumulation von p53 um das Doppelte, im Vergleich zu GFP143 transfizierten Zellen, nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Erhöhung des endogenen p53-Levels konnte an den charakteristischen posttranslationalen p53-Modifizierungsstellen wie die Phosphorylierung von Serin-15 und -46, sowie Acetylierung von Lysin-382 keine überproportionale Veränderung beobachtet werden. Die Erhöhung der Phosphorylierungen folgte in der gleichen Stärke wie die des endogenen p53-Spiegels und bestätigte damit aber zusätzlich die HHV-8*tk* verursachte Erhöhung des endogenen p53-Levels. Dagegen ist für die Phosphorylierung von p53-Serin-392 eine überproportionale Erhöhung mit ca. 1,5 fach über die des endogenen p53-Levels erkennbar.

HEK293T ist eine Zelllinie mit viralen Proteinen, wie zum Beispiel das Simian Virus 40 (SV40)-T-Large-Antigen (SV40-TLA) und das 55-kDa Genprodukt der frühen Region 1B des Adenovirus Serotyp 5 (E1B-55K), die mit p53 interagieren. Dies kann zu einem verfälschten Ergebnis bei der Analyse der HHV-8*tk* führen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine andere Zelllinie, die nicht das SV40-TLA sowie E1B-55K enthält, analysiert, um eine potenzielle Akkumulation des endogenen p53, hervorgerufen durch die HHV-8*tk*, nachzuweisen.

#### **4.3.5 HHV-8*tk* erhöht den zellulären p53-Proteinlevel in HeLa-Zellen**

Bei der Transfektion von HEK293T-Zellen mit der HHV-8*tk* konnte ein erhöhter endogener p53-Level und die p53-Hyperphosphorylierung gezeigt werden. Die nachgewiesene HHV-8*tk*-Wirkung kann Zelltyp abhängig sein. Bei HEK293T-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die unter anderen mit den p53 interagierenden viralen Proteinen SV40-TLA und den E1B-55K Protein des Adenovirus, transformiert wurde (Graham *et al.* 1977, Sarnow *et al.* 1982). Beide

transformierenden viralen Proteine könnten die HHV-8*tk*-Wirkung beeinflussen oder gar erst ermöglichen. Durch eine weitere Analyse mit Hilfe einer anderen Zelllinie soll gezeigt werden, dass die viralen Proteine in HEK293T-Zellen alleine nicht der Grund für die Wirkung der HHV-8*tk* waren und dies Zelltyp unabhängig ist. Als eine zentrale p53-Phosphorylierungsstelle für die Stabilisierung von p53, wurde Serin-15 analysiert.

Dazu wurde die Krebszelllinie HeLa, die als p53-Interaktionsprotein das frühe Protein 6 (E6) des Human-Papilloma-Virus (HPV) enthält, welches bei der HEK293T-Zelllinie fehlt, verwendet. HeLa-Zellen wurden mit GFP143 als Negativkontrolle und der HHV-8*tk* transfiziert, nach 48 h Proteinzellextrakte präpariert und mit Hilfe des Westernblots das endogene p53-Proteinlevel und p53-Serin-15 analysiert.

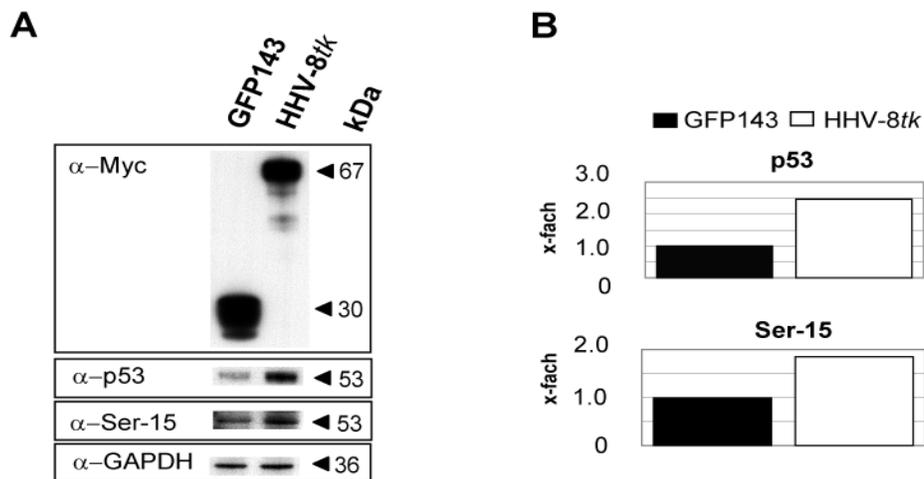


Abb. 25, HHV-8*tk* erhöht das zelluläre p53-Proteinlevel in HeLa-Zellen.

(A) Westernblotanalyse von GFP143 oder HHV-8*tk* transfizierten HeLa-Zellen. Die Proteinzellextrakte wurden 48 h nach der Transfektion erstellt. Es wurde die Expression der Myc-getaggtten Proteine GFP143 (30 kDa) und HHV-8*tk* (67 kDa) nachgewiesen ( $\alpha$ -Myc Panel), das endogene p53-Level ( $\alpha$ -p53-Panel) und die p53-Phosphorylierung von Serin-15 ( $\alpha$ -Serin-15 Panel). Der GAPDH-Expressionsnachweis zeigt den Auftrag gleicher Proteinmengen ( $\alpha$ -GAPDH Panel). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Westernblot von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

(B) Densitometrische Dichtemessung der jeweiligen Westernblotbanden aus (A). Die Messung wurde auf die jeweils zugehörige GAPDH-Expression standardisiert und zeigt als einfache Induktion die von GFP143 (schwarze Balken) gegen HHV-8*tk* (weiße Balken) transfizierte Zellen.

HHV-8*tk* erhöht das endogen p53-Level bei HeLa um das 2,5x und induziert die Phosphorylierung von Serin-15 nicht überproportional.

Als Kontrolle wurde die Expression der Myc-getaggtten Proteine GFP143 und HHV-8*tk* verfolgt und die aufgetragenen Proteinmengen durch GAPDH überprüft. Von den zu vergleichenden Westernblotbanden wurden das Signal mit Hilfe der densitometrischen

Dichtemessung ermittelt. Die Messung wurde auf die jeweils zugehörige GAPDH-Expression standardisiert und zeigt als einfache Induktion GFP143 transfizierte HeLa-Zellen (Abb. 25, (B) Diagramme, schwarze Balken) im Vergleich zu HHV-8*tk* transfizierten (weiße Balken) HeLa-Zellen.

In HeLa-Zellen konnte die HHV-8*tk* ausgelöste Akkumulierung von p53 durch die zweifache Erhöhung im Gegensatz zur GFP143 Negativkontrolle gezeigt werden (Abb. 25, (A) p53-Panel und (B) Diagramm). Für die Phosphorylierung von p53 an Serin-15 konnte, wie bei HEK293T-Zellen, in etwa die gleiche Erhöhung wie für den endogenen p53-Spiegel beobachtet werden (Abb. 25, (A) Serin-15 Panel und (B) Diagramm). Damit konnte in HeLa-Zellen, wie bei HEK293T, die HHV-8*tk* ausgelöste Akkumulation von p53 nachgewiesen werden. Weiterhin konnte keine überproportionale Phosphorylierung von p53-Serin-15 im Vergleich zur Akkumulation von p53 beobachtet werden.

#### **4.3.6 HHV-8*tk* verändert nicht den Phosphorylierungsstatus von pRB**

Das Retinoblastomprotein pRB (p105) ist ein Zellzyklus regulierendes Protein und ein Tumorsuppressorgen. Der hypo- und hyperphosphorylierte Zustand von pRB sind für die Zellzyklusregulation wichtig. Im hypophosphorylierten Zustand kann pRB das Zellzyklus regulierende Protein "Transcription Factors in Higher Eukaryotes" (E2F) binden und dadurch den Zellzyklus in der G1 zu S-Phase arretieren. Im Gegensatz hierzu bindet hyperphosphoryliertes pRB E2F nicht und kann den Zellzyklus über diese Interaktion nicht beeinflussen (Lukas *et al.* 1994, Salcedo *et al.* 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass HHV-8*tk* transfizierte Zellen ein reduziertes Zellwachstum aufwiesen und den p53-Signalweg induzierten. Eine der möglichen Interaktionen von p53 ist es, neben dem Auslösen des Zelltodes und der DNA-Reparatur, den Zellzyklusarrest einzuleiten.

Stabilisiertes p53 kann mit p21 interagieren, dadurch die Interaktion mit Zyklankinasen verhindern, die in Folge pRB nicht mehr phosphorylieren können. Dies fördert den hypophosphorylierten Zustand von pRB, das dann E2F bindet und dadurch indirekt durch p53 gefördert, den Zellzyklusarrest auslösen kann (Hwang *et al.* 1993, Hwang *et al.* 1996).

Es soll untersucht werden ob die HHV-8*tk* einen Einfluss auf den Phosphorylierungszustand des Retinoblastomproteins hat.

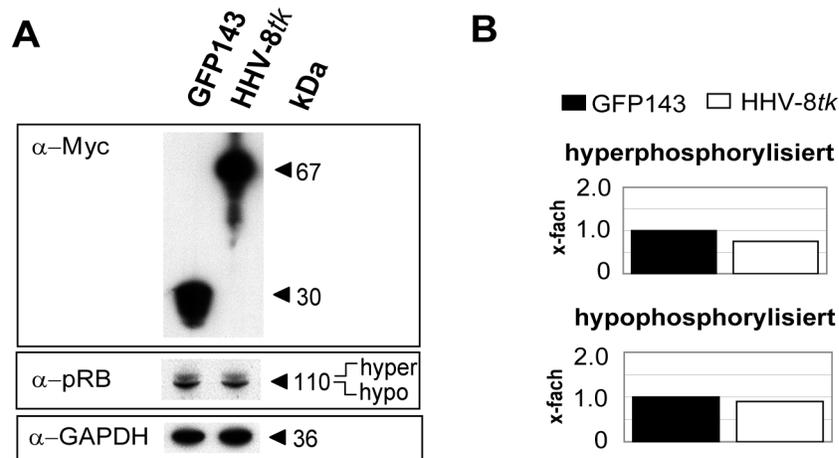


Abb. 26, HHV-8tk verändert nicht den Phosphorylierungsstatus von pRB.

(A) Westernblotanalyse von GFP143 oder HHV-8tk transfizierten HEK293T-Zellen. Die Proteinzellextrakte wurden 48 h nach der Transfektion erstellt. Es wurde die Expression der Myc-getaggtten Proteine GFP143 (30 kDa) und HHV-8tk (67 kDa) nachgewiesen ( $\alpha$ -Myc Panel) und das RB-Protein ( $\alpha$ -pRB Panel). Der GAPDH-Expressionsnachweis zeigt den Auftrag gleicher Proteinmengen ( $\alpha$ -GAPDH Panel). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Westernblot von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

(B) Densitometrische Dichtemessung der jeweiligen Westernblotbanden aus (A). Die Messung wurde auf die jeweils zugehörige GAPDH-Expression standardisiert und zeigt als einfache Erhöhung GFP143 transfizierte Zellen (schwarze Balken) gegen HHV-8tk (weiße Balken).

HHV-8tk verändert den Phosphorylierungsstatus von pRB nicht.

Dafür wurden HEK293T-Zellen mit Expressionsplasmide für GFP143 als Negativkontrolle oder der HHV-8tk transfiziert, nach 48 h Proteinzellextrakte präpariert und mit Hilfe des Westernblots analysiert. Es wurde die typische Zweibandexpression für hypo- und hyperphosphoryliertes pRB-Protein detektiert. Dabei handelt es sich bei der oberen um die hyperphosphorylierte pRB-Form und bei der unteren um die hypophosphorylierte (Abb. 26,  $\alpha$ -pRB Panel). Als Kontrolle wurde die Expression der Myc-getaggtten Proteine GFP143 und HHV-8tk verfolgt und die aufgetragenen Proteinmengen durch GAPDH überprüft.

Von den beiden pRB-Phosphorylierungsformen wurde das Signal der Westernblotbanden mit Hilfe der densitometrischen Dichtemessung ermittelt. Die Messung wurde auf die zugehörige GAPDH-Expression standardisiert und zeigt als einfache pRB-Phosphorylierung negativkontroll-transfizierte Zellen (Abb. 26, (B) Diagramme, schwarze Balken) im Gegensatz zu HHV-8tk transfizierte HEK293T-Zellen (weiße Balken).

Es konnte keine Änderung im Phosphorylierungszustand von pRB zwischen der GFP143 oder HHV-8*tk*-Transfektion beobachtet werden. Für HHV-8*tk* transfizierte Zellen war zwar insgesamt ein leichter Rückgang für pRB detektierbar, jedoch keine deutliche Mengenverschiebung zu einer der hypo- oder hyperphosphorylierten Formen hin. Für die HHV-8*tk* konnte kein deutlicher Einfluss auf die pRB Phosphorylierung beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der HHV-8*tk* und pRB nicht weiter untersucht.

#### **4.3.7 Die Gammaherpesvirus HHV-8*tk* unterscheidet sich zu den Alphaherpesviren-Thymidinkinasen in der N-terminalen Länge**

Im Gegensatz zu den Betaherpesviren, kodieren die Gammaherpesviren (HHV-8 und EBV) und die Alphaherpesviren (HSV-1, HSV-2, VZV) für eine Thymidinkinase. In einem Alignment der Thymidinkinasen der humanen Gammaherpesviren und der humanen Alphaherpesviren, fällt eine N-terminale Verlängerung bei den Thymidinkinasen der Gammaherpesviren auf (Holton RH und Gentry GA 1996, Gustafson *et al.* 1998, Gill *et al.* 2005). Für die EBV*tk* wurde gezeigt, dass dieser ca. 240 Aminosäuren lange N-terminale Bereich für die Funktion als Thymidinkinase nicht wichtig ist (Holton RH und Gentry GA 1996, Gustafson *et al.* 1998). Für den N-terminalen Bereich der EBV*tk* ist bisher keine Funktion bekannt. Im Gegensatz dazu wurde für die ca. 250 AS lange N-terminale Domäne der HHV-8*tk* die Induktion von zellmorphologischen Veränderungen und eine Unterbrechung der Zelladhäsion festgestellt (Gill *et al.* 2005). Dies war ein Hinweis darauf, dass die N-terminale Domäne der HHV-8*tk* unter anderem für die transkriptionelle Induktion von p53 und Anhebung des endogenen p53-Spiegels, Veränderung des Zellrasens und die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials verantwortlich sein könnte.

Um die N-terminale Domäne der HHV-8*tk* einzugrenzen, wurden alle Thymidinkinasen der humanen Herpesviren in einem Alignment verglichen. Dabei müssen für die biochemische Funktion als Thymidinkinase, wichtige konservierte Stellen zu einander homolog gefunden werden.

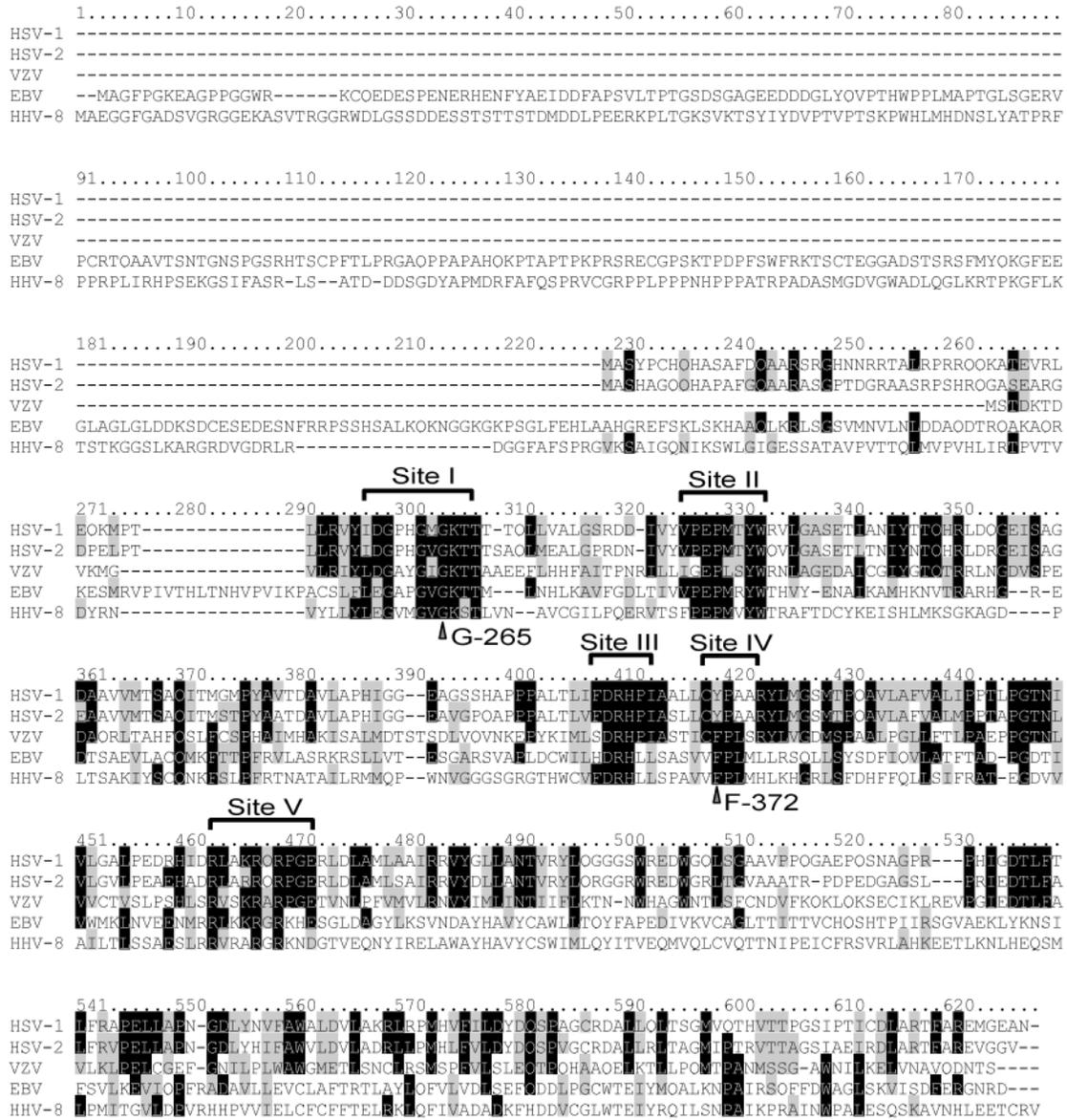


Abb. 27, ClustalW (Version 1.82) Alignment der humanen Alpha- und Gammaherpesviren Thymidinkinase in der „Boxshade“-Darstellung mit dem Einbuchstabenkode für Aminosäuren.

Die TKs der Alphaherpesviren (HSV-1 (NP\_044624), HSV-2 (BAA23731) und VZV (AAT07718)) sind oben und die der Gammaherpesviren (EBV (CAD53451) sowie HHV-8 (AAB62622)) unten angeordnet. Gleiche Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt dargestellt. Bekannte konservierte Stellen für die biochemische Funktion der Thymidinkinase sind in der englischen Bezeichnung „Site“-I bis -V mit Site-I (ATP-Bindung), Site-II (Katalytische Domäne für den Phosphattransfer), Site-III und -IV (Nukleotidbindungscentren) und Site-V (Bindung von Phosphatgruppen) eingezeichnet. Zusätzlich sind die mutierten Aminosäuren Glyzin-265 (G-265, Site-I) und Phenylalanin-372 (F-372, Site-IV) markiert.

Im Alignment konnten alle bekannten konservierten biochemischen Stellen „Site“-I bis -V der Thymidinkinasen, die zueinander ähnlich sind, gefunden werden (Abb. 27, Site-I bis -V) (nach Cannon *et al.* 1999). Dabei zeigte sich, dass die Gammaherpesviren Thymidinekinasen N-terminal verlängert waren und bei den Alphaherpesviren hierzu keine korrespondierende Aminosäuresequenz vorliegt. Diese zusätzliche Sequenz schien nicht die Thymidinkinasefunktion zu betreffen, da alle bekannten wichtigen biochemischen Stellen im C-terminalen Bereich der Thymidinkinase der Gammaherpesviren wieder gefunden wurden. Zusätzlich wurde vermutet, dass die EBVtk ebenfalls eine zur HHV-8tk ähnliche Funktion in ihrem N-terminalen Bereich verbergen könnte, da diese ebenfalls einen längeren N-Terminus besitzt. Beim Vergleichen der N-Termini der Gammaherpesviren untereinander fiel jedoch keine deutliche Homologie auf. Damit ist eine unterschiedliche Funktionen des jeweiligen N-Terminus ebenso wahrscheinlich.

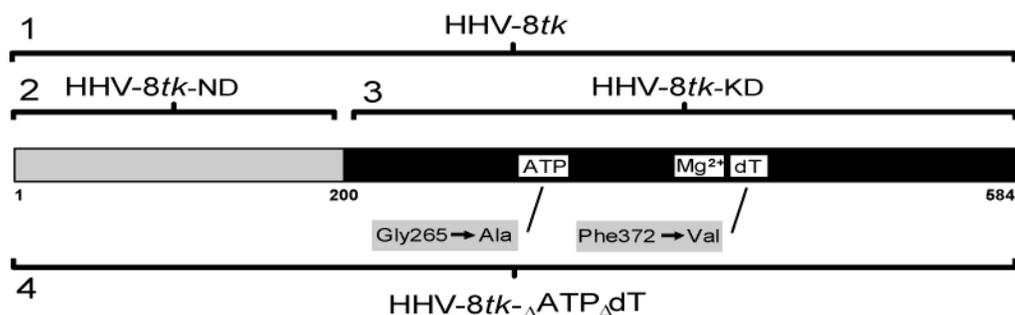


Abb. 28, Schematische Darstellung des vollständigen HHV-8tk-Proteins (HHV-8tk) (1), der N-terminalen Domänen- (HHV-8tk-ND) (2) und Kinasedomänenvariante (HHV-8tk-KD) (3) sowie der Kinasefunktionsdeletionsmutante (HHV-8tk- $\Delta$ ATP $\Delta$ dT) (4).

Für die ATP- und Desoxythymidin-Bindungsmutante sind die Punktmutation angegeben mit Glyzin-265 zu Alanin und Phenylalanin-372 zu Valin.

Aus den Ergebnissen des Alignments resultierte die Entstehung der zwei Verkürzungsmutanten HHV-8tk-ND und HHV-8tk-KD (Abb. 28, (2+3)). HHV-8tk-ND ist die 200 AS lange Variante der N-terminalen Domäne (ND) des vollständigen Proteins. HHV-8tk-KD besteht aus der 384 Aminosäuren langen Kinasedomäne (KD).

Eine weitere Möglichkeit ist, dass unabhängig von der biochemischen Funktion der Kinasedomäne, jedoch innerhalb dieser Proteinsequenz, die Domäne kodiert, die die HHV-8tk-Wirkung auslöst. Um diese Möglichkeit abzugrenzen wurde zusätzlich die

Doppelpunktmutationsvariante HHV-8tk- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT kloniert, die eine ATP- und Desoxythymidin (dT)-Bindungsdefizienz aufweist und daraus resultierend die Thymidinkinasefunktion aufgehoben ist. Dies wird durch den Austausch des Glyzins 265 durch Alanin in Site-I und Phenylalanin 372 durch Valin in Site-IV erreicht. Diese HHV-8tk-Variante entspricht außer dem AS-Austauschen der vollständigen HHV-8-Thymidinkinase (Lock *et al.* 2002).

#### **4.3.8 Der 200 Aminosäuren lange HHV-8tk-N-Terminus als Ursache für die Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor und die Veränderung des Zellwachstums**

Die drei neuen HHV-8tk-Varianten HHV-8tk-ND, HHV-8tk-KD und HHV-8tk- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT wurden hinsichtlich der Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor und der Veränderung der Morphologie des Zellrasens mit der vollständigen HHV-8tk verglichen.

Dazu wurden HEK293T-Zellen mit Expressionsvektoren der HHV-8tk, HHV-8tk-ND, HHV-8tk-KD, HHV-8tk- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT oder dem pCMV-Leervektor als Negativkontrolle gemeinsam mit dem p53-Reporterplasmid transfiziert und nach 48 h die p53 induktionsabhängige Expression von GFP143 durch die Messung der Fluoreszenz mit Hilfe des Mikroplatten-Fluorometers bestimmt (Abb. 29, (A) Diagramm). Zusätzlich wurden Phasenkontrastbilder des Zellrasens 0h, 24 h und 48 h nach der Transfektion aufgenommen (Abb. 29, (B) 1a-5c).

Alle HHV-8tk-Varianten, die den N-Terminus enthielten, induzierten die Transkription von p53 (Abb. 29, (A) HHV-8tk, HHV-8tk-ND und HHV-8tk- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT) im Gegensatz zu HHV-8tk-KD und pCMV, die keine wesentliche Induktion ((A) HHV-8tk-KD und pCMV) hervorriefen. Zusätzlich förderten alle HHV-8tk N-terminalen Varianten nach 48 h die Entstehung von Zellinseln (Abb. 29, (B), 1c, 3c, 5c), wohingegen die Negativkontrolle pCMV und die HHV-8tk-Kinasedomänen-Variante einen gewohnt geschlossenen Zellrasen aufwiesen ((B) 2c, 4c). Dies zeigte eindeutig, dass der Grund für die p53-Induktion und die Inhibierung des Zellwachstums im 200 Aminosäuren langen N-Terminus der HHV-8tk kodiert ist. Des Weiteren ist weder biochemisch noch strukturell die Kinasedomäne dafür wichtig, da die Verkürzungsmutante HHV-8tk-ND, wie das vollständige HHV-8tk-Protein, p53 als Transkriptionsfaktor induzieren kann.

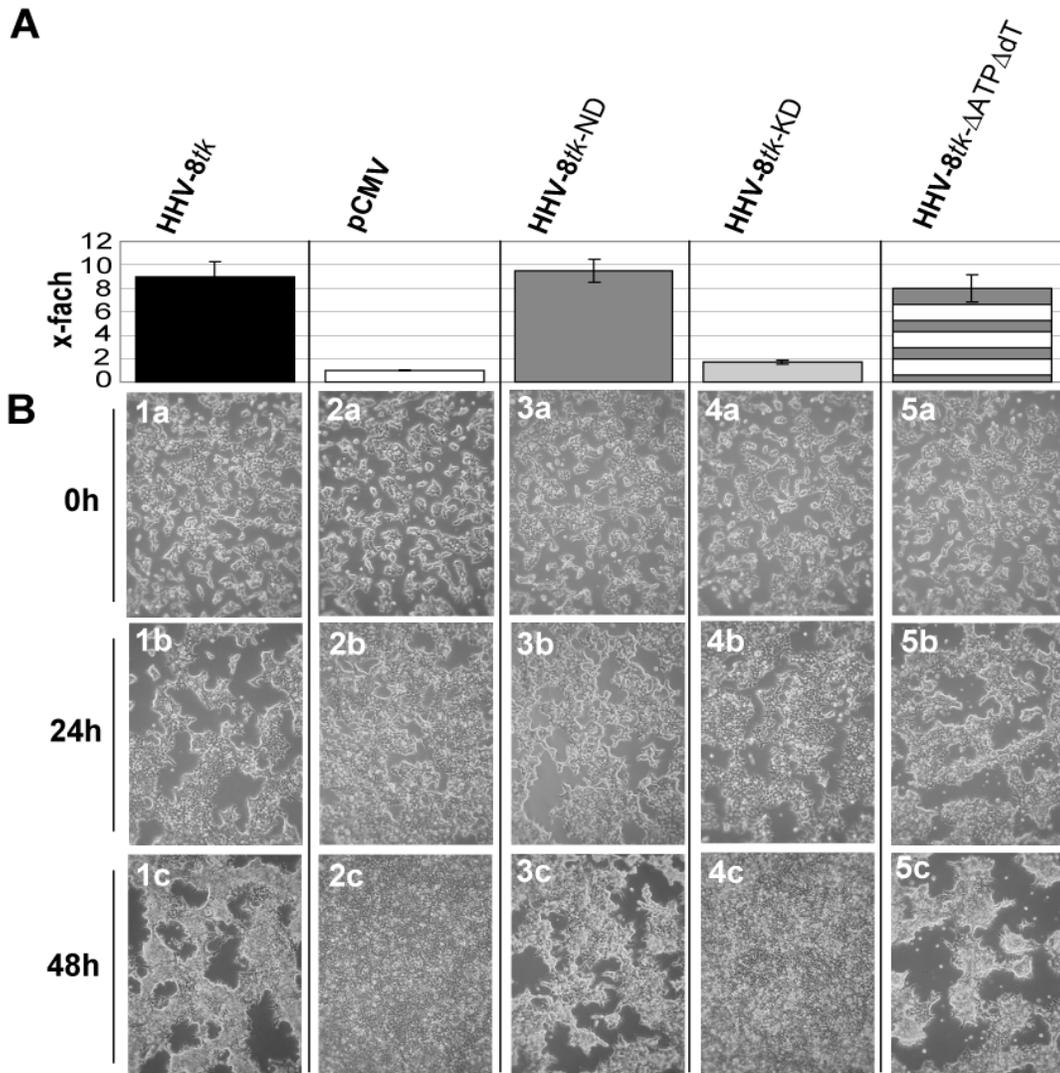


Abb. 29, Der 200 Aminosäuren lange HHV-8tk-N-Terminus induziert den p53-Signalweg und fördert die Entstehung von Zellinseln.

(A) HEK293T-Zellen wurden mit HHV-8tk, dem Leervektor (pCMV), HHV-8tk-ND, HHV-8tk-KD oder HHV-8tk- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT zusammen mit p(p53-RE)-mpTATA-GFP143 in 12er Lochplatten transfiziert. Die p53-Signalweg abhängige Fluoreszenz wurde nach 48 h Inkubation mit Hilfe des Mikroplatten-Fluorometers gemessen, der Hintergrundwert korrigiert und die Induktion als Diagramm dargestellt. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

(B) Repräsentative Phasenkontrastbilder (10x Vergr.) des Zellrasens (A) 0 h (a), 24 h (b) und 48 h (c) nach der Transfektion.

Alle HHV-8tk-Varianten, die den 200 Aminosäuren langen N-Terminus enthielten, induzierten den p53-Signalweg ((A), HHV-8tk (schwarz), HHV-8tk-ND (dunkelgrau) und HHV-8tk- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT (dunkelgrau-weiß) im Gegensatz zur Negativkontrolle (pCMV (weiß)) und der N-Terminus reduzierten Kinasedomänenvariante HHV-8tk-KD (hellgrau). Zusätzlich förderten nur die N-terminalen Varianten, nach 48 h Inkubation, die Entstehung von Zellinseln ((B) 1c, 3c, 5c). Die pCMV und HHV-8tk-KD Transfektionen wiesen dagegen einen geschlossenen Zellrasen auf (2c, 4c).

Die Doppelpunktmutationsvariante HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT verhielt sich ebenso wie HHV-8*tk* und zeigte, dass die biochemische Funktion der Kinasedomäne keine Rolle spielte. Die HHV-8*tk*-KD-Variante, die nur die Kinasedomäne enthielt, konnte so wie die Negativkontrolle den p53-Signalweg nicht induzieren und verursachte keine morphologische Veränderung des HEK293T-Zellrasens.

#### **4.3.9 Der 200 AS HHV-8*tk* N-Terminus erhöht den zellulären p53-Proteinlevel**

Die Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor und die veränderte Zellrasenmorphologie durch die N-terminalen Varianten der HHV-8*tk* wurden bereits gezeigt. Fortführend soll, wie für die HHV-8*tk*, die Erhöhung des endogenen p53-Proteinlevels durch die HHV-8*tk*-Varianten untersucht werden.

Dazu wurden HEK293T-Zellen mit dem Expressionsvektor für p53, p53ex, der HHV-8*tk*, HHV-8*tk*-KD, HHV-8*tk*-ND, oder HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT transfiziert, 48 h später Proteinzellextrakte präpariert und mittels Westernblot analysiert. Es wurden das endogene p53-Proteinlevel und als Kontrolle die Expression des Myc-getaggten Proteins GFP143 und alle HHV-8*tk*-Varianten verfolgt. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden durch die GAPDH Expression überprüft. Von den zu vergleichenden Westernblotbanden wurde das Signal mit Hilfe der densitometrischen Dichtemessung ermittelt. Die Messung wurde auf die jeweils zugehörige GAPDH-Expression standardisiert und zeigt als einfache Erhöhung GFP143 (Abb. 30 (B), schwarzer Balken) transfizierte Zellen im Vergleich zur Transfektion mit HHV-8*tk* (weißer Balken), HHV-8*tk*-KD (dunkelgrauer Balken), HHV-8*tk*-ND (hellgrauer Balken), oder HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT (schwarz-weißer Balken). Die Überexpression von exogenem p53 diente lediglich als Positiv- und Spezifitätskontrolle des verwendeten Antikörpers. Für alle HHV-8*tk*-Varianten, die den 200 AS langen N-Terminus enthielten, konnte eine Erhöhung des endogenen p53-Proteinlevels im Gegensatz zur Negativkontrolle GFP143 gezeigt werden (Abb. 30, (B) HHV-8*tk* weißer Balken, HHV-8*tk*-ND hellgrauer Balken, HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT schwarz-weißer Balken). Die Kinasedomänen-Variante HHV-8*tk*-KD zeigte wie die GFP143 Negativkontrolle keine Erhöhung (Abb. 30, (B) GFP143 schwarzer Balken, HHV-8*tk*-KD dunkelgrauer Balken). Dies folgt dem Trend der vorherigen Analyse, dass der 200 AS N-Terminus der Grund für die HHV-8*tk*-Wirkung ist.

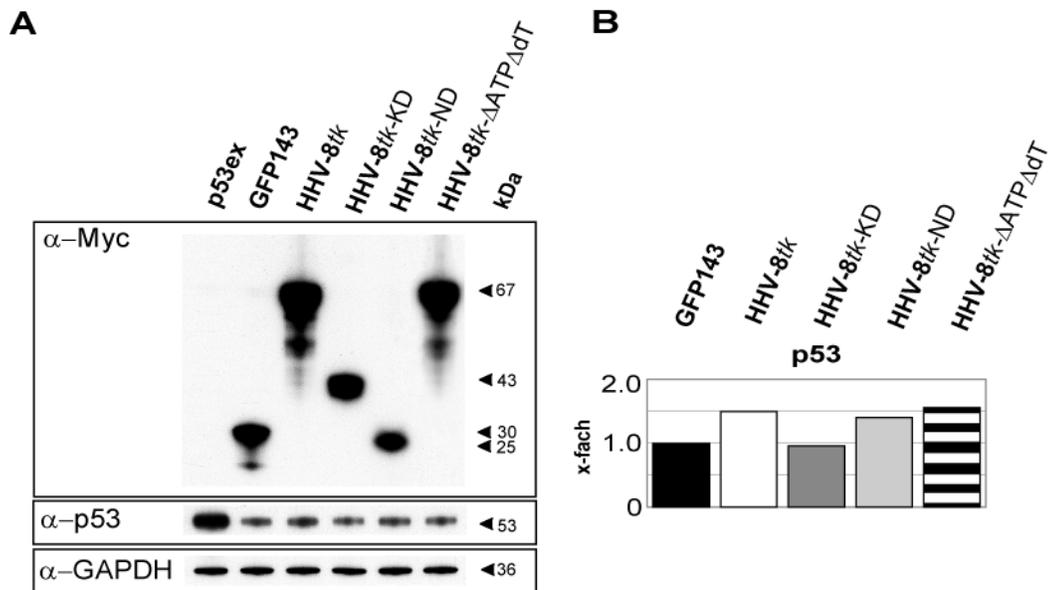


Abb. 30, HHV-8tk, HHV-8tk-ND und HHV-8tk-ΔATP-ΔdT erhöhen das zelluläre p53-Proteinlevel.

(A) Westernblotanalyse von p53ex, HHV-8tk, HHV-8tk-ND, HHV-8tk-KD, oder HHV-8tk-ΔATP-ΔdT transfizierten HEK293T-Zellen. Die Proteinzell-extrakte wurden 48 h nach der Transfektion erstellt. Es wurde die Expression der Myc-getaggten Protein GFP143 (30 kDa), HHV-8tk (67 kDa), HHV-8tk-ND (25 kDa), HHV-8tk-KD (43 kDa), oder HHV-8tk-ΔATP-ΔdT (67 kDa) nachgewiesen (α-Myc Panel) sowie das endogene p53-Level (α-p53-Panel). Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurde zusätzlich die GAPDH-Expression ermittelt (α-GAPDH Panel). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Westernblot von jeweils zwei unabhängigen Experimenten.

(B) Densitometrische Dichtemessung der jeweiligen Westernblotbanden aus (A). Die Messung wurde auf die jeweils zugehörige GAPDH-Expression standardisiert und zeigt als einfache Erhöhung GFP143 transfizierte Zellen (schwarze Balken) gegen HHV-8tk (weiße Balken), HHV-8tk-ND (dunkelgrau Balken), HHV-8tk-KD (hellgrauer Balken), oder HHV-8tk-ΔATP-ΔdT (schwarz-weißer Balken).

HHV-8tk, HHV-8tk-ND und HHV-8tk-ΔATP-ΔdT erhöhen den endogenen p53-Level (HHV-8tk 1,5x, HHV-8tk-ND 1,5x und HHV-8tk-ΔATP-ΔdT 1,5x).

#### 4.3.10 Die N-terminalen HHV-8tk-Varianten lösen die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials aus

Für die HHV-8tk wurde neben der Akkumulation von p53 und der Veränderung der Zellmorphologie zu Zellinseln bei HEK293T-Zellen, auch das Auslösen der Depolarisierung des mitochondrialen Potentials gezeigt. Dies sollte für HHV-8tk-ND, HHV-8tk-KD und HHV-8tk-ΔATP-ΔdT ebenfalls überprüft werden.

HEK293-Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für die HHV-8*tk*, HHV-8*tk*-ND, HHV-8*tk*-KD, HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT sowie zwei Ansätze mit dem Leervektor pCMV transfiziert. Als Positivkontrolle wurde 24 h später eine der beiden Leervektortransfektion mit 200 nM Staurosporin als Positivkontrolle behandelt (pCMV+ST).

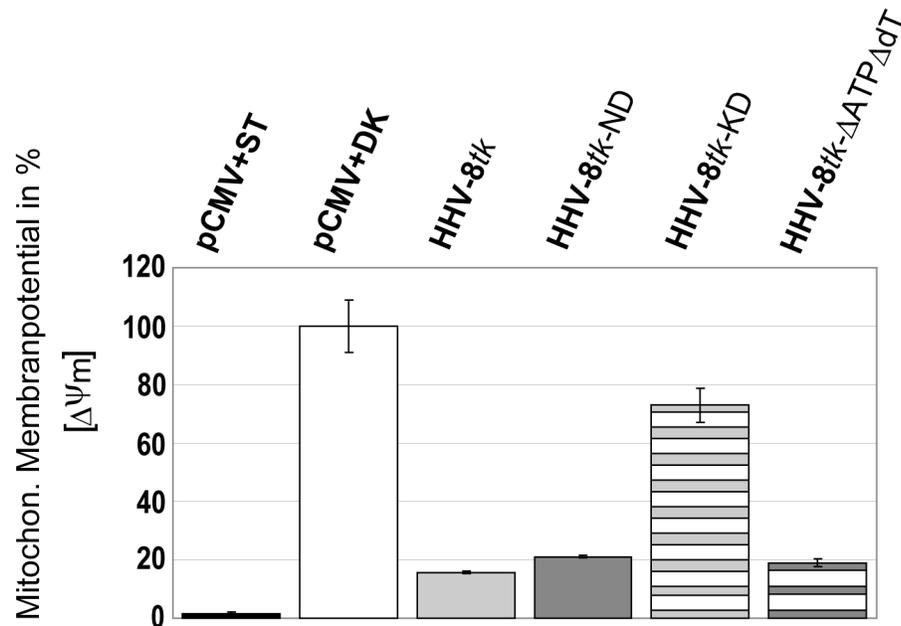


Abb. 31, HHV-8*tk*, HHV-8*tk*-ND und HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT induzieren die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials.

HEK293-Zellen wurden mit pCMV (schwarzer und weißer Balken), HHV-8*tk* (grauer Balken), HHV-8*tk*-ND (dunkelgrauer Balken), HHV-8*tk*-KD (grau-weißer Balken) oder HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT (dunkelgrau-weißer Balken) transfiziert. Nach 24 h wurde die pCMV-Transfektion mit Staurosporin (ST) oder mit der DMSO-Kontrolle (DK) zusätzlich inkubiert. Zur Erfassung des mitochondrialen Potentials wurden die Zellen nach 48 h mit JC-1 gefärbt und das Fluoreszenzsignal mit Hilfe des Plattenlesers bei 590 nm ermittelt. Die Negativkontrolle (pCMV+DK) repräsentiert 100 % der lebenden Zellen mit intakten mitochondrialen Potential. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Teile dieser Abbildung wurden in Abbildung 23 bereits gezeigt.

Wie die mit Staurosporin behandelte Positivkontrolle (schwarzer Balken) induzieren HHV-8*tk*, HHV-8*tk*-ND und HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials, im Gegensatz zur Negativkontrolle (weißer Balken) und HHV-8*tk*-KD.

Die andere Leervektortransfektion diente als Negativkontrolle und wurde nur mit dem Lösungsmittel DMSO (pCMV+DK), in der Konzentration die in der Positivkontrolle enthalten war, versehen. Weitere 24 h später wurde mit Hilfe einer JC-1-Färbung die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials ermittelt. Die Negativkontrolle (Abb. 31, pCMV-DK)

repräsentiert 100 % der Zellen, die unter diesen experimentellen Bedingungen ein intaktes mitochondriales Potential aufweisen.

Alle HHV-8*tk* N-terminalen Varianten (Abb. 31, HHV-8*tk*, HHV-8*tk*-ND und HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT) lösen die Depolarisierung in ähnlichen Maße wie die Staurosporin-Positivkontrolle (pCMV+ST) und die HHV-8*tk* aus. Im Kontrast dazu, zeigte die N-terminale Verkürzungsmutante HHV-8*tk*-KD nur eine relativ leichte Veränderung des mitochondrialen Potentials. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der HHV-8*tk*-N-Terminus auch die Depolarisation des mitochondrialen Potentials auslöst.

#### **4.3.11 EBV*tk* induziert weder p53 als Transkriptionsfaktor, noch eine Veränderung der Zellzahl oder Morphologie des Zellrasens**

EBV gehört wie HHV-8 zu den humanen Gammaherpesviren. Wie die Analyse der Thymidinkinasen der Gammaherpesviren im Vergleich zu den Alphaherpesviren zeigte, waren die N-Termini der Gammaherpesvirenvarianten um ca. 250 Aminosäuren für die EBV*tk* und etwa 200 AS für die HHV-8*tk* verlängert. Da der N-terminale Teil der HHV-8*tk* p53 als Transkriptionsfaktor aktiviert, die Zellzahl verringerte und die Zellmorphologie des Zellrasens veränderte, wurden diese Wirkungen initial auch für die EBV-Thymidinkinase überprüft. Dazu wurde ein p53-Expressionsvektor als Positivkontrolle (p53ex), der Leervektor pCMV als Negativkontrolle, ein Expressionsvektor für die HHV-8*tk* oder EBV*tk* zusammen mit den p53-Reporterplasmid p(p53-RE)-mpTATA-GFP143 in HEK293T-Zellen transfiziert. Danach wurde die p53 induktionsabhängige Expression von GFP143 durch die Messung der Fluoreszenz bestimmt, der Hintergrundwert korrigiert und die Induktion als Diagramm dargestellt (Abb. 32, (B) Diagramm). Zusätzlich wurde die Zellzahl 0 h, 24 h und 48 h nach der Transfektion bestimmt (Abb. 32, (C) Diagramm) und Phasenkontrastbilder der EBV*tk*-Transfektion aufgenommen ((D) 1a-1c) um die Morphologie der Zellen zu beurteilen.

Als Kontrolle wurden die Expression der Myc-getaggten EBV*tk*, HHV-8*tk* und GFP143 verfolgt. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden durch die GAPDH Expression überprüft (Abb. 32, (A)).

Das EBV*tk*-Volllängenprotein induzierte 48 h nach der Transfektion nicht p53 als Transkriptionsfaktor, was vergleichbar zur pCMV-Negativkontrolle war (Abb. 32, (B) dunkelgrauer Balken EBV*tk*, weißer Balken pCMV).

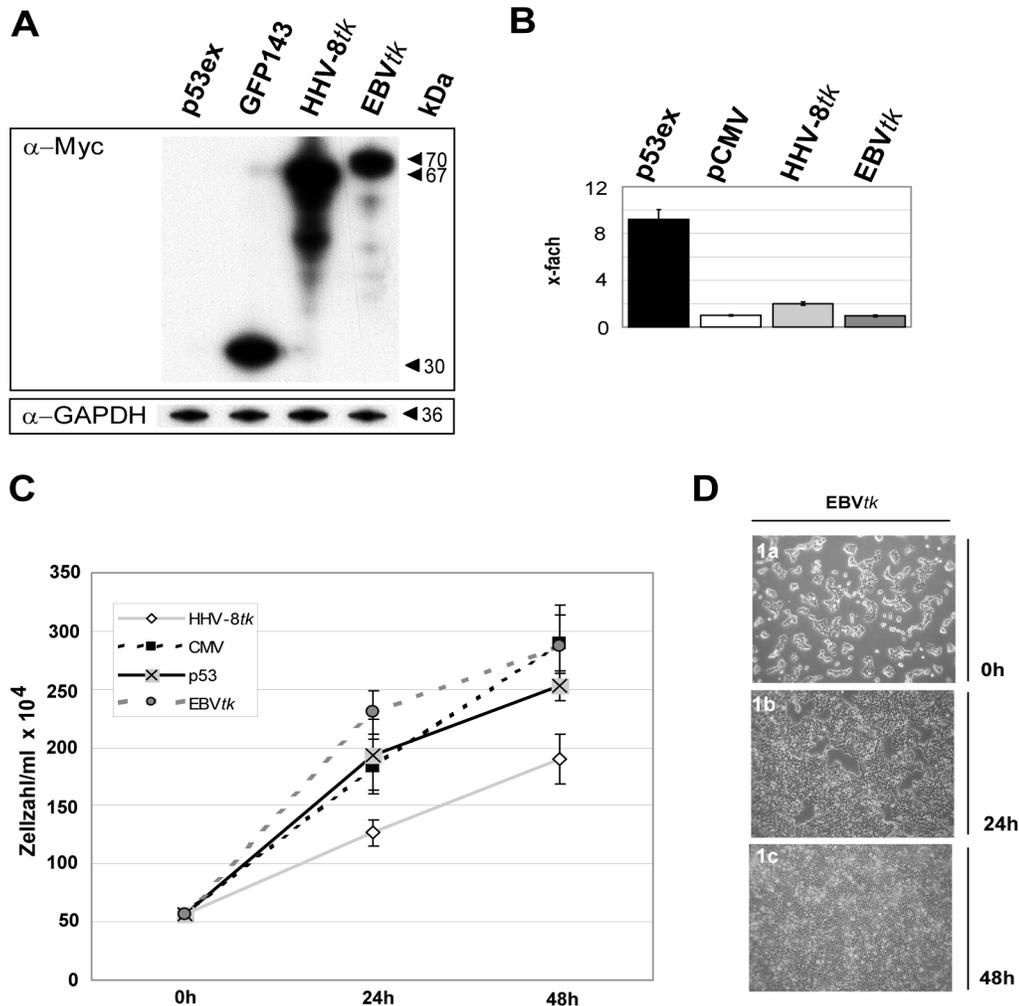


Abb. 32, Die EBVtk induziert weder p53 als Transkriptionsfaktor, noch verändert diese die Zellzahl oder die Entstehung von Zellinseln.

(A) Westernblotanalyse der EBVtk, HHV-8tk, oder GFP143 transfizierten HEK293T-Zellen. Die Proteinzell-extrakte wurden 48 h nach der Transfektion erstellt und die Expression der Myc-getaggten Protein EBVtk (70 kDa), HHV-8tk (67 kDa) und GFP143 (30 kDa), nachgewiesen (α-Myc Panel). Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurde die GAPDH-Expression ermittelt (α-GAPDH Panel). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Westernblot von jeweils zwei unabhängigen Experimenten.

(B) HEK293T-Zellen wurden mit dem p53-Expressionsplasmid (p53ex), dem Leervektor (pCMV), HHV-8tk oder EBVtk zusammen mit dem p53-Reporterplasmid p(p53-RE)-mpTATA-GFP143 in 24er Lochplatten transfiziert. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Mikroplattenlesers bei 530 nm gemessen, der Hintergrundwert korrigiert und die Induktion als Diagramm dargestellt. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

(C) HEK293T-Zellen wurden mit dem p53-Expressionsplasmid (p53ex / schwarze Linie), dem Leervektor (pCMV / gestrichelte schwarze Linie), HHV-8tk (HHV-8tk / graue Linie) oder EBVtk (EBVtk / gestrichelte graue Linie) transfiziert. Die Zellen wurden zum Transfektionszeitpunkt und danach alle 24 h gezählt, bis zur Konfluenz des Zellrasens der Negativkontrolle (48 h nach Transfektion). Teile dieser Abbildung wurden in Abb. 22 bereits gezeigt.

(D) 0 h, 24 h und 48 h nach der Transfektion wurden von EBVtk transfizierten Zellen repräsentative Phasenkontrastbilder aufgenommen (10x).

Der Transkriptionsfaktor p53 wird durch EBVtk ((B) dunkeln-grauer Balken, EBVtk), so wie die pCMV-Negativkontrolle (pCMV), nicht induziert, im Gegensatz zur p53-Positivkontrolle und HHV-8tk (p53ex und HHV-8tk). Des weiteren reduzierte EBVtk ((C) gestrichelte graue Linie), wie die Negativkontrolle nicht das Zellwachstum im Gegensatz zu HHV-8tk (graue Linie). Die Morphologie des Zellrasen ist nach 48 h geschlossen und nicht verändert ((D) 1c).

Im Gegensatz dazu war für die p53ex Positivkontrolle (schwarzer Balken) und HHV-8tk (hellgrauer Balken) eine Transkriptionsaktivierung zu beobachten. Des weiteren reduzierte die EBVtk nicht die Zellzahl (Abb. 32, (C) grau gestichelte Linie) oder löst die Entstehung von Zellinseln aus ((D) 1c).

Für die EBVtk konnten nicht die selben Wirkungen wie für die HHV-8tk beobachtet werden. Dieses Ergebnis reflektiert wahrscheinlich die fehlende Sequenzhomologie der beiden humanen Gammaherpesviren-TK-N-Termini und wird dadurch ergänzt, dass die in der Literatur erwähnte HHV-8tk zellmorphologisch veränderte Wirkung, bei gleicher Überprüfung nicht für die EBVtk gefunden werden konnte (Gill *et al.* 2005).

#### **4.3.12 HHV-8tk und Varianten sind im Gegensatz zur EBVtk in der ganzen Zelle lokalisiert**

Die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen kann Hinweise auf mögliche Interaktionen geben, die Kompartimentabhängig sind und grenzt dadurch mögliche Interaktionspartner ein. Weiterhin ist es möglich, dass die verschiedenen HHV-8tk-Varianten unterschiedlich in der Zelle lokalisieren und deswegen verschiedene Wirkungen ausüben. Durch den Vergleich der Lokalisierung in HeLa- und p53 negativen Human-Osteogenic-Sarcoma (SaOS)-2-Zellen soll zusätzlich geklärt werden, ob eine subzelluläre Lokalisierung p53 abhängig ist. Gleichzeitig soll damit untersucht werden, ob die subzelluläre Lokalisierung vom Zelltyp abhängt.

Für die subzelluläre Lokalisierung wurde der Leervektor pCMV als Negativkontrolle sowie Expressionsvektoren für das rot fluoreszierende Protein (RFP), EBVtk, HHV-8tk, HHV-8tk-ND, HHV-8tk-KD und HHV-8tk- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT in HeLa und SaOS-2-Zellen transfiziert. Nachfolgend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und eine immunzytochemische Färbung (IZC) für die Myc-taggen Protein mit Alexa-488-Markierung (grün), Phalloidin mit Alexa-568-Markierung (rot) und DAPI (blau) durchgeführt.

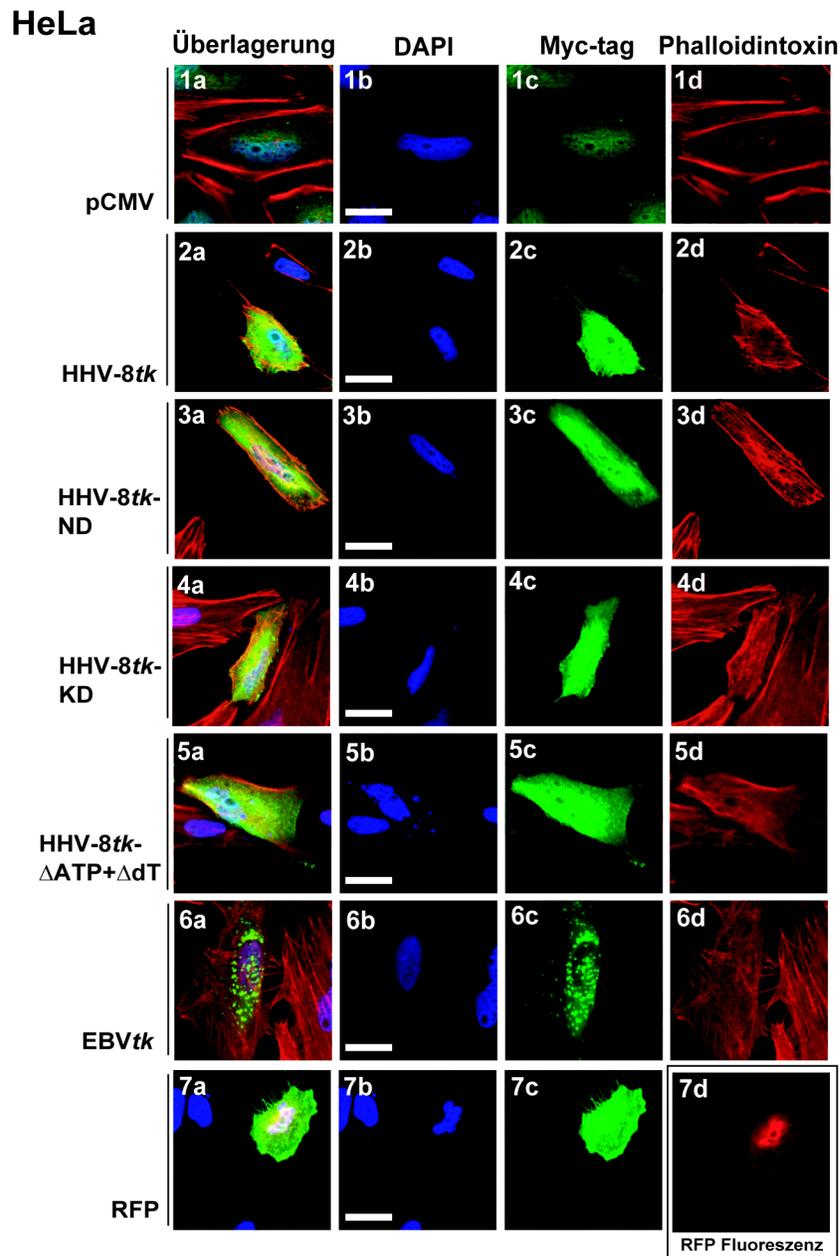


Abb. 33, Die Lokalisierung von HHV-8*tk*, HHV-8*tk*-ND, HHV-8*tk*-KD, und HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT kann im Gegensatz zur EBV*tk* in HeLa-Zellen in der ganzen Zelle beobachtet werden.

(A) IZC Färbung von pCMV, HHV-8*tk*, HHV-8*tk*-ND, HHV-8*tk*-KD, HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT und EBV*tk* transfizierten HeLa-Zellen. Es wurde die Expression der Myc-getaggen Proteine ( $\alpha$ -Myc Panel, grün), Beta-Actin durch Phalloidin färbung (Phalloidin, rot) und DNA Kernfärbung (DAPI, blau) nachgewiesen. RFP wurde nicht Phalloidin gefärbt, sondern die Eigenfluoreszenz nachgewiesen (7d). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus vier unabhängigen Experimenten. Der Größenbalken (DAPI) entspricht 20  $\mu$ m. HHV-8*tk*, HHV-8*tk*-ND, HHV-8*tk*-KD, und HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT sind wie RFP gleichmäßig in HeLa-Zellen verteilt. EBV*tk* lokalisiert dagegen in einem gesprenkelten Muster im Zytosol.

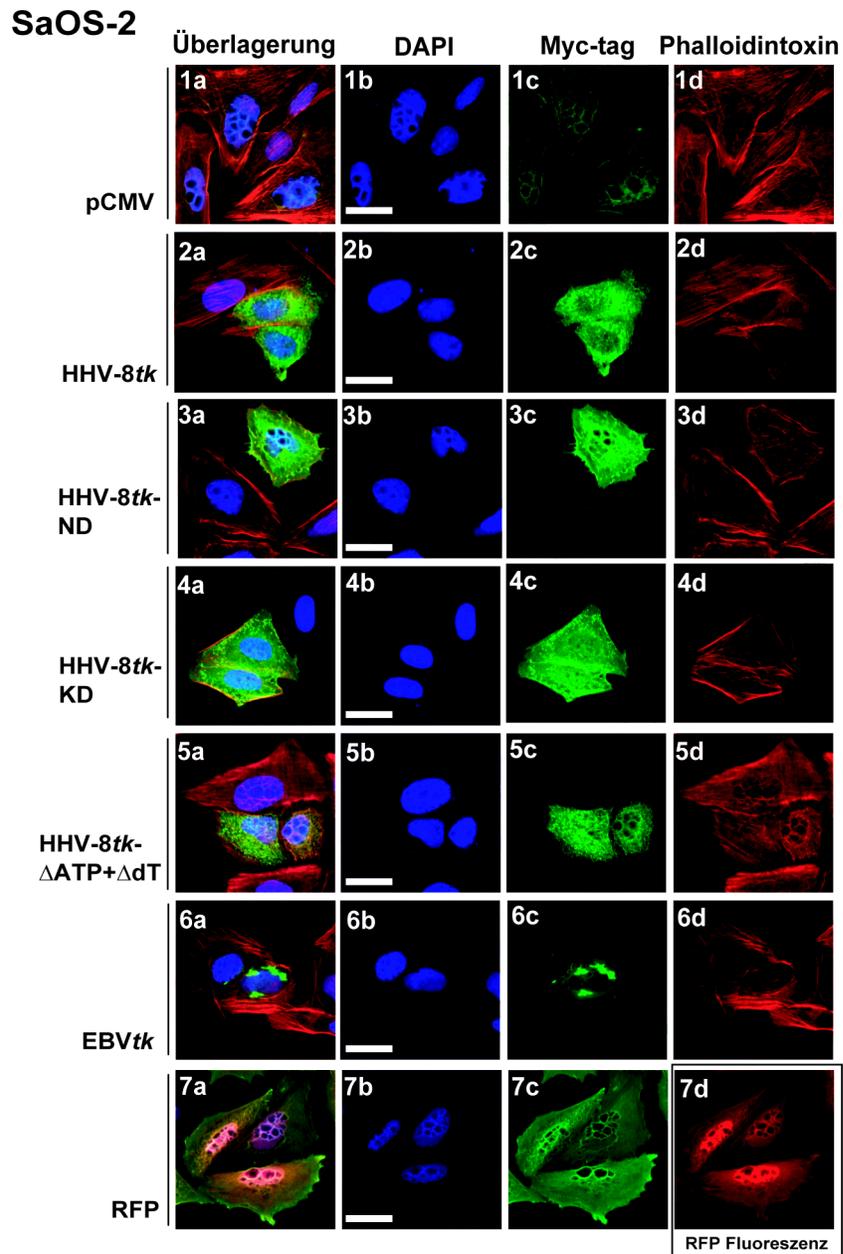


Abb. 34, Die Lokalisierung von HHV-8tk, HHV-8tk-ND, HHV-8tk-KD, und HHV-8tk- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT kann im Gegensatz zur EBVtk in SaOs-2-Zellen in der ganzen Zelle beobachtet werden.

(A) IZC Färbung von pCMV, HHV-8tk, HHV-8tk-ND, HHV-8tk-KD, HHV-8tk- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT und EBVtk transfizierten SaOS-2-Zellen. Es wurde die Expression der Myc-getaggtten Protein ( $\alpha$ -Myc Panel, grün), Beta-Actin durch Phalloidin färbung (Phalloidin, rot) und DNA Kernfärbung (DAPI, blau) nachgewiesen. RFP wurde nicht Phalloidin gefärbt, sondern die Eigenfluoreszenz nachgewiesen (7d). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus vier unabhängigen Experimenten. Der Größenbalken (DAPI) entspricht 20  $\mu$ m. HHV-8tk, HHV-8tk-ND, HHV-8tk-KD, und HHV-8tk- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT sind wie RFP komplett in SaOS-2-Zellen verteilt. EBVtk lokalisiert als Ansammlung im Zytosol.

Die RFP-Transfektion aufgrund der Eigenfluoreszenz von RFP im Rotspektrum nicht Phalloidin gefärbt und direkt nachgewiesen. Die Phalloidintoxinfärbung dient der Aktin- und DAPI der Zellkerngegenfärbung. Weiterhin wird RFP als Expressionspositivkontrolle in der IZC verwendet.

HHV-8*tk* und alle Varianten ließen sich im Zytosol und Kern der HeLa-Zellen verteilt nachweisen (Abb. 33+34, 2c, 3c, 4c oder 5c). Diese Lokalisierung ist vergleichbar mit der von RFP (7c und 7d), für das diese Verteilung beschrieben ist (Living Colour Manual, Clontech). Die Lokalisierung der N-terminalen Varianten (HHV-8*tk*, HHV-8*tk*-ND, HHV-8*tk*- $\Delta$ ATP- $\Delta$ dT) unterschied sich nicht von der des N-terminalen Deletionskonstrukts HHV-8*tk*-KD.

Im Gegensatz dazu wurde die EBV*tk* nicht verteilt in der Zelle gefunden, sondern zeigte ein gesprenkeltes Muster in HeLa-Zellen (Abb. 33, 6c) oder eine Ansammlung von Aggregaten in SaOS-2-Zellen (Abb. 34, 6c). Die beobachtete Hintergrundfärbung der Negativkontrolle pCMV war durch das zelluläre, im Zellkern lokalisierende Myc-Protein begründet (1). Die Hintergrundfärbung durch das Myc-Protein war gering im Vergleich zur stärkeren Färbung der EBV*tk*, HHV-8*tk* und Varianten (Abb. 33 + 34, 1c).

Die Lokalisierung der HHV-8*tk* und deren Varianten ist in beiden Zelllinien in etwa gleich und zeigt keine Veränderung durch das Fehlen der p53-Expression bei SaOS-2-Zellen. Für die EBV*tk* konnte ein unterschiedliches Verteilungsmuster nachgewiesen werden (Abb. 33 + 34, 6c).

#### **4.3.13 Die HHV-8*tk*-Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor wird durch LANA2 inhibiert**

HHV-8 kodiert für das Latent assoziiertes nukläres Antigen LANA-2, ein zu den „Interferon Regulatory Factor“ (IRF) homologes Gen, das unter anderem direkt mit p53 interagiert und die p53-Transkriptionsaktivierung inhibieren kann (Rivas *et al.* 2001). LANA2 wurde wegen der p53-Interaktion und der Bedeutung während der Latenz (in B-Zellen) und im lytischen Zyklus für die Analyse des Zusammenspiels mit der HHV-8*tk* ausgewählt. Mit Hilfe von LANA2 soll analysiert werden, ob sich die HHV-8*tk* induzierte Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor inhibieren läßt.

HEK293T-Zellen wurden mit dem p53-Reporterplasmid und Doppelkombinationen aus entweder LANA2 mit pCMV, HHV-8*tk* sowie p53, oder pCMV mit pCMV, HHV-8*tk* sowie p53

transfiziert. Nach 48 h wurde die p53 induktionsabhängige Expression des Reportergens GFP143 durch die Messung der Fluoreszenz bestimmt, der Hintergrundwert korrigiert und die Induktion als Diagramm dargestellt (Abb. 35). Die Transfektion von pCMV (Abb. 35, graue Balken) mit oder ohne LANA2 (schwarze Balken) zeigte 48 h nach der Transfektion keinen Unterschied untereinander und wies darauf hin, dass LANA2 selbst nicht den Transkriptionsfaktor p53 aktivierte oder einen Einfluss auf die Aktivierung des Reporterplasmids hatte. Als Positivkontrolle wurde p53 mit pCMV transfiziert (Abb. 35, graue Balken). Diese Kombination induzierte die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 nach 48 h deutlich.

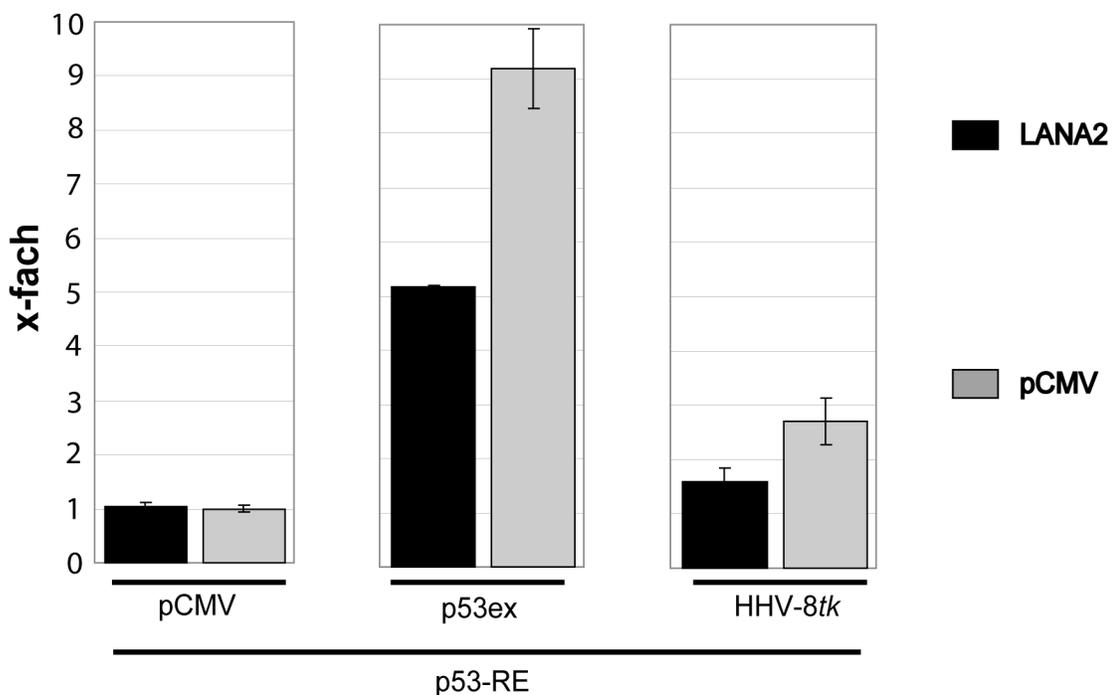


Abb. 35, LANA2 inhibiert die Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor durch die HHV-8tk.

HEK293T-Zellen wurden mit dem p53-Reporterplasmid p(p53-RE)-mpTATA-GFP143 und Kombinationen aus pCMV, dem p53-Expressionsplasmid (p53ex) oder HHV-8tk zusammen mit entweder LANA2 oder pCMV in 24er Lochplatten transfiziert.

Die Fluoreszenz von GFP143 wurde nach 48 h Inkubation bei 530 nm mit Hilfe des Mikroplatten-Fluorometers gemessen, der Hintergrundwert korrigiert und die Induktion als Diagramm dargestellt. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Die Transkriptionsaktivierung von p53 durch p53ex oder HHV-8tk (HHV-8tk) wird durch LANA2 (schwarze Balken) inhibiert.

Bei der p53-Transfektion mit LANA2 konnte eine Verminderung von ca. der Hälfte beobachtet werden. Dieses Inhibierungspotential von LANA2 entsprach der in der Literatur beschriebenen Wirkung (Rivas *et al.* 2001). Die Induktion des Transkriptionsfaktors p53 durch die HHV-8*tk* war in der Transfektion mit pCMV (Abb. 35, graue Balken) nach 48 h zu erkennen. LANA2 verminderte (Abb. 35, schwarze Balken), wie bei der Positivkontrolle, auch hier die Induktion nach 48 h um ca. die Hälfte.

Einerseits konnte das Inhibierungspotential von LANA2, wie in der Literatur beschrieben, beobachtet und andererseits wirkungsvoll die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 durch HHV-8*tk* inhibiert werden.

#### **4.3.14 Die HHV-8*tk* induzierte Erhöhung des endogenen p53-Levels wird durch LANA2 nicht inhibiert**

Es konnte gezeigt werden, dass LANA2 die Aktivierung der Transkription von p53 durch die HHV-8*tk* inhibieren kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass die HHV-8*tk* die p53-Akkumulation auslöst. Für LANA2 ist eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit p53 bekannt (Rivas *et al.* 2001). Es ist theoretisch möglich, dass LANA2 darüber einen Einfluss auf die durch die HHV-8*tk* ausgelöste Erhöhung des endogenen p53-Spiegels hat. Es soll untersucht werden, in wie weit die LANA2-p53-Interaktion zur Unterdrückung des durch die HHV-8*tk* induzierte Erhöhung des endogenen p53-Spiegels beitragen kann.

Dabei wird der Einfluss von LANA2 auf das endogene p53-Proteinlevel in Anwesenheit eines zweiten Proteins, wie zum Beispiel die HHV-8*tk*, in einer transienten Koexpression überprüft. Bei der Doppelexpression von zwei Proteinen basierend auf dem gleichen Expressionsvektor, kann es zu gegenseitiger Beeinflussung der Expressionsvektoren kommen, die eine scheinbare Wirkung vortäuschen könnte. Um eine Placebowirkung von LANA2 auf den endogenen p53-Level durch eine Kreuzinteraktion während der Doppelexpression auszuschließen, wurden parallel auch Einfach-Expressionslevel analysiert. Damit die Transfektionsverhältnisse vergleichbar blieben, wurde die absolut transfizierte DNA-Menge identisch gehalten, sodass bei Doppelexpressionen die DNA-Menge zwischen den Kandidaten aufgeteilt und in Einfachexpression der fehlende Kandidat durch den pCMV-Leervektor ersetzt wurde.

HEK293T-Zellen wurden mit Kombinationen aus pCMV/p53ex, pCMV/GFP143, pCMV/HHV-

8tk, pCMV/LANA2, GFP143/LANA2, GFP143/HHV-8tk oder LANA2/HHV-8tk Expressionsvektoren transfiziert. Anschließend wurden 48 h später Proteinzellextrakte präpariert und mit Hilfe des Westernblots analysiert. Es wurden das endogene p53-Proteinlevel und als Kontrolle die Expression der Myc-getaggten Proteine GFP143, HHV-8tk und LANA2 analysiert.

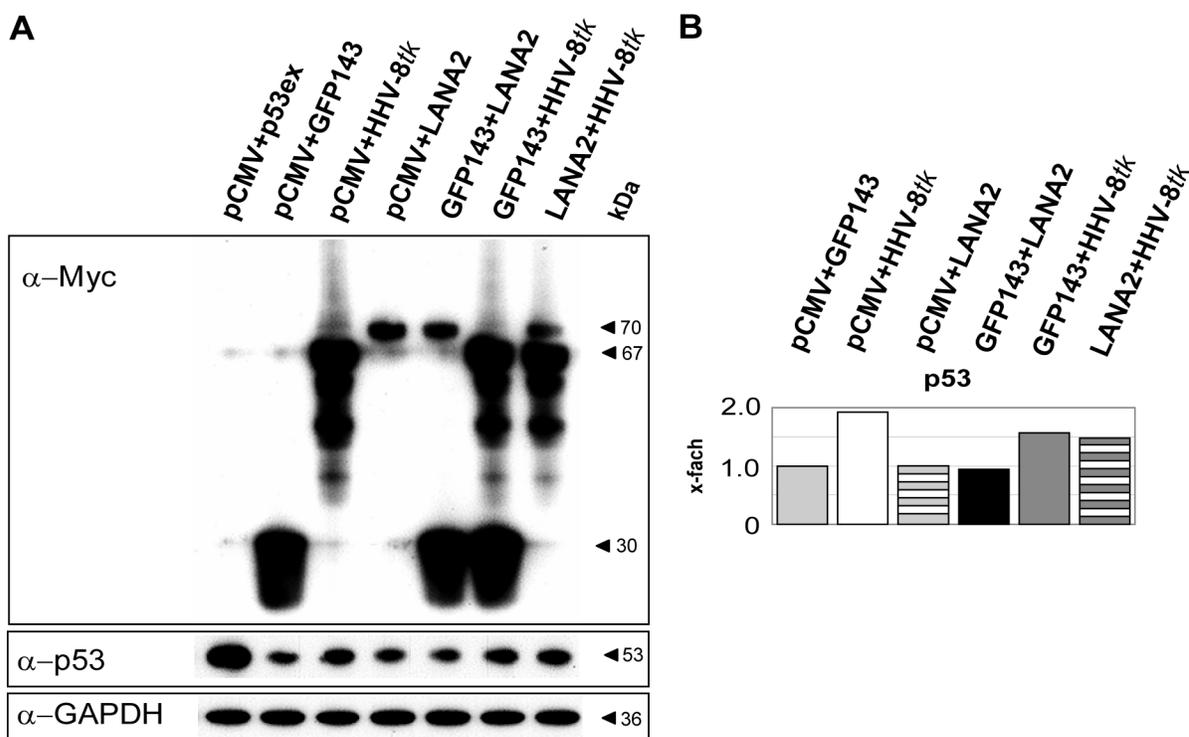


Abb. 36, LANA2 inhibiert nicht die HHV-8tk Induktion des endogenen p53-Proteinlevels.

(A) Westernblotanalyse von HEK293T-Zellen die mit Kombinationen aus pCMV/p53ex, pCMV/GFP143, pCMV/HHV-8tk, pCMV/LANA2, GFP143/LANA2, GFP143/HHV-8tk oder LANA2/HHV-8tk für 48 h transfiziert wurden. Anschließend wurde ein RIPA-Extrakt präpariert, durch die PAGE der Größe nach getrennt und im Westernblot transfertiert. Es wurde die Expression der Myc-getaggtten Proteine GFP143 (30 kDa), HHV-8tk (67 kDa) oder LANA2 (70 kDa) nachgewiesen (α-Myc Panel) sowie der endogene p53-Level (α-p53-Panel)). Der GAPDH-Expressionsnachweis zeigt den Auftrag gleicher Proteinmengen (α-GAPDH Panel). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Westernblot von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

(B) Densitometrische Dichtemessung der jeweiligen Westernblotbanden (A). Die Messung wurde auf die jeweils zugehörige GAPDH-Expression standardisiert und zeigt als einfache Induktion pCMV/GFP143 (grauer Balken).

Die durch HHV-8tk verursachte Induktion des endogenen p53-Proteinlevels ((B), p53-Panel, pCMV/HHV-8tk weißer Balken, GFP143/HHV-8tk dunkelgrauer Balken) wurde durch die LANA2 Koexpression nicht inhibiert (LANA2/HHV-8tk dunkelgrau-weißer Balken).

Die Äquivalenz der wurde die aufgetragenen Proteinmengen wurden mittels der GAPDH-Expression überprüft.

Das Signal der p53-Westernblotbanden wurden mit Hilfe der densitometrischen Dichtemessung ermittelt. Die Messung wurde auf die jeweils zugehörige GAPDH-Expression standardisiert und zeigt als einfache Induktion die der Negativkontrolle pCMV/GFP143 (Abb. 36, (B) hellgrauer Balken).

Die HHV-8*tk* induzierte Erhöhung des endogenen p53-Proteinlevels (Abb. 36, (B), p53-Panel, weißer Balken) kann auch hier im Gegensatz zu den Negativkontrollen pCMV/GFP143 (hellgrauer Balken), pCMV/LANA2 (hellgrau-weißer Balken) und GFP143/LANA2 (schwarzer Balken) bestätigt werden. Der endogene p53-Spiegel der Negativkontrollen war in den Doppel- (GFP/LANA2) oder Einfachexpressionen (pCMV/GFP143, pCMV/LANA2) vergleichbar. Zusätzlich zeigte sich, dass LANA2 allein weder in der Einzelexpression (pCMV/LANA2) noch in der Doppelsexpression (GFP143/LANA2) den endogenen p53-Level beeinflusste.

Die HHV-8*tk* Erhöhung des endogenen p53-Levels ging in der Doppelsexpression (Abb. 36, (B) dunkelgrauer Balken) verglichen mit der Einzelexpression (weißer Balken) leicht zurück, blieb aber über dem Level der Negativkontrollen. In der Koexpression der HHV-8*tk* mit LANA2 (dunkelgrau-weißer Balken) wurde keine Veränderung des endogenen p53-Levels im Vergleich zu dem mit GFP143 (dunkelgrauer Balken) ermittelt. Für LANA2 kann somit kein Einfluss auf die Erhöhung des endogenen p53-Levels durch die HHV-8*tk* gezeigt werden.

Die p53-Überexpression diente lediglich als Positivkontrolle für den verwendeten Antikörper (Abb. 36, p53-Panel, pCMV-p53ex). Die Überprüfung der Expressionslevel der Einzel- oder Doppelsexpression ergab stetig vergleichbare Proteinbanden (Abb. 36, Myc-Tag Panel) was ein Hinweis ist, dass keine gegenseitige negative Beeinflussung der Expression durch die Doppelsexpression auf Basis des gleichen Expressionsvektors stattfindet.

Für LANA2 konnte zuvor die Blockierung der HHV-8*tk* induzierten Transkriptionsaktivierung von p53 gezeigt werden. LANA2 hatte aber keinen Einfluss auf die Erhöhung des endogenen p53-Levels durch die HHV-8*tk*. Damit scheint LANA2 ein potentieller Gegenspieler zur Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor durch HHV-8*tk* zu sein. Eine vollständige Unterdrückung der HHV-8*tk* induzierten Transkriptionsaktivierung von p53 durch LANA2 konnte aber nicht beobachtet werden.

#### 4.3.15 Die HHV-8tk als lytisch induziertes Gen

BCBL-1 ist eine Modelzelllinie zur Analyse des lytischen Zyklus von HHV-8. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um B-Zellen, die immortalisiert und mit HHV-8 latent infiziert sind. In diesen Zellen kann der lytische Zyklus durch chemische Reagenzien wie TPA, PFA<sub>lyt</sub> oder Butyrat induziert werden. Die lytischen Zellen entlassen authentische Virionen, die in der Lage sind andere Wirtszellen zu infizieren. Am Ende des lytischen Zyklus wird die Wirtszelle zerstört und dadurch die Zellpopulation verringert. Als therapeutischer Ansatz wird zur Blockierung der Virusproduktion in lytischen Zellen das Nukleosidanalogen Ganciclovir (GCV) verwendet. Durch Ganciclovir wird die virale Replikation inhibiert und als Folge weniger infektiöse Viruspartikel gebildet. Durch den Rückgang der Virusproduktion wäre auch eine Abmilderung der Schäden bei den Wirtszellen mit einer verminderten Zelltodrate zu erwarten. Die therapeutische Behandlung von lytisch induzierten Wirtszellen mit Ganciclovir änderte aber nichts an der Zelltodrate lytischer Wirtszellen im Vergleich zur Zelltodrate ohne Ganciclovir (Klass *et al.* 2005). Dies weist auf einen durch die lytische Induktion abhängigen, aber durch Ganciclovir nicht inhibierten Prozess hin, der die Wirtszelle während des lytischen Zyklus schädigt. Weiterhin scheint der lytisch induzierte Zelltod der Wirtszelle keine alleinige Folgeerscheinung der Virionenproduktion zu sein, sondern könnte auch während des lytischen Zyklus durch das Virus selbstständig induziert werden.

Es wurde überprüft, ob die HHV-8tk im lytischen Zyklus transkribiert wird und welchen Einfluss Ganciclovir auf die Transkription eines lytischen (ORF 26), eines latenten (LANA1), eines zellulären ( $\beta$ -Aktin) und, bei Transkription, auf die HHV-8-Thymidinkinase hat.

ORF 26 dient als Positivkontrolle einer lytisch induzierten und durch Ganciclovir inhibierten Transkription eines HHV-8-Gens. LANA1 ist ein latentes HHV-8-Gen, das sich nicht zusätzlich lytisch induzieren lassen sollte und deshalb, wie des zelluläre „house keeping gen“  $\beta$ -Aktin, als Transkriptionskontrolle diente. Die zum Blockieren der Virenproduktion genutzte Konzentration von Ganciclovir (20  $\mu$ M) wurde so gewählt, dass bei dem gewählten Wirtszelltyp die Virenreplikation effektiv unterdrückt wird, die behandelten Zellen dies tolerierten und keine erhöhte Zelltodrate auftrat (Klass *et al.*, Fujimuro *et al.*). Es wurden BCBL-1-Zellen ausgesät und entweder mit Butyrat induziert oder nicht induziert sowie mit oder ohne Ganciclovir inkubiert. Alle 24 h wurde die Zellzahl ermittelt (Abb. 37) und von jeder Inkubationsbedingung Zellen geerntet, Gesamt-RNA präpariert und in cDNA umgeschrieben.

Die cDNA diente als Template für die semi-quantitative PCR-Analyse, um die Transkription der entsprechenden mRNA von  $\beta$ -Aktin, ORF 26, LANA1 und der HHV-8*tk* zu überprüfen (Abb. 42, (A) und (B)).

#### 4.3.15.1 Ganciclovir hat keinen Einfluss auf die Zellzahl lytisch induzierter und nicht induzierter BCBL-1-Zellen

Die bei jeder Inkubationsbedingung gezählten Zellen wurden gegen die Zeit aufgetragen und als Wachstumsdiagramm dargestellt (Abb. 37). Nicht induzierte BCBL-1-Zellen teilen sich ca. alle 24 h (Abb. 37, graue Linie) im Gegensatz zu mit Butyrat induzierten Zellen, die sich nicht vermehren und in der initialen Zellzahl verblieben (graue gestrichelte Linie).

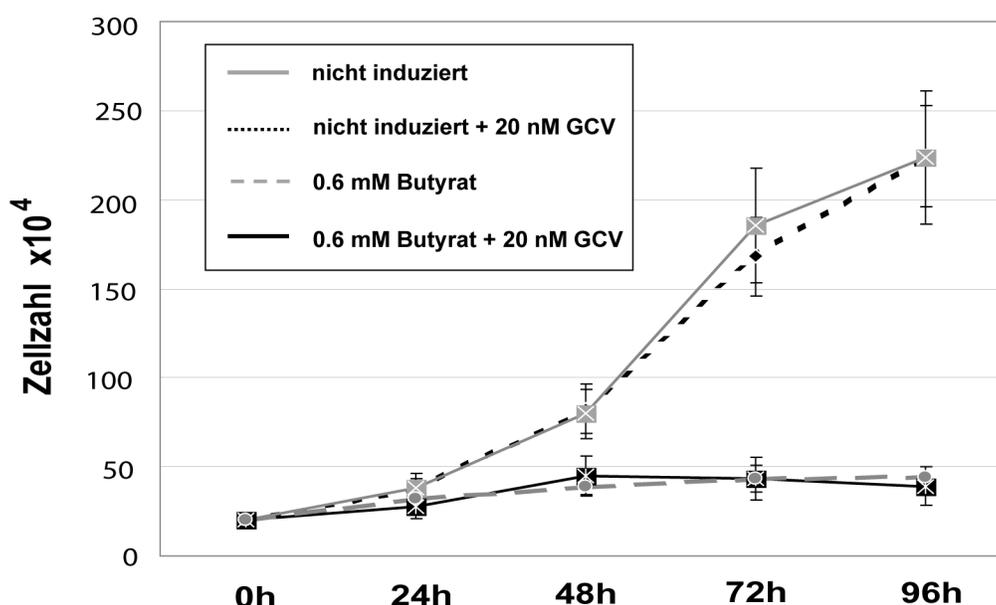


Abb. 37, Ganciclovir hat keinen Einfluss auf die Zellzahl lytisch mit Butyrat induzierter und nicht induzierter BCBL-1-Zellen.

Diagramm bei dem die ermittelten Zellzahlen gegen die Messzeitpunkte aufgetragen wurden. Es wurden BCBL-1-Zellen nicht induziert (graue Linie (nicht induziert)), nicht induziert mit 20 nM Ganciclovir (schwarze gepunktete Linie (nicht induziert + GCV)) inkubiert, mit 0,6 mM Butyrat induziert (graue gestrichelte Linie (0,6 mM Butyrat)) und mit 0,6 mM Butyrat induziert sowie 20 nM Ganciclovir (schwarze Linie (0,6 mM Butyrat+20nM GCV)) inkubiert. Nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Inkubation wurden für jede Inkubationsbedingung die Zellen gezählt. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

0,6 mM Butyrat induziert den lytischen Zyklus in BCBL-1-Zellen, was im Gegensatz zu nicht induzierten, durch keine Zunahme der Proliferation zu erkennen ist. Ganciclovir hat keinen Einfluss auf die Zellzahl lytischer und nicht lytischer BCBL-1-Zellen.

Die Zugabe von Ganciclovir hatte weder bei nicht induzierten (Abb. 37, schwarze gestrichelte Linie) noch bei Butyrat induzierten BCBL-1-Zellen (schwarze Linie) einen Einfluss auf die Zellzahl im Vergleich zur Inkubation ohne Ganciclovir.

#### **4.3.15.2 Ganciclovir inhibiert in lytischen BCBL-1-Zellen die Transkription von ORF 26 wahrscheinlich stärker als die der HHV-8tk**

Bei der therapeutische Behandlung von lytisch induzierten Wirtszellen mit Ganciclovir änderte sich nichts an der Zelltodrate im Vergleich zur Zelltodrate der lytisch induzierten Wirtszellen ohne Ganciclovir (Klass *et al.* 2005). Dies wies auf einen durch die lytische Induktion abhängigen, aber durch Ganciclovir nicht inhibierten Prozess hin, der die Wirtszelle während des lytischen Zyklus schädigt. Die HHV-8tk ist ein HHV-8-Gen, dessen Transkription im lytischen Zyklus beschrieben wird (Zhang *et al.* 1998, Nakamura *et al.* 2003, Krishnan *et al.* 2004, Lu *et al.* 2004) und das die Depolarisation des mitochondrialen Potentials, einem als Zelltod begleitenden beschriebenen molekularen Prozess, initialisieren kann. Damit würde die HHV-8tk durch die Transkriptionsabhängigkeit vom lytischen Zyklus und durch die wahrscheinliche Initialisierung des Zelltodes bereits einige Bedingungen erfüllen, um ein möglicher Auslöser zu sein für den durch Ganciclovir nicht inhibierbaren lytisch induzierten Zelltod der Wirtszellen. Das fehlende Kriterium ist die unabhängige Transkription der HHV-8tk von der beschriebenen therapeutischen Behandlung mit Ganciclovir.

Es wurde untersucht, ob die HHV-8tk im lytischen Zyklus transkribiert wird und welchen Einfluss Ganciclovir auf die Transkription eines lytischen (ORF 26), eines latenten (LANA1) und eines zellulären Gens ( $\beta$ -Aktin) sowie auf die HHV-8tk hat.

Zur Überprüfung der Transkription wurden von  $\beta$ -Aktin, LANA1, ORF 26 und HHV-8tk spezifische Genfragmente in einer RT-PCR von 0 h, 48 h, 72 h und 96 h Butyrat induzierten (mit oder ohne Ganciclovir), sowie nicht induzierten BCBL-1-Zellen (mit oder ohne Ganciclovir) amplifiziert (Abb. 38, (A)). Die Zeitpunkte für die Analyse wurden verzögert gewählt, da es sich bei ORF 26 und HHV-8tk um Gene handelt, die der späten lytischen Phase zugeordnet werden. Zusätzlich wurde die Amplifizierungsstärke von ORF 26 und der HHV-8tk durch densitometrische Dichtemessung ermittelt, zur  $\beta$ -Aktin Expression standardisiert und als x-fache Induktion zum jeweiligen 0 h Wert dargestellt (Abb. 38, (B)).

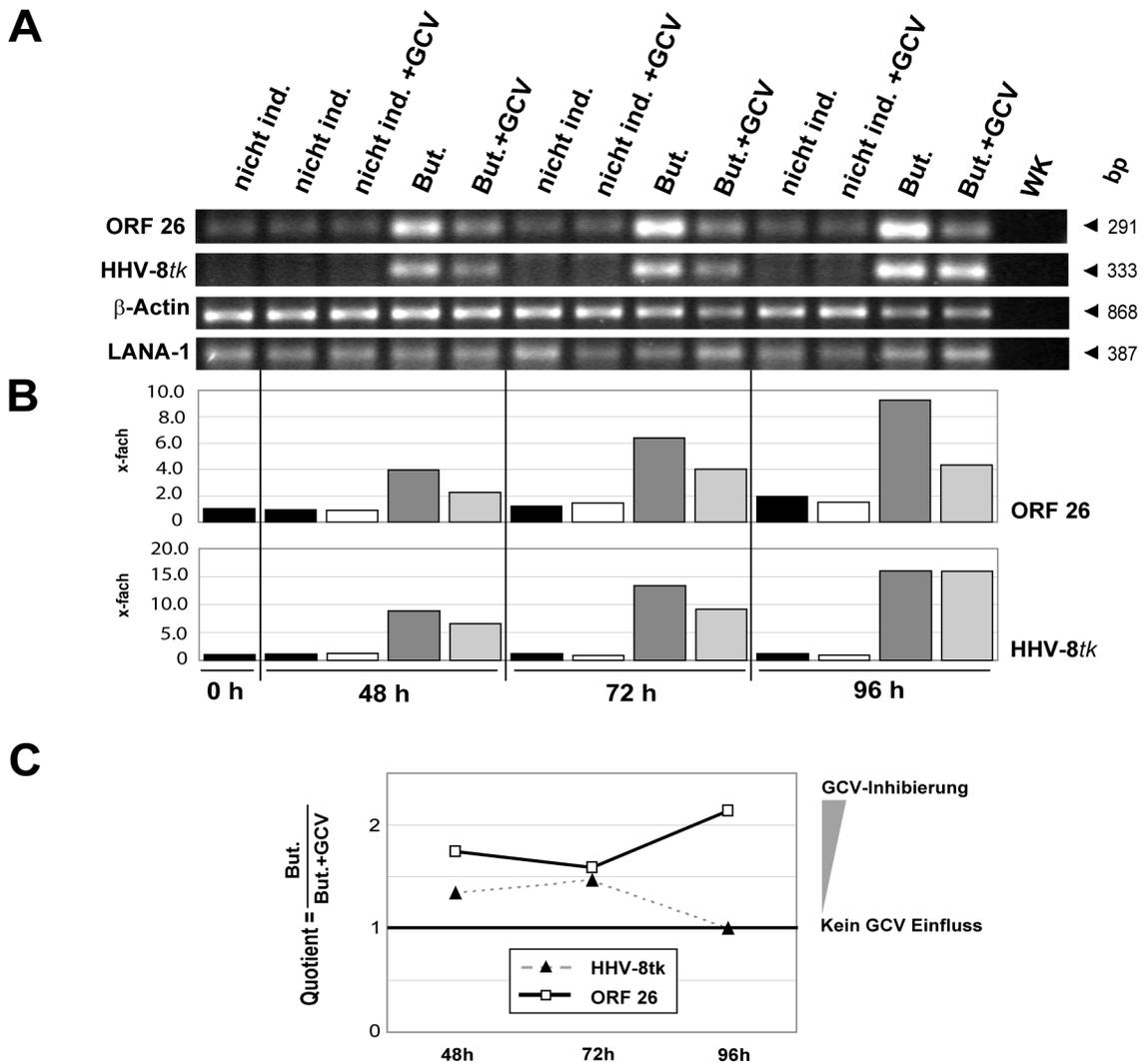


Abb. 38, Ganciclovir inhibiert die Transkription von ORF 26 stärker als die der HHV-8tk.

(A) RT-PCR von Gesamt-RNA Butyrat induzierter und nicht induzierter BCBL-1-Zellen (vergl. Abb. 37) mit oder ohne Ganciclovir nach 0 h, 48 h, 72 h und 96 h Induktion. Amplifiziert wurden Fragmente von ORF 26 (291bp), HHV-8tk (333 bp),  $\beta$ -Aktin (868 bp) und LANA1 (387 bp). Zusätzlich ist die Wasserkontrolle (WK) der RT-PCR gezeigt. Gezeigt ist ein Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten.

(B) Densitometrische Dichtemessung der ORF 26 und der HHV-8tk Amplifizierung aus (A). Die Messung wurde auf die RT-PCR von  $\beta$ -Aktin standardisiert und zeigt die jeweilige Transkription zum Start-Zeitpunkt (leer, 0 h) als einfache Induktion.

Butyrat induziert die Transkription von ORF 26 und HHV-8tk. Ganciclovir inhibiert 96 h nach der Inkubation die Transkription von ORF 26 und nicht die der HHV-8tk.

(C) Grafische Darstellung des Quotienten der Densitometrische Dichtewerte (B) aus Butyratinduktion gegen Butyratinduktion mit Ganciclovir. Ein Quotient größer als 1 weist auf eine Inhibierung der Transkription von ORF 26 (schwarze Linie) oder der HHV-8tk (gestichelte Linie) durch Ganciclovir hin.

Die  $\beta$ -Aktin Transkription wurde nicht wesentlich durch die Inkubationsbedingungen mit oder ohne Butyrat oder Ganciclovir verändert. Das latente Gen LANA1 war zu jedem Zeitpunkt und zu jeder Bedingung transkribiert (Abb. 38, (A) LANA1) und konnte, wie in der Literatur beschrieben, durch Butyrat nicht zusätzlich induziert beobachtet werden (Zhang *et al.* 1998, Nakamura *et al.* 2003, Krishnan *et al.* 2004, Lu *et al.* 2004). Ein inhibitorischer Einfluss von Ganciclovir auf die Transkription von LANA1 war nicht zu erkennen.

Im Gegensatz dazu war die Transkription von ORF 26 lytisch induziert (Abb. 38, (B) ORF 26, But) und nahm kontinuierlich zu. Bei der Butyratinduktion mit Ganciclovir war bei den verwendeten experimentellen Bedingungen für die ORF 26-Transkription eine Abnahme nach 48 h und 96 h um ca. die Hälfte und nach 72 h um ca. ein Drittel zu beobachten (Abb. 38, (B) ORF26, But und But+GCV). Für die HHV-8*tk* konnte zu keinem Zeitpunkt eine Transkription ohne Induktion beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigte sich die Transkription der HHV-8*tk* induziert durch Butyrat, als kontinuierlich steigend (Abb. 38, (B)). Im Gegensatz zu ORF 26 wurde die Transkription der HHV-8*tk* durch Ganciclovir nach 48 h und 72 h nur um ca. ein Drittel inhibiert und nach 96 h war dieser Effekt vollkommen aufgehoben (Abb. 38, HHV-8*tk*, But oder But+GCV).

Zum Beurteilen der Wirkung von Ganciclovir wurden die densitometrischen Dichtewerte (B) aus der Butyratinduktion gegen die der Butyratinduktion mit Ganciclovir als Quotient grafisch dargestellt (Abb. 38, (C)). Ein Quotient größer als 1 weist auf eine Inhibierung der Transkription durch Ganciclovir hin. Für ORF 26 wurde eine stärkere Transkriptions-Inhibierung durch Ganciclovir beobachtet als für HHV-8*tk*, mit wahrscheinlich keiner Inhibierung der HHV-8*tk* nach 96 h.

Wie in der Literatur beschrieben konnte gezeigt werden, dass BCBL-1-Zellen durch Butyrat lytisch induzierbar sind und dies durch eine Reduktion der Wirtszellpopulation verfolgt werden konnte (Klass *et al.*). Zusätzlich ließ sich die Induktion des lytischen Zyklus durch die Transkription des lytisch zugeordneten Gens ORF 26 nachweisen, die mit der Dauer der Induktion kontinuierlich zu nahm. Durch Ganciclovir konnte die Transkription von ORF 26 zu jedem Zeitpunkt inhibiert werden im Gegensatz zur HHV-8*tk*, deren Transkription nach 48 h und 72 h weniger als bei ORF26 und nach 96 h wahrscheinlich nicht mehr inhibiert wurde.

## 5. Diskussion

Das Humane-Herpesvirus-8 ist das Virus, das an der Entstehung des Kaposi-Sarkom beteiligt ist (Chang *et al.* 1994). Das Aufschlüsseln der Virusinteraktion mit der Wirtszelle ist wichtig, um die Vorgänge in der Latenz und Lyse fundierter verstehen zu können. Die HHV-8 $tk$  wurde aus einer HHV-8-Expressionsbank als am stärksten p53 als Transkriptionsfaktor induzierend ermittelt.

Die HHV-8-Thymidinkinase konnte in zwei funktional getrennte Domänen unterteilt werden. Zum einen die bekannte C-terminale Domäne mit der biochemischen Kinasefunktion und eine neu charakterisierte N-terminale Domäne. Diese 200 Aminosäuren lange Proteindomäne war allein dafür verantwortlich, dass der endogene p53-Proteinlevel erhöht, p53 transkriptionell induziert und p53 an Serin-392 phosphoryliert gezeigt werden konnte.

Durch das anti-apoptotische HHV-8-Protein LANA2, ließ sich die Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor inhibieren, aber nicht vollständig aufheben. Dadurch wurde aufgezeigt, dass die HHV-8 $tk$  ausgelöste Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor durch ein anderes HHV-8-Gen reguliert werden konnte und es sich bei der Transkriptionsaktivierung von p53 durch die HHV-8 $tk$ , vermutlich um eine authentische Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor handelt. Weiterhin war die HHV-8 $tk$  durch ihre N-terminale Domäne bei HEK293T-Zellen für die Veränderung des Zellrasens zu Zellinseln, eine Verminderung der Zellzahl und die Depolarisation des mitochondrialen Potentials verantwortlich. Dies alles sind Prozesse, die mit dem Zelltod assoziiert sein können und auf eine, neben der biochemischen, erweiterten Funktion der HHV-8 $tk$  im lytischen Zyklus hinweisen. In lytisch induzierten BCBL-1-Zellen wurde das Transkriptionsverhalten der HHV-8 $tk$  durch das replikationsinhibierende Ganciclovir in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer wenig oder gar nicht, im Vergleich zu ORF 26, beeinflusst. Dies zeigt, dass die HHV-8 $tk$  das durch Ganciclovir nicht inhibierbare HHV-8-Gen sein kann, das den Zelltod in lytisch induzierten BCBL-1-Zellen auslöst. Die Induktion der Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor, Veränderung der Zellrasenmorphologie und Inhibierung der Zellzahl durch die HHV-8 $tk$  sind für humane Gammaherpesviren einmalig und konnten für die homologe Thymidinkinase aus EBV nicht beobachtet werden. Die Divergenz in der Funktion ließ sich wahrscheinlich zusätzlich durch unterschiedliche subzelluläre Lokalisierung der beiden humanen Gammaherpesviren-Thymidinkinasen aufzeigen.

## **5.1 HHV-8-Expressionsbank**

Bei der Analyse der Expressionsplasmide von K2, K5, K9, K10, K11, ORF 18, 20, 22, 23, 27, 31, 36, 40 und 69 wurden Mehrfachbanden oder unerwartete Laufbanden beobachtet. Banden die unter der erwarteten Laufgröße zu erkennen sind, deuten auf Abbaubanden oder mögliche vorhandene alternative Start-Kodons hin. Banden über der errechneten Laufgröße können auf post-translationale Veränderungen des Proteins hinweisen, die das Molekulargewicht verändern, oder sind durch noch nicht vollständig denaturierte Strukturen und daraus folgende Veränderung des apparenten Laufverhaltens begründet.

Für die Expressionsplasmide von ORF 4, 6, 7, 9, 10, 28, 29, 39, 42, 47, 58, 72, K4.2, K6, K7, K8, K12-A, K14 und K15 konnte keine Expression im durchgeführten Westernblot beobachtet werden. Um die Expression der noch fehlenden Konstrukte nachzuweisen, könnte der Westernblot weiter optimiert werden. Zusätzlich ließen sich andere Proteinnachweistechiken, wie die Immunfärbung, nutzen. Weiterhin könnte eine Sequenzanalyse für den CMV-Promoter Aufschluss darüber geben, ob Veränderungen des Expressionsplasmids die Expression des jeweiligen HHV-8-Gens verhindern.

## **5.2 Das modular anpassbare Reportersystem**

Das plasmidbasierende Reportersystem konnte erfolgreich als modulares System konstruiert werden. Durch Austauschen des Minimalpromoters konnte in der NFκB-Fallstudie eine Optimierung der Sensitivität des Reporterplasmids erzielt werden. Durch das Austauschen der Responseelemente wurden zusätzliche Reporterplasmide für die Detektion der Transkriptionsaktivierung von AP-1 und p53 etabliert. Damit ließe sich das Reportersystem durch die Verwendung anderer Responseelemente an weitere Transkriptionsfaktoren anpassen und sehr einfach erweitern.

## **5.3 Die Suche nach transkriptionsaktivierenden HHV-8-Genen mit Hilfe der Arraytransfektion**

Die Arraytransfektion wurde als Hochdurchsatzmethode gewählt, um eine HHV-8-Expressionsbank schnell nach signalweginduzierenden Genen mit Hilfe des plasmidbasierenden Reportersystems zu durchsuchen. Dies konnte prinzipiell erfolgreich durchgeführt werden und die HHV-8 $tk$  aus der HHV-8-Expressionsbank als am stärksten p53

und ORF 22 als NFκB transkriptionsaktivierend identifiziert werden. Dies ließ sich für beide in der Falschpositivüberprüfung mit Hilfe der konventionellen Lochplattentransfektion bestätigen.

Die Induktionsanalyse von Transkriptionsfaktoren mit der Arraytransfektion und dem plasmidbasierenden Indikatorsystem ist jedoch eine relativ unerprobte Technik, bei deren Anwendung teilweise große Schwankungen in der Effizienz und Reproduzierbarkeit auftraten. Dies zeigte sich besonders bei der Induktionsanalyse von AP-1, bei der K4.2 als AP-1 induzierend ermittelt wurde, jedoch in der Falschpositivüberprüfung nicht bestätigt werden konnte.

Die verwendeten Reporterplasmide erzielten im konventionellen Assay reproduzierbare Ergebnisse und sind vermutlich nicht der Grund für die erwähnten Schwankungen. Es ist eher zu vermuten, dass labortechnische Limitierungen, wie die fehlende Luftbefeuchtung und Klimatisierung des Druckvorgangs, die Schwankungen verursachten. Durch eine Klimatisierung ließe sich die Verdunstung und Viskosität der Drucklösung besser standardisieren und das Drucken der Objektträger dadurch gleichmäßiger durchführen und die Reproduzierbarkeit verbessern.

Die Arraytransfektion wurde mit Hilfe von Einzelplasmidtransfektionen etabliert und optimiert. Die Verwendung von Reporterplasmiden bedeutet aber, dass diese zusammen mit den Expressionsplasmiden durch eine Ko-Transfektion in die Zielzellen gebracht werden müssen und die Transfektionseffizienz durch diese Ko-Transfektion vermindert werden kann. Einerseits wäre bei der Verwendung von Reporterplasmiden die Etablierung auf einen Ko-Transfektionsprozess in der Arraytransfektion notwendig, um eine optimierte Transfektionseffizienz dafür zu erhalten. Andererseits sind Reporterzelllinien, die die Reporterplasmide ersetzen könnten, eine Möglichkeit den Ko-Transfektionsprozess zu umgehen.

## 5.4 Die HHV-8-Thymidinkinase

### 5.4.1 Die Modulation von p53 durch die HHV-8*tk*

#### 5.4.1.1 Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor und Erhöhung des endogenen p53-Levels

Die Aktivierung von p53 durch die HHV-8*tk* in HEK293T-Zellen wurde mit Hilfe des p53-Reporterplasmids detektiert. Das p53-Reporterplasmid kann nur die transkriptionelle Aktivierung von p53 erfassen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die HHV-8*tk* direkt oder indirekt p53 als Transkriptionsfaktor aktiviert.

Die Erhöhung des endogenen p53-Proteinlevels konnte in mehreren Zelllinien nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass sich p53 in der Zelle stabilisiert und der p53-Pool vergrößert wird. Ein Abbau von p53 durch MDM-2 ist somit unwahrscheinlich und die Stabilisierung von p53 ist möglicherweise auf einen geringeren Abbau durch MDM-2 zurückzuführen (Reich NC und Levine AJ 1984, Kubbutat MH und Vousden KH 1997, Haupt *et al.* 1997). Der molekulare Mechanismus, durch den der zelluläre Level von p53 erhöht wird, ausgelöst durch die HHV-8*tk*, ist bisher unbekannt. Dies könnte durch eine Stabilisierung von p53 aufgrund der posttranslationalen Modifikationen erfolgen, wofür die gefundene p53-Serin-392-Phosphorylierung spricht. Allerdings kann eine Wirkung der HHV-8*tk* die zur gesteigerten Transkription/Translation von p53 führt oder einen inhibitorischen Einfluss auf MDM-2 hat, nicht ausgeschlossen werden.

In HEK293T- und HeLa-Zellen wurde die Erhöhung des endogenen p53-Levels um das 2-, bzw. 2,5-fache im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle ermittelt. HEK293T- und HeLa-Zellen unterscheiden sich in den mit p53 interagierenden Proteinen. HEK293T-Zellen sind Derivatzellen des HEK293-Ursprungstyps. In HEK293-Zellen ist das E1B-55K das ausschlaggebende p53 interagierende Protein (Graham *et al.* 1977). Das Adenovirusprotein bindet sich direkt an p53, ohne dessen Abbau selbst zu beschleunigen, und inhibiert durch diese Bindung dessen Wirkung als Tumorsuppressor und Zellzyklusregulationsprotein (Kao *et al.* 1990, Yew *et al.* 1992, Yew *et al.* 1994). Zusätzlich sind HEK293T-Zellen mit dem SV40-TLA transformiert. SV40-TLA ist ein weiteres mit p53 direkt interagierendes Protein, das sich wie E1B-55K, an p53 bindet und dadurch weitere Interaktionen von p53 inhibiert, aber nicht selbst den Abbau von p53 bewerkstelligt (Sarnow *et al.* 1982). Die auf eine Papillomavirus-Infektion zurückzuführende HeLa-Zelllinie exprimiert E6 als p53 interagierendes Protein

(Seedorf *et al.* 1987). E6 bindet unter anderem zusammen mit der zellulären Ubiquitinligase an p53, markiert dadurch p53 durch Ubiquitinierung für den Abbau und erzeugt so sehr niedrige endogene p53-Protein-Level in HeLa-Zellen (Werness *et al.* 1990, Scheffner *et al.* 1990). Dadurch kann p53 in HeLa-Zellen nicht als Tumorspressor interagieren. Da die Erhöhung des endogenen p53-Levels durch die HHV-8*tk* unabhängig in HEK293T- und HeLa-Zellen beobachtet wurde, kann von einer von SV40-TLA, E1B-55K oder E6 unabhängigen direkten oder indirekten Wirkung der HHV-8*tk* ausgegangen werden.

Durch die Überexpression von exogenem p53 konnte die Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor in HEK293T-Zellen beobachtet werden und wurde als Positivkontrolle verwendet. Die p53-Überexpression führt zwar zur Transkriptionsaktivierung von p53, aber vermutlich wegen des Anteils an anti-apoptotischen viralen Genen, wie dem SV40-TLA oder E1B-55K, nicht zur unmittelbaren Schädigung der transfizierten HEK293T-Zellen. So kann vermutet werden, dass allein die Erhöhung des endogenen p53-Levels durch die HHV-8*tk* zu einer Transkriptionsaktivierung von p53 führen kann. Die HHV-8*tk* muss jedoch zusätzliche Einflüsse auf HEK293T-Zellen ausüben, da sich nur bei der HHV-8*tk* Zellinseln bildeten, sich jedoch keine entsprechende morphologische Veränderung bei der p53-Überexpression beobachten ließ.

HEK293T und HeLa sind Zelllinien mit p53 interagierenden viralen Proteinen. Bei der Wirkung der HHV-8*tk* könnte es sich deswegen auch nur um einen Einfluss handeln, der sich auf diese Zelllinien beschränkt. Dies ließe sich durch die Überprüfung der Wirkung der HHV-8*tk* an primären Zellen oder Zelllinien mit authentischer p53-Interaktion ausschließen. Zusätzlich wäre die Überprüfung der HHV-8*tk*-Wirkung an einem für HHV-8 bekannten Wirtszelltyp interessant, um festzustellen, ob es sich dabei um einen authentischen viralen Einfluss in Wirtszellen handeln könnte.

#### **5.4.1.2 Verstärkung posttranslationaler p53-Modifikationen durch die HHV-8*tk*.**

Die HHV-8*tk* erhöht den endogenen p53-Level, jedoch weder die Phosphorylierung von Serin-15, -46, noch die Acetylierung von Lysin-382, überproportional induziert beobachtet werden. Damit lässt sich durch die Analyse von p53-Phosphorylierungen in HEK293T-Zellen nicht auf eine Wirkung von p53 rückschließen, jedoch waren die posttranslationalen Veränderungen proportional zur Erhöhung des endogenen p53-Spiegels induziert und heben

damit zusätzlich die Akkumulation von p53 in HHV-8*tk* transfizierten Zellen hervor. Nur für die Phosphorylierung von Serin-392 konnte eine überproportionale Erhöhung zur Induktion des p53-Spiegels beobachtet werden. Die Phosphorylierung von Serin-392 steht mit einer Förderung der Oligomerisierung von p53 im Zusammenhang. p53 wird durch die Oligomerisierung zum Transkriptionsfaktor p53-Tetramer. Wahrscheinlich reflektiert die auf Proteinebene ermittelte p53-Serin-392-Modifikation unmittelbar die durch das p53-Reporterplasmid identifizierte Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor durch die HHV-8*tk*. Dies zeigt auf Proteinebene unabhängig vom p53-Reportersystem die Transkriptionsinduktion von p53 durch die HHV-8*tk* auf. Bei der scheinbaren Induktion der p53-Serin-392-Phosphorylierung könnte es sich auch um eine Hemmung der Dephosphorylierung durch die HHV-8*tk* handeln. Ob es sich um eine Induktion der Phosphorylierung oder eine Hemmung der Dephosphorylierung von p53-Serin-392 durch die HHV-8*tk* handelt muss experimentell noch ermittelt werden.

Die Analyse der posttranslationalen p53-Modifikationen wurde mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern durchgeführt. Diese Antikörpermischung besteht aus Antikörpern verschiedenen klonalen Ursprungs, die jedoch alle dasselbe Epitop erkennen sollen. Der Nachteil an solch einer Antikörpermischung ist, dass die Gesamtspezifität und damit die Detektionsqualität leidet, da nicht alle Antikörper innerhalb der Mischung das Epitop gleich gut binden und jene mit weniger spezifischen Bindungseigenschaften zu unspezifischen Kreuzinteraktionen neigen können. Eine mögliche Begründung, der zum Teil schwierigen Detektion von posttranslationalen p53-Modifikationen, kann an der Kreuzinteraktion der polyklonalen Antikörper mit unmodifiziertem p53 liegen. Diese Kreuzinteraktion macht eine Unterscheidung in Zelllinien mit einem großem p53-Pool, wie bei HEK283T Zellen, schwierig. Die kreuzreaktiven Antikörper des polyklonalen Antikörperpools könnten den relativ großen p53-Pool als Hintergrund detektieren und es damit erschweren, eine mögliche spezifische p53-Induktionen durch die HHV-8*tk* zu erkennen.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass der p53-Spiegel der HEK293T-Zellen zum großen Teil aus inert an SV40-TLA und E1B-55K gebundenem posttranslational modifiziertem p53 besteht. Da endogenes p53 in negativkontrolltransfizierten HEK293T-Zellen, im Gegensatz zu HeLa-Zellen, deutlich erkennbar war, ist der endogene p53-Spiegel in diesen Zelllinien bereits ohne Stabilisierung von p53 hoch. Eine durch die HHV-8*tk* verursachte mögliche

posttranslationale Veränderung bei p53 könnte, begründet durch den relativ großen inerten p53-Spiegel als Hintergrund, davon schwierig zu unterscheiden sein.

Eine Überprüfung einer möglichen induzierten posttranslationalen Veränderung von p53 durch die HHV-8*tk* an primären Zellen oder Zelllinien ohne p53-interagierende Proteine und geringerem p53-Spiegel wäre der nächste Schritt zu überprüfen, in wie weit und ob die bisherigen Ergebnisse eine authentische HHV-8*tk* Wirkung widerspiegeln.

#### **5.4.2 HHV-8*tk* induziert wahrscheinlich die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials**

Die dauerhafte Depolarisierung des mitochondrialen Potentials ist ein frühes Ereignis der Apoptose und zählt zu deren Kennzeichen (Marchetti *et al.* 1996a,b). Dies geschieht unter anderem durch die Formierung der PTPC, welcher die Freisetzung von Cytochrom-C und den Zusammenbruch des mitochondrialen Potential initialisieren kann. Durch frei werdendes Cytochrom-C wird die Caspase-Kaskade initialisiert und der programmierte Zelltod ausgelöst (Kroemer G und Reed JC 2000, Zoratti M und Szabo I 1995). Die Analyse des Zustandes des mitochondrialen Potentials mit Hilfe von JC-1 ist eine Möglichkeit den Zelltod einer Zelle zu verfolgen (Salvioli *et al.* 1997). In HHV-8*tk* transfizierten HEK293-Zellen konnte die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials ermittelt werden.

Die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials wurde in HEK293-Zellen festgestellt. HEK293-Zellen sind zu HEK293T-Zellen verwandt, allerdings fehlt ihnen das anti-apoptotische und direkt mit p53 interagierende SV40-TLA (Sarnow *et al.* 1982). Durch das Fehlen von SV40-TLA können die Ergebnisse der Depolarisierung des mitochondrialen Potentials durch die HHV-8*tk* nicht unmittelbar mit den bisherigen Ergebnissen aus HEK293T-Zellen verglichen werden. Jedoch ist die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials ein Hinweis, dass die HHV-8*tk* den Zelltod initialisieren könnte.

Als weitere Hinweise für eine mögliche Initialisierung des Zelltodes durch die HHV-8*tk* wurde die Akkumulation von p53 und die Transkriptionsaktivierung von p53 beobachtet. Die Transkriptionsaktivierung von p53 initialisiert die Entstehung von pro-apoptotischen Genen wie PUMA, Noxa oder BAX, die in Folge der Initialisierung des Zelltodes, auch zur Depolarisierung des mitochondrialen Potentials führen können (Miyashita T und Reed JC 1995, Oda *et al.* 2000, Yu *et al.* 1999, Yu *et al.* 2003). Darüber hinaus kann das aktivierte

Tumorsuppressoren p53 nicht nur als Transkriptionsfaktor interagieren, sondern auch direkte transkriptionsunabhängige Interaktionen am Mitochondrium ausführen und die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials auslösen (Yan *et al.* 1997). Die HHV-8*tk* wirkt über einen unbekanntem molekularen Mechanismus auf die Zelle. Es ist möglich das dies über eine transkriptionsunabhängige oder transkriptionsabhängige p53-Interaktion geschieht und als Folge davon das Mitochondrium geschädigt wird, was sich durch die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials beobachten ließe. Einerseits ist damit durch die HHV-8*tk* initialisiert, das Auslösen des programmierten Zelltodes möglich, da die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials eines der Merkmale dafür ist. Im JC-1-Assay ließ sich, wie für die Staurosporin-Positivkontrolle, nahezu kein Membranpotential für die untersuchten Zellen nachweisen, was für eine dauerhafte Schädigung des Mitochondriums und damit für das Auslösen des Zelltodes spricht. Andererseits gibt es jedoch keinen zusätzlichen experimentellen Beweis, dass tatsächlich irreversibel Apoptose ausgelöst wurde. Die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials ist theoretisch reversibel und die Messung mit JC-1 könnte nur einen momentanen Zustand wiedergeben, der lediglich eine kurzfristige Veränderung reflektiert.

Die ermittelte Depolarisierung des mitochondrialen Potentials könnte auch darauf hinweisen, dass die HHV-8*tk* vermutlich zumindest das Mitochondrium schädigen kann. Dabei wäre es möglich, dass die HHV-8*tk* die Schädigung der Mitochondrien initialisiert und damit auch das wichtigste biochemische Kompartiment zur Aufrechterhaltung der Energieversorgung der Zelle ausschaltet. Die beobachtete verminderte Zellzahl und die Entstehung von Zellinseln bei HHV-8*tk* transfizierten HEK293T-Zellen wären über eine verminderte Funktion der Mitochondrien als "Kraftwerk der Zelle" ebenso erklärbar und würden nicht zwangsläufig das Auslösen der Apoptose voraussetzen.

Die Verringerung der Zellzahl könnte auch eine Folge der Aktivierung von p53 sein, bei der es sich um einen p53 initialisierten Zellzyklusarrest handeln könnte. Dies ist jedoch nicht wahrscheinlich, da die Analyse eines Hauptregulators des Zellzyklus, dem RB-Protein, keine Veränderung dessen Phosphorylierungsmusters im Vergleich zur Negativkontrolle mit normalem Zellwachstum in HHV-8*tk* transfizierten Zellen ergab.

Bei der Analyse der Depolarisierung des mitochondrialen Potentials durch die HHV-8*tk* wurden HEK293-Zellen verwendet. Es handelt sich dabei um eine Zelllinie mit mindestens

einem p53 interagierendem viralen Protein. Das anti-apoptotische E1B-55K-Protein kann einen Einfluss auf die Ergebnisse haben und damit eine Wirkung der HHV-8 $tk$  in der verwendeten Zelllinie hervorrufen. Die Überprüfung an einem für HHV-8 bekannten Wirtszelltyp, die Verwendung von primären Zellen oder Zelllinien ohne anti-apoptotisch wirkende Gene würden zusätzlich Aufschluss darüber geben, ob die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials authentisch durch die HHV-8 $tk$  initialisiert wird.

### **5.4.3 HHV-8 $tk$ hat eine für Humane Gammaherpesviren einmalige N-terminale**

#### **Signal-domäne**

Im bioinformatischem Vergleich der Thymidinkinasen der humanen Alpha- und Gammaherpesviren untereinander konnte gezeigt werden, dass die biochemische Funktion bei allen Thymidinkinasen im C-terminalen Teil lokalisiert ist. Zusätzlich wurde deutlich, dass die Gammaherpesviren-TKs im N-Terminus verlängert sind und in der N-terminalen Domäne keine Homologien zu den C-terminalen biochemischen Domänen gefunden wurden.

Für die EBV $tk$  wurde beschrieben, dass der 240 AS lange N-terminale Teil für die biochemische Funktion als TK nicht notwendig sei (Holton RH und Gentry GA 1996, Gustafson *et al.* 1998). Die gleiche Konstellation bei der N-terminalen Domäne der HHV-8 $tk$  ließ vermuten, dass auch bei dieser Thymidinkinase der N- und C-Terminus getrennte Funktionen kodiert.

Eine mögliche Funktion des mit 250 Aminosäuren eingegrenzten HHV-8 $tk$  N-Terminus wurde bereits mit dem Verlust der Zelladhäsion und Veränderung der Zellmorphologie beschrieben. Die wichtigen signalvermittelnden Bereiche wurden zwischen den Aminosäuren 141-175 als prolinreiche Region eingegrenzt (Gill *et al.* 2005). Für die HHV-8 $tk$  konnte im Vergleich zu allen humanen Herpesviren-Thymidinkinasen ein 200 Aminosäuren langer N-terminaler Bereich eingegrenzt werden. Mit Hilfe von HHV-8 $tk$ -Deletions- und Mutationskonstrukten konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne allein die Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor und Erhöhung des endogenen p53-Levels, die Veränderung der Zellmorphologie zu Zellinseln und die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials vermittelt. Es wurde zusätzlich durch das Fehlen der Kinasedomäne gezeigt, dass weder die dort kodierte biochemische Funktion, noch die Struktur als Protein, für die Funktion des N-Terminus notwendig waren. Die ermittelte 200 AS lange N-terminale Signal-domäne der HHV-

8tk stimmt in der Eingrenzung mit den Daten anderer Gruppen über ein (Gill *et al.* 2005).

Im Alignment der viralen Thymidinkinasen konnte zwischen dem N-Terminus der EBVtk und HHV-8tk keine Homologie festgestellt werden. Dies war ein Hinweis darauf, dass die EBVtk im N-Terminus für eine andere Funktion als die der HHV-8tk kodiert. Experimentell konnte für die Vollängen-EBVtk keine Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor, Veränderung der Zellmorphologie des Zellrasens oder Inhibierung der Zellzahl ermittelt werden. Damit stimmte die bioinformatische und biologische Analyse überein. Der N-Terminus der EBVtk scheint eine vom HHV-8tk N-Terminus divergente Funktion zu haben. Eine Divergenz in der Funktion, ist für den Verlust der Zelladhäsion und Veränderung der Zellmorphologie beschrieben worden und unterstützt zusätzlich, dass die N-Termini der beiden Gammaherpesviren-TKs unterschiedliche Funktionen zu haben scheinen (Gill *et al.* 2005).

#### **5.4.4 SH2- / SH3- und WW-Interaktionsdomänen des HHV-8tk-N-Terminus**

Die N-terminale Domäne der HHV-8tk ist eine prolinreiche Sequenz. Es wurde eine Analyse von linearen Interaktionsmotiven für die 200 AS lange N-terminale Domäne der HHV-8tk durchgeführt (Abb. 39) und unter anderem „SRC-Homologe“ (SH) 2-/3- und „Tryptophans (Spaced 20-22 Amino Acid) Domain“ (WW)-Motive gefunden (Puntervoll *et al.* 2003).

SH2-, SH3- und WW-Domänen sind Proteinmotive, die Interaktionen mit anderen Proteinen vermitteln können (Musacchio *et al.* 1994). Die Vermittlung kann über die direkte Interaktion der beiden Partnerproteine oder über Adapterproteine geschehen und erschließt ein weites Spektrum an möglichen Interaktionspartnern.

Ein Beispiel dafür ist die "cellular nonreceptor tyrosine kinase" c-Abl (Wang JY 1993). c-Abl hat SH3-Domänen, über die seine Kinase-Aktivität reguliert wird (Franz *et al.* 1989) und SH2-Domänen die für die Protein-Protein-Interaktion und Substratspezifität von c-Abl wichtig sind (Duyster *et al.*, 1995, Sattler *et al.* 1996). c-Abl bindet an F-Aktin und ist darüber hinaus an F-Aktin abhängigen Regulationsprozessen beteiligt (Woodring *et al.* 2002, Woodring *et al.* 2003). Zusätzlich ist c-Abl neben der Regulation von Prozessen der Zellmorphologie, durch den Eingriff in die Aktinorganisation, an der Differenzierung und Apoptose beteiligt (Puri PL *et al.* 2002, Zhu *et al.* 2004, Hernandez SE *et al.* 2004). Es ist eine theoretisch Möglichkeit, dass die HHV-8tk über die Interaktion der N-terminalen SH2-, SH3- und WW-Domänen direkt oder indirekt mit Proteinen wie c-Abl interagiert und deren Aktivität reguliert.

1 MAEGGFGADSVGRGGEKASVTRGGRWDLGSSDDESSTSTTSTDMDDLPEE 50

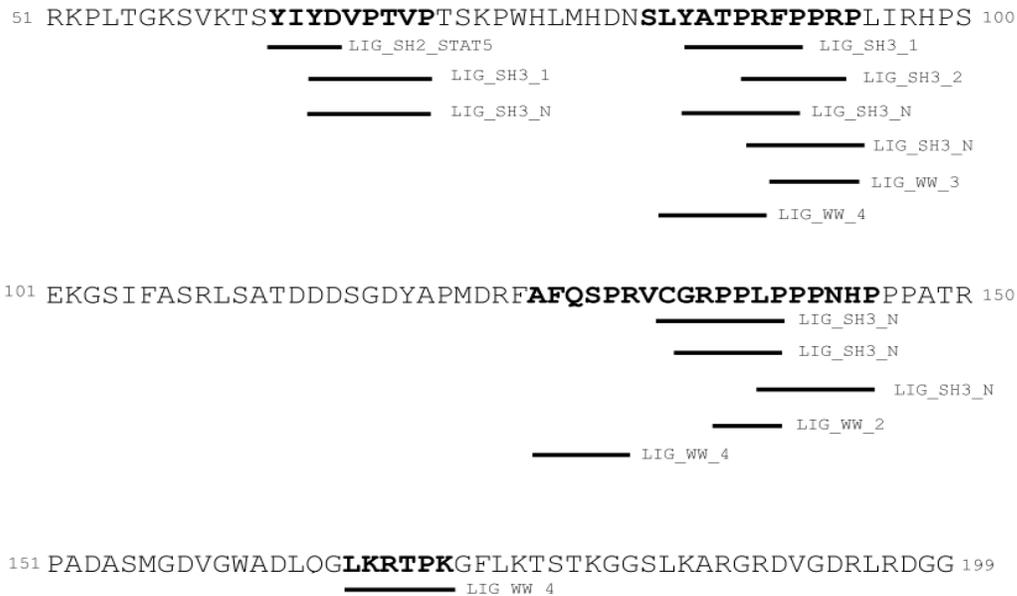


Abb. 39, Bioinformatische Vorhersage der linearen Signalmotive im N-Terminus der HHV-8tk

Der 200 Aminosäuren lange N-Terminus der HHV-8tk wurde zu bekannten Bindungsmotiven verglichen. Die vorhergesagten SH2-, SH3- und WW-Interaktionsdomänen sind markiert (schwarze Linie) und das jeweilige zugeordnete Bindungsmotiv beschrieben. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabenkode dargestellt.

**LIG\_SH2\_STAT5** - STAT5 Src Homology 2 (SH2) domain binding motiv, **LIG\_SH3\_1** - motiv recognized by class I SH3 domains, **LIG\_SH3\_2** - motiv recognized by class II SH3 domains, **LIG\_SH3\_N** - motiv recognized by those SH3 domains with a non-canonical class I recognition specificity, **LIG\_WW\_2** - motiv recognized by WW domains of Group II, **LIG\_WW\_3** - WW domain of group III binding motiv, **LIG\_WW\_4** - Class IV WW domains interaction motiv.

Beschriftung entspricht der Klassifizierung der Quelle (<http://elm.eu.org/>, Puntervoll *et al.* 2003). Die Aminosäuresequenz in der Motive vorhanden sind, wurde zusätzlich fett dargestellt (LO**LRO**FLLO**L**).

Durch eine vergleichende bioinformatische und experimentelle Analyse der N-Termini der am nächsten verwandten Herpesviren-Thymidinkinasen, wie des Resus-Rhadion-Virus (RRV) oder Herpesvirus-Saimiri, könnten mehr Aufschluss über die Funktion und Regulation der vermuteten Signaldomänen im N-terminalen Teil der HHV-8tk geben (Searles *et al.* 1999, Albrecht *et al.* 1992).

### 5.4.5 Regulation der HHV-8tk-Wirkung

HHV-8 kodiert für verschiedene Gene, die einen Einfluss auf die Interaktionen innerhalb der Wirtszelle haben. Deren Funktion ist es unter anderem die Wirtszelle zu kontrollieren, damit keine unerwünschten Prozesse, wie zum Beispiel der Zelltod, initialisiert werden. Dem latenten und lytischen Zyklus werden Proteine zugeordnet die mit p53 interagieren, um vermutlich die Tumorsupressor Eigenschaften von p53 zu unterbinden und dadurch den Zelltod zu verhindern. LANA2 ist eines der mit p53 interagierenden Proteine, welches nur in B-Zellen latenten und normalerweise lytischen exprimiert, beobachtet wurde (Rivas *et al.* 2001).

LANA2 konnte die HHV-8tk initialisierte Erhöhung des endogenen p53-Proteinlevels nicht inhibieren, jedoch die Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor. Damit ist LANA2 ein Inhibitor, der die HHV-8tk initialisierte Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor regulieren kann, jedoch nicht in der Lage war diese vollständig aufzuheben. Die LANA2-Interaktion begrenzt sich scheinbar darauf, die durch die HHV-8tk ausgelöste Transkriptionsaktivierungen von p53 zu inhibieren. Dies würde mit der in der Literatur beschriebenen *in vitro* p53/LANA2 Interaktion übereinstimmen. Dabei interagiert LANA2 mit der p53-Domäne innerhalb der AS 290 bis 393. In diesem Bereich liegt die für die Tetramerisierung von p53 verantwortlich Domäne die für die Regulation der Transkriptionsaktivierung von p53 wichtig ist. Diese Interaktion von LANA2 mit der p53-Domäne begründet sehr wahrscheinlich die transkriptionsinhibierende Wirkung von LANA2 (Rivas *et al.* 2001).

Die gleichzeitige Expression beider Proteine simuliert prinzipiell wahrscheinlich eine Überexpressionssituation, wie sie im lytischen Zyklus von HHV-8 vorkommen kann. Allerdings konnte auch durch die äquivalenten Expression beider Kandidaten die HHV-8tk induzierte Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor durch LANA-2 nicht vollständig blockiert werden. Dies ist wahrscheinlich ein Hinweis, dass einerseits die p53-interagierenden Proteine, wie LANA2, die HHV-8tk Wirkung limitieren können. Andererseits ist LANA-2-Einfluss ein Hinweis, dass die HHV-8tk Wirkung vermutlich noch durch andere HHV-8-Gene reguliert werden kann.

LANA2 interagiert in dem verwendeten HEK293T-Zellsystem wie es in der Literatur beschrieben wird und kann die aufgezeigte HHV-8tk-Transkriptionsaktivierung von p53 inhibieren. Die Inhibierung durch LANA2 ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei der HHV-8tk

initialisierten Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor wahrscheinlich um einen authentischen p53-Interaktionsmechanismus handelt.

Die Überprüfung in einem anderen Zellsystem wäre eine Möglichkeit die Authentizität der HHV-8*tk*-Wirkung zusätzlich aufzuzeigen. Weiterhin wäre die Einbeziehung anderer bekannter mit p53-interagierender HHV-8-Gene, wie zum Beispiel LANA1, möglich um die Authentizität der HHV-8*tk*-Wirkung weiterführend zu überprüfen.

#### **5.4.6 Die subzelluläre Lokalisation der HHV-8*tk***

Die subzelluläre Lokalisation der HHV-8*tk* wurde erstmalig mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen in HEK293-Zellen analysiert (Gill *et al.* 2005). Als Ergebnis wurde das Vollängen-GFP-HHV-8*tk*-Fusionsprotein als ausschließlich im Zytoplasma lokalisierend, die GFP-Kinasedomänen-Variante als ganzzellig und die GFP-N-terminale-250AS-Variante als gesprenkelt im Kern verteilt beschrieben (Gill *et al.* 2005).

In den eigenen Untersuchungen wurde im Gegensatz dazu die HHV-8*tk* und deren Varianten (Wildtyp-Vollängenprotein, Vollängenprotein mit Mutationen in der Kinasedomäne, die HHV-8*tk*-Kinasedomäne allein und die HHV-8*tk* N-terminale 200 AS-Signaldomäne) ganzzellig lokalisiert beobachtet und nicht ausschließlich auf ein Zellkompartiment eingegrenzt werden.

Die Ausschlussgröße des Kernporenkomplex für den passiven Transport liegt bei ca. 40 – 60 kDa (Grebek *et al.* 1997, Stochaj U & Silver P 1992, von Arnim *et al.* 1998, Lenart P und Ellenberg J 2006). Bei der von Gill *et al.* vorgenommenen Analyse wurden für die Lokalisierung Fusionsproteine verwendet, deren Größe teilweise erheblich über der Ausschlussgröße für die passive Diffusion liegen. Die Größe der Fusionsproteine beeinflusst möglicherweise die Lokalisierung der analysierten HHV-8*tk* und Varianten bei Gill *et al.*

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Myc/His-C-terminal getaggten HHV-8*tk*-Varianten müssen jedoch nicht unbedingt die authentische subzelluläre Lokalisation widerspiegeln. Diese ließe sich vermutlich durch einen Antikörper der direkt an die HHV-8*tk* bindet besser analysieren und würde die Lokalisation ohne eine künstliche Veränderung reflektieren. Weiterhin ist das Vergleichen von verschiedenen getaggten Varianten eine andere Möglichkeit die Lokalisierung zu ermitteln und um Effekte die von einer getaggten Variante abhängen heraus zu finden.

Durch den Vergleich der Lokalisierung der HHV-8*tk* und deren Varianten in HeLa- und SaOS-

2-Zellen sollte einerseits geklärt werden, ob eine subzelluläre Lokalisierung p53 abhängig ist und andererseits, ob sich diese als Zelltyp unabhängig erweist. Aus diesem Grund wurde die Lokalisierung zum einen in HeLa-Zellen (p53 +/+) und zum anderen in SaOS-2-Zellen (p53 -/-) durchgeführt, um eine durch die Induktion des Zelltods bzw. morphologische Veränderung abweichende Lokalisierung auszuschließen. Für beide Zelltypen konnte die gleiche Lokalisierung der HHV-8 $tk$  und deren Varianten gezeigt werden, die damit unabhängig von p53 ist.

Im Gegensatz zur HHV-8 $tk$ , konnte für die EBV $tk$  weder eine Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor noch eine Veränderung der Zellmorphologie festgestellt werden. Die Lokalisierung der EBV $tk$  ist gegensätzlich zu der von HHV-8 $tk$  und deren Varianten. Die EBV $tk$  wird in HeLa-Zellen als gesprenkeltes Muster und in SaOS-2-Zellen als Aggregate im Zytosol wiedergefunden. Die stark abgegrenzte Kompartimentierung der EBV $tk$  reflektiert vermutlich zusätzlich eine andere Wirkungsweise als die der HHV-8 $tk$ . Jedoch wurde für die HHV-8 $tk$  im Westernblot ein stärkeres Expressionslevel in äquivalent transfizierten Zellen festgestellt (Abb. 32 (A)). Die subzelluläre Lokalisation der EBV $tk$  kann damit, bedingt durch deren verringerte Expression, auch nur eine limitierte Lokalisierung in den analysierten Zellen wiedergeben. Das Angleichen der Expressionslevel von EBV $tk$  und HHV-8 $tk$  durch eine Titrierung scheint sinnvoll zu sein, um zu überprüfen, ob diese subzelluläre Lokalisation vom Expressionslevel abhängig ist.

#### **5.4.7 Die HHV-8 $tk$ im lytischen Zyklus von HHV-8**

In BCBL-1-Zellen lässt sich der lytische Zyklus von HHV-8 mittels chemischer Reagenzien wie TPA oder Butyrat auslösen. Dabei treten authentische Merkmale der Lyse auf, wie zum Beispiel infektiöse Neupartikelbildung und Zerstörung der Wirtszelle (Renne *et al.* 1996, Fields 4<sup>th</sup> Edition).

In einer antiviralen Therapie wird angestrebt die Virionenneubildung zu unterbinden, um das Virus an einer Verbreitung und Reinfektion gesunder und nicht infizierter Zellen zu hindern. Durch Ganciclovir lässt sich die virale Replikation inhibieren. Die Ganciclovirkonzentration von 20 nM wurde verwendet, da diese bei dem gewählten Wirtszelltyp die Virenreplikation effektiv unterdrücken werden kann (Klass *et al.*). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Ganciclovir bei dieser Konzentration nicht die Wirtszellproliferation inhibierte und weder

einen toxischen Effekt auf die Zellen hatte, noch den lytischen Zyklus von HHV-8 induzierte (Klass *et al.*, Feng *et al.*, Fujimuro *et al.*).

Bei der Analyse der Wirkung von Ganciclovir auf die Inhibierung des lytischen Zyklus fiel auf, dass zwar die Viruspartikelproduktion inhibiert werden konnte, jedoch nicht auch wie erwartet der Zelltod der Wirtszelle (Klass *et al.* 2005). Dies führte zur Spekulation, dass es ein virales Gen geben muss, das sich lytisch induzieren lässt, dessen Translation bzw. Expression aber nicht durch Ganciclovir inhibiert wird und einen Einfluss auf den Zelltod der Zelle hat (Klass *et al.* 2005). Weiterhin lässt sich daraus vermuten, dass der lytisch induzierte Zelltod der Wirtszelle keine alleinige Folgeerscheinung der Virionenproduktion zu sein scheint, sondern unabhängig davon während des lytischen Zyklus induziert wird (Klass *et al.* 2005).

Die HHV-8*tk* ist möglicherweise der gesuchte Auslöser des Zelltods im lytischen Zyklus. Für die HHV-8*tk* konnte gezeigt werden, dass diese die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials auslöst. Eine dauerhafte Depolarisierung des mitochondrialen Potentials ist ein Merkmal für die Induktion des Zelltodes. Zusätzlich induziert HHV-8*tk* p53 als Transkriptionsfaktor, der die Entstehung von pro-apoptischen Proteinen initialisieren kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die HHV-8*tk* in lytisch induzierten BCBL-1-Zellen transkribiert, aber im Gegensatz zu anderen lytischen Genen, wie ORF 26, wahrscheinlich wenig oder gar nicht durch Ganciclovir inhibiert wurde. Damit würde die HHV-8*tk* voraussichtlich alle Eigenschaften erfüllen, um den vermuteten Zelltod auslösenden Gen von HHV-8 im lytischem Zyklus zu entsprechen.

Eine endgültige Aussage über die transkriptionsinhibierende Wirkung von Ganciclovir auf die HHV-8*tk* im lytischen Zyklus ist für die verwendeten experimentellen Bedingungen zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Die Analyse der Transkriptionsinhibierung der HHV-8*tk* basiert auf die semi-quantitative RT-PCR-Technik. Bei dieser Technik muss sichergestellt werden, dass die verwendete Anzahl von PCR-Zyklen eine Amplifizierung im linearen Bereich wieder spiegelt. Die Überprüfung der Linearität der Amplifizierungsschritte für die gewählten experimentellen Bedingungen muss zu einem späteren Zeitpunkt nachgeholt werden.

#### 5.4.8 Das HHV-8*tk*-Interaktionsmodell

In der molekularen Analyse der HHV-8*tk*-Wirkungsweise konnte gezeigt werden, dass im 200 Aminosäuren langen N-Terminus die Funktion für die Wirkung der HHV-8*tk* kodiert wird. Die HHV-8*tk* kann vermutlich die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials auszulösen, was wahrscheinlich auf die Initialisierung des Zelltodes hinweist. Ebenso ist es möglich, dass die HHV-8*tk* nur das Mitochondrium angreift und schädigt.

Die HHV-8*tk* induziert p53 als Transkriptionsfaktor, erhöht den endogenen p53-Spiegel und induziert die p53-Serin-392-Phosphorylierung. Die Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor durch die HHV-8*tk* wird durch LANA2 inhibiert und kann damit als viral reguliert gezeigt werden. Zusätzlich erfüllte die HHV-8*tk* alle Kriterien des vermuteten Zelltod auslösenden Gens im lytischen Zyklus. Zusammenfassend ergibt sich folgendes vorläufiges hypothetisches Interaktionsmodell der HHV-8*tk* (Abb. 40).

Die Expression des Transaktivators des lytischen Zyklus ORF 50 / RTA wird durch den Übergang vom latenten in den lytischen Zyklus oder mit Hilfe einer chemischer Induktion initialisiert. (1) RTA induziert die Transkription von Enzymen und Proteinen für die virale Replikation, wie die der HHV-8-Thymidinkinase. Die HHV-8*tk* gehört zu den durch RTA induzierten lytischen Genen, die im „late state“ des lytischen Zyklus exprimiert werden. (2) Bei der Translation der HHV-8*tk*-mRNA entsteht das Vollängenprotein, dass an der biochemischen Interaktion im Nukleotidstoffwechsel der Wirtszelle teilnimmt, um diese an die Replikationsbedürfnisse des Virus anzupassen. (3) Der N-Terminus der HHV-8*tk* wechselwirkt durch unbekannte molekulare Mechanismen direkt oder indirekt mit der Zelle und stabilisiert, sowie aktiviert, p53. (4) Die p53-Aktivierung ist durch andere virale mit p53 interagierende Proteine, wie LANA1 oder RTA, regulierbar (Fribourg *et al.* 1999, Gwack *et al.* 2001). (5) Aktiviertes p53 kann als direkte Proteininteraktion am Mitochondrium mit anti-apoptischen Proteinen der BCL-Familie wie BCL-2 und BCL-xL interagieren und deren anti-apoptische Wirkung aufheben.

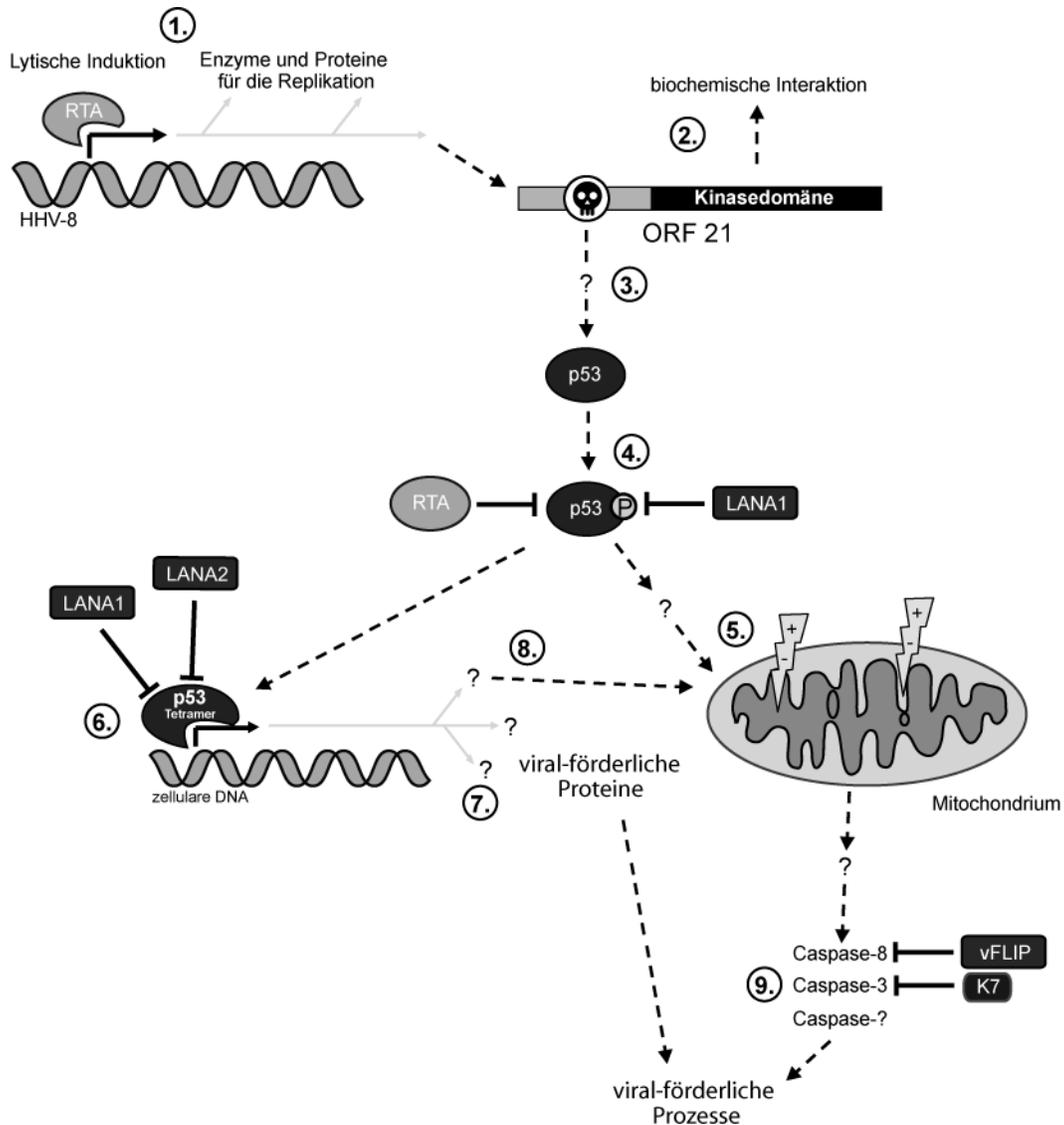


Abb. 40, Schematisches hypothetisches Interaktionsmodell der HHV-8tk

Durch RTA wird der lytische Zyklus (1) initialisiert und führt zu Transkription von Enzymen und Proteinen für die virale Replikation. Unter anderem wird die HHV-8tk transkribiert und kann dann als Thymidinkinase biochemisch interagieren (2). Die TK kodiert für die N-terminale Signaldomäne, die p53 (3) durch bisher unbekannte Prozesse aktivieren kann. Die p53-Aktivierung ist durch andere virale Proteine wie LANA1 oder RTA regulierbar (4). Aktiviertes p53 kann als direkte Proteininteraktion am Mitochondrium den Zelltod initialisieren (5). Aktiviertes und tetramerisiertes p53 wirkt als Transkriptionsfaktor (6), dessen Wirkung durch LANA1 oder LANA2 regulierbar ist.

Die p53-abhängige Transkription kann für das Virus verschiedene vorteilhafte Proteine (7) oder pro-apoptotische (8.) Gene transkribieren. Durch pro-apoptotische Vorgänge und der direkten Einwirkung von p53 kann der Zelltod initialisiert werden (9). Dabei können Caspasen aktiviert werden, die durch virale Proteine wie vFLIP oder K7 regulierbar sind. Ein gewisses definiertes Subspektrum an aktivierten Caspasen kann für virale Prozesse, wie die virale Reifung/Prozessierung, verbesserte Virionenknospung oder für das „Immune Clearance“ wichtig sein.

Dadurch können Zelltod assoziierte Prozesse ausgelöst werden und eine erste Initialisierungswelle für den Zelltod ablaufen. (6) Aktiviertes und tetramerisiertes p53 wirkt als Transkriptionsfaktor. Diese Wirkung kann durch LANA1 oder LANA2 inhibiert werden. Dabei konnte LANA2 die Transkriptionsaktivierung von p53 durch die HHV-8 $tk$  nur teilweise unterdrücken. Durch die p53 abhängige Transkription werden pro-apoptotische (8) Gene wie BAX, PUMA oder Noxa transkribiert und theoretisch auch andere für das Virus vorteilhafte Gene (7) (Yu *et al.* 1999). (9) Durch pro-apoptotische Vorgänge der durch p53 transkriptionsaktivierenden Gene und der direkten Einwirkung von p53 am Mitochondrium, kann der Zelltod durch das Aktivieren von Caspasen ausgelöst werden.

Dabei ist die Interaktion von vFLIP mit Caspase-8 und K7 mit Caspase-3 beschrieben und trägt vermutlich zur Regulation von einem möglichen viral initialisierten Zelltod bei (Bertin *et al.* 1997, Hu *et al.* 1997, Thome *et al.* 1997, Wang *et al.* 2002). Weitere andere Caspasen könnten aktiviert sein und deren Wirkung viral kontrolliert werden. Die viral vorteilhaften Proteine und die am Zelltod beteiligten Prozesse nutzt das Virus für seine Replikation oder Interaktion mit dem Wirt.

#### **5.4.8.1 Viral förderliche mitochondriale Interaktion**

Neben der Schaltstelle zum Auslösen des Zelltods, ist das Mitochondrium ein wichtiges biochemisches Kompartiment. Im Mitochondrium wird ATP generiert und es ist ein durch eine innere und äußere Membran vom Zytosol getrenntes Organell mit eigenem Nukleotidstoffwechsel innerhalb der mitochondrialen Matrix, der durch eine mitochondriale Thymidinkinase deutlich wird.

Der ATP/ADP Austausch des Mitochondriums mit dem Zytosol wird durch den „Adenine nucleotide translocator“ (ANT) bewerkstelligt (Souverijn JH *et al.* 1970). Neben der Funktion als ANT kann das Protein beim Auslösen des Zelltods an der Entstehung des „Permeability transition pore complex“ (PTPC) teilnehmen. Durch die Formation des PTPC-Multiproteinkomplex bricht das mitochondriale Potential zusammen und es können Proteine die kleiner als 1500 Da sind aus dem Mitochondrium ins Zytosol gelangen. Unter anderem wird dadurch vermutlich auch Cytochrom-C freigesetzt, welches im Zytosol die Aktivierung von Caspasen initialisieren kann (Kroemer G und Reed JC 2000, Zoratti M und Szabo I 1995).

Das Virus greift möglicherweise über seine HHV-8 $t_k$  das Mitochondrium an, um möglicherweise die Formation der PTPC zu verursachen. Durch diese können Moleküle, die nicht größer als 1500 Da sind frei diffundieren. Die Thymidinkinase wird bevorzugt in der späten Phase der Replikation des Virus exprimiert, um Nucleotidengpässe bei der Replikation zu umgehen. Abhängig von der Spezialisierung des Zelltyps, befinden sich von einigen hundert bis zu zehntausend Mitochondrien in der Wirtszelle und bilden ein gewisses Reservoir für Nucleotide und andere biochemische Moleküle. Alle geladenen Moleküle sind nicht membrangängig und müssen durch Membranporen transportiert werden. Durch die Formation des PTPC ist es möglich das Nucleotide und andere Moleküle die kleiner als 1500 Da sind aus der Matrix des Mitochondriums, wie zum Beispiel Desoxytriphosphat-Thymidin (ca. 480 Da), ins Zytosol gelangen können. In der Endphase des lytischen Zyklus ist es möglicherweise wichtig, die Synthese des viralen Genoms mit allen Mitteln abzuschließen, um dann das replizierte Virengenom in Virionen zu verpacken und die zum Sterben verurteilte Wirtszelle zu verlassen. Diese durch die Formation des PTPC freigesetzten mitochondrialen Nucleotide könnten dazu beitragen, diese Ziel des Virus schneller und unter Ausnutzung aller Reservoirs zu erreichen. Die zelluläre ATP-Quelle ist am Ende des lytischen Zyklus für das Erhalten der Energiebilanz in der Wirtszelle vielleicht nicht mehr von entscheidender Bedeutung und der vorhandene ATP-Spiegel reicht aus, damit die virale Replikation abgeschlossen werden kann und die Virionen die Wirtszelle geordnet verlassen können. Zusätzlich ist der intrazelluläre ATP-Spiegel wichtig, da über diesen die Art des Zelltodes beeinflusst werden kann (Nicotera P und Leist M 1997). Der durch die HHV-8 $t_k$  initialisierte Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials und den damit verbundenen Verlust der ATP-Produktion, gäbe dem Virus eine zusätzliche Möglichkeit, Einfluss auf die Art und Weise des initialisierten Zelltodes zu nehmen.

#### **5.4.8.2 Viral förderliche Caspaseinteraktion**

Einerseits sind aktive Caspasen für das Ausführen des Zelltodes verantwortlich und haben ein breites Spektrum an zellulären Substraten (Fischer *et al.* 2003). Wichtige Substrate sind unter anderem auch Proteine der Signaltransduktion, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren (Utz PJ und Anderson P 2000). Über die Substratspezifität der aktivierten Caspasen und in welchem Umfang die Caspasen aktiviert sind, könnte das Virus zusätzliche auf das Verhalten

einer apoptotischen Wirtszelle Einfluss nehmen. Für HHV-8 sind mit K7 und vFLIP Caspase regulierende virale Proteine bekannt, über die HHV-8 Einfluss nehmen könnte, welche Caspase aktiv sein soll, um den Zelltod der Wirtszelle dadurch zu regulieren (Wang *et al.* 2002, Djerbi *et al.* 1999, Belanger *et al.* 2001, Thome *et al.* 1997).

Andererseits sind Caspasen nicht ausschließlich am Zelltod beteiligt und können auch an der Proliferation und Differenzierung von Zellen teilnehmen. Dies bedeutet, dass unter gewissen Umständen Caspasen limitiert aktiviert werden können, ohne zwangsläufig den Zelltod auszulösen (Algeciras-Schimmich *et al.* 2002, Schwerk C und Schulze-Osthoff K 2003). Zum Beispiel hat sehr wahrscheinlich Caspase-8 eine Bedeutung bei der Proliferation von T-Zellen. Dabei werden durch die T-Zellrezeptor-Stimulation Caspasen aktiviert, dabei die Proliferation der Zellen angeregt, ohne dass in den stimulierten Zellen Apoptose ausgelöst wird. T-Zellen mit Defekten in der Caspase-8-Aktivierung oder -Expression zeigten sich als proliferationsinhibiert (Chung *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2001). Durch dieses Beispiel wird deutlich, dass es möglich ist, für andere Prozesse als den Zelltod, Caspasen begrenzt zu aktivieren. Das Prokapsid der Herpesviren unterliegt einem durch eine proteolytische Spaltung ausgelöstem Reifungsprozess (Newcomb *et al.* 1996, Newcomb *et al.* 1999, Sheaffer *et al.* 2001). Begrenzt aktivierte Caspasen könnten als proteolytische Enzyme mit definierter Spaltstelle bei der Reifung und Prozessierung von viralen Proteinen mithelfen, damit gereifte Virionen entstehen.

Darüber hinaus sind für die Migration und Ausbreitung von Zellen Caspase abhängige Prozesse beschrieben und zusätzlich ein weites Substratspektrum von zellulären Strukturproteinen wie Aktin oder Vimentin bekannt (Watanabe Y und Akaike T 1999, Mashima *et al.* 1999, Prasad *et al.* 1998). Es ist möglich, dass durch limitiert aktive Caspasen gewisse zelluläre Strukturen zerstört werden, um das Austreten der Virionen aus der Wirtszelle zu ermöglichen oder die Wirtszelle aus dem Zellverband heraus zu lösen und damit eine verbesserte Virionenverbreitung zu erreichen. Eine mögliche Veränderung der Zellstruktur, initialisiert durch die HHV-8 $t_k$ , wird durch die Entstehung von Zellinseln von HHV-8 $t_k$  transfizierten HEK293T-Zellen deutlich und ist unter anderem als Eigenschaft der HHV-8 $t_k$  beschrieben (Gill *et al.* 2005).

### 5.4.8.3 Viral förderliche immunologische Interaktion

Die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials ist ein Hinweis darauf, dass die HHV-8*tk* möglicherweise den Zelltod auslöst. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die HHV-8*tk* das gesuchte Zelltod auslösende Gen im lytischen Zyklus von HHV-8 ist, dessen Transkription sich durch Ganciclovir nicht inhibieren lässt. Zelltod begleitende molekularbiologische Prozesse, wie die Fragmentierung der zellulären DNA und morphologische Veränderungen, wie kondensierte Mitochondrien, wurden im lytischen Modellsystem von HHV-8 beobachtet (Kim O und Yi SJ 2003, Klass *et al.* 2005, Tinari *et al.* 2000). Aus diesen Gründen kann wahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass die HHV-8*tk* den Zelltod der lytisch induzierten Wirtszelle auslöst.

Jede Wirtszelle steht in Interaktion mit dem Immunsystem. Auf diese Interaktion kann das Virus mit Hilfe von viralen Proteinen während der Latenz und im lytischen Zyklus Einfluss nehmen, um unter anderem vom Immunsystem möglichst unbemerkt zu bleiben (Michelson S 2004). Eine kontrollierte Zerstörung der Wirtszelle nach vollendeter Replikation der Virionen und beim Verlassen der Wirtszelle, bedeutet eine elegante Möglichkeit eines definierten Endes der ausgebeuteten Wirtszelle. Innerhalb der Latenz und Lyse hat das Virus seinen gesamten Lebenszyklus einmal durchlaufen und läuft Gefahr für das Immunsystem erkennbare Spuren zu hinterlassen. Eine apoptotische Zelle, die sich selbst zerstört, bietet die Gelegenheit mit einer minimalen Immunkonfrontation ein molekulares Aufräumen zu initialisieren („Apoptotic Clearance“).

Die Beseitigung von sterbenden Zellen durch das Immunsystem wird unter anderem von phagozytierenden Makrophagen betrieben. Diese können jedoch im Zusammenspiel mit dendritischen Zellen, bei einer Fremderkennung, eine Immunreaktion auslösen (Savill J und Fadok V 2000, Taylor *et al.* 2000). Ein weiteres Ziel des Virus könnte es sein, mit Hilfe seiner HHV-8*tk* eine mögliche inflammatorische Antwort zu kontrollieren und eine Immuntoleranz gegen virale Antigene zu etablieren. Apoptotische Zellen können anti-inflammatorische Faktoren wie IL-10 oder "Transforming Growth Factor" (TGF)-1 $\beta$  freisetzen (Gao *et al.* 1998, Chen *et al.* 2001). TGF-1 $\beta$  ist ein anti-inflammatorischer Faktor der para- und autokrin wirkend, die Inflammation unterdrücken kann (Newman *et al.* 1982, Fadok *et al.* 1998). In Thymocyten konnte beobachtet werden, dass während deren Apoptose TGF-1 $\beta$ , nach dem Verlust des mitochondrialen Potentials, freigesetzt wurde und zur Immunsuppression beiträgt

(Chen *et al.* 2001). Das Auslösen der Depolarisierung des mitochondrialen Potentials, als Merkmal des Zelltodes, konnte für die HHV-8*tk* gezeigt werden. Weiterhin verhindert IL-10 die Ausreifung für die Immunpräsentation wichtigen dendritischen Zellen (De Smedt *et al.* 1997). In PEL-Zellkulturüberständen wurde neben dem B-Zell-Wachstumsfaktor IL-6 (viral und human), auch IL-10 nachgewiesen (Jones *et al.* 1999). TGF-1 $\beta$  und IL-10 könnten ein Hinweis sein, dass HHV-8 mit Hilfe seiner HHV-8*tk* eine Immuntoleranz fördert, um einer möglichen Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen und möglicherweise eine dauerhafte Immuntoleranz zu etablieren.

#### **5.4.9 KS und die HHV-8*tk***

HHV-8 ist bei der Entstehung des humanen Tumors Kaposi-Sarkom ein wichtiger Ko-Faktor (Chang *et al.* 2004). Das Tumorsuppressorgen p53 weist in 50% aller humaner Tumoren Mutationen auf (Greenblatt *et al.* 1994). Die Untersuchungen für den Mutationsstatus von p53 bei KS zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Die Mehrheit der untersuchten KS-Fälle wies keine p53-Mutationen auf, jedoch wurden auch p53-Mutationen bei KS nachgewiesen (Scinicariello *et al.* 1994, Zietz *et al.* 1998). Weil p53 mehrheitlich nicht mutiert ist, kann davon ausgegangen werden, dass der p53-Mutationsstatus vermutlich keine essentielle Rolle für die Entwicklung von KS spielt. HHV-8 exprimiert während der Latenz virale Proteine, die mit p53 interagieren. Dazu zählt zum Beispiel LANA1 das mit p53 direkt interagiert, dessen Transkriptionsaktivierung inhibiert und anti-apoptotisch wirkt. In PEL-Zellen wurde beobachtet, dass LANA1 mit p53 im Zellkern ko-lokalisiert (Katano H *et al.* 2001). Dies ist ein Hinweis darauf, dass HHV-8 vermutlich in der Lage ist, p53 selbst zu kontrollieren. Es ist wahrscheinlich, dass LANA1 in KS die gleiche Wirkung hat und damit KS von einem möglichen Mutationsstatus bei p53 unabhängig zu sein scheint. Dies schließt aber die Möglichkeit nicht aus, dass trotz des hauptsächlich in KS vorhandenen Wildtyp-p53, möglicherweise Veränderungen in mit p53 interagierenden Signalwegen vorhanden sein können und damit eine Mutation von p53 unnötig wäre (Ryan *et al.* 2001).

Das bei KS hauptsächlich im Wildtypstatus vorhandene p53, ist für einen möglichen Einsatz der HHV-8*tk* als Zelltod auslösendes Gen zur Kontrolle von KS eine mögliche Voraussetzung. Jede KS- und HHV-8 infizierte Zelle trägt das HHV-8*tk*-Gen bereits in sich. Es sind Studien zur Promotoregulation der HHV-8*tk* bekannt (Zhang *et al.* 1998). Solche Studien eröffnen die

theoretische Möglichkeit, unabhängig vom viralen Lebenszyklus, Einfluss auf die Expression der HHV-8 $t_k$  zu nehmen. Der latente Status bedeutet das Verstecken des Virus vor dem Immunsystem in einer Wirtszelle und bildet ein Reservoir an HHV-8 infizierten Zellen. In diesem Status ist das Virus schwer angreifbar, da es fast inaktiv nur als Episom in der Wirtszelle vorliegt und nur wenige HHV-8 Proteine exprimiert werden, um den latenten Status aufrecht zu erhalten. Durch die erzwungene Induktion des lytischen Zyklus und der gleichzeitigen Kontrolle der Expression der HHV-8 $t_k$  wäre es vermutlich möglich, die Etablierung von KS aus latenten Zellen zu verhindern, HHV-8 aus zellulären Reservoiren zu locken und den vollständigen Ablauf der Virenreplikation zu verhindern.

Für KS wird weiterhin vermutet, dass die zum Teil starke und schnelle Ausbreitung des Tumors auch darin begründet liegt, dass sich HHV-8 lytisch repliziert und im Organismus verteilt wird. Die verteilten Virionen können dann Zellen neu infizieren und in diesen vermutlich KS neu etablieren werden (Wang CY und Sugden D 2004). Zusätzlich ist bekannt, dass in KS-Läsionen die lytische Replikation des Virus stattfindet und eine ständige Neuinfektion von Wirtszellen für den Erhalt der KS-Läsionen notwendig zu sein scheint (Katano *et al.* 2001, Grundhoff H und Ganem D 2004). Eine Störung des lytischen Zyklus und der viralen Replikation, sowie Verhinderung der viral etablierten Immuntoleranz durch eine frühzeitige oder verhinderte Expression der HHV-8 $t_k$ , würden möglicherweise die Ausbreitung von HHV-8 und in Folge KS verhindern. Weiterhin hilft die Inhibierung der HHV-8-Replikation vermutlich auch bei der Kontrolle anderer HHV-8 assoziierter Tumoren wie PEL oder MCD. Bereits bestehende therapeutische Ansätze zur Behandlung von KS sind die Verwendung von Ganciclovir und anderen Nukleosidanaloga zur Inhibierung der lytischen Replikation. Die Ergebnisse sind abhängig vom angewendeten Nukleosidanalogen und reichen von einem geringen bis zu einem deutlichen Rückgang von KS (Kedes D H und Ganem D 1997, Zhu *et al.* 2005).

Die Eigenschaft der HHV-8 $t_k$  N-terminalen Signaldomäne lässt sich vermutlich auch in therapeutischen Ansätzen allein verwenden. Das Virus demonstriert durch die HHV-8 $t_k$ , dass es trotz der viralen p53-interagierenden und anti-apoptischen Proteine wie LANA1 oder LANA2 möglich zu sein scheint, den Zelltod gezielt auszulösen.

Abhängig vom darunter liegenden *in vivo* Mechanismus kann einerseits die gezielte Anwendung in therapeutischen Ansätzen eine spezifische Wirkung erreichen. Andererseits

können für die Grundlagenforschung sehr tief greifende Erkenntnisse der molekularen Mechanismen erzielt werden, da virale Eingriffe oft an zentralen Schaltpunkten innerhalb der Wirtszelle stattfinden.

## 6. Literatur

1. Ablashi, D.V., et al., *Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(3): p. 439-64.
2. Albayrak, T. and S. Grimm, *A high-throughput screen for single gene activities: isolation of apoptosis inducers*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(4): p. 772-6.
3. Albayrak, T., et al., *The tumor suppressor cybL, a component of the respiratory chain, mediates apoptosis induction*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(8): p. 3082-96.
4. Albrecht, J.C., et al., *Primary structure of the herpesvirus saimiri genome*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 5047-58.
5. Algeciras-Schimmich, A., B.C. Barnhart, and M.E. Peter, *Apoptosis-independent functions of killer caspases*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(6): p. 721-6.
6. An, J., et al., *The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces cellular interleukin 6 expression: role of the KSHV latency-associated nuclear antigen and the AP-1 response element*. Blood, 2002. **99**(2): p. 649-54.
7. Angel, P. and M. Karin, *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1072**(2-3): p. 129-57.
8. AuCoin, D.P., et al., *Amplification of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 lytic origin of DNA replication is dependent upon a cis-acting AT-rich region and an ORF50 response element and the trans-acting factors ORF50 (K-Rta) and K8 (K-bZIP)*. Virology, 2004. **318**(2): p. 542-55.
9. Avantaggiati, M.L., et al., *Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1175-84.
10. Ballestas, M.E., P.A. Chatis, and K.M. Kaye, *Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen*. Science, 1999. **284**(5414): p. 641-4.
11. Belanger, C., et al., *Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein inhibits Fas-mediated apoptosis through binding and prevention of procaspase-8 maturation*. J Hum Virol, 2001. **4**(2): p. 62-73.
12. Bello, L.J., et al., *The human herpesvirus-8 ORF 57 gene and its properties*. J Gen Virol, 1999. **80** ( Pt 12): p. 3207-15.
13. Bertin, J., et al., *Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): p. 1172-6.
14. Blaydes, J.P., et al., *Stoichiometric phosphorylation of human p53 at Ser315 stimulates p53-dependent transcription*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4699-708.
15. Bonizzi, G., et al., *Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers*. Embo J, 2004. **23**(21): p. 4202-10.
16. Bornkamm, G.W., et al., *Structure of Herpesvirus saimiri genomes: arrangement of heavy and light sequences in the M genome*. J Virol, 1976. **19**(1): p. 154-61.
17. Bowser, B.S., S.M. DeWire, and B. Damania, *Transcriptional regulation of the K1 gene product of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Virol, 2002. **76**(24): p. 12574-83.
18. Brodeur, S.R., et al., *Localization of the major NF-kappaB-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs*. J Biol Chem, 1997. **272**(32): p. 19777-84.

19. Buschmann, T., et al., *SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53*. Cell, 2000. **101**(7): p. 753-62.
20. Cahir McFarland, E.D., K.M. Izumi, and G. Mosialos, *Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-kappaB*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6959-64.
21. Cannon, J.S., et al., *Human herpesvirus 8-encoded thymidine kinase and phosphotransferase homologues confer sensitivity to ganciclovir*. J Virol, 1999. **73**(6): p. 4786-93.
22. Cesarman, E., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas*. N Engl J Med, 1995. **332**(18): p. 1186-91.
23. Chang, Y., et al., *Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma*. Science, 1994. **266**(5192): p. 1865-9.
24. Chang, Y., et al., *Cyclin encoded by KS herpesvirus*. Nature, 1996. **382**(6590): p. 410.
25. Chen, J., et al., *Transcriptional regulation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor gene*. J Virol, 2000. **74**(18): p. 8623-34.
26. Chen, W., et al., *TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu*. Immunity, 2001. **14**(6): p. 715-25.
27. Chen, X., et al., *p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells*. Genes Dev, 1996. **10**(19): p. 2438-51.
28. Chun, H.J., et al., *Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 395-9.
29. Ciuffo, D.M., et al., *Spindle cell conversion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: formation of colonies and plaques with mixed lytic and latent gene expression in infected primary dermal microvascular endothelial cell cultures*. J Virol, 2001. **75**(12): p. 5614-26.
30. Clarke, P.G., *Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms*. Anat Embryol (Berl), 1990. **181**(3): p. 195-213.
31. Cockerell, C.J., *Histopathological features of Kaposi's sarcoma in HIV infected individuals*. Cancer Surv, 1991. **10**: p. 73-89.
32. Coen, D.M., et al., *Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(12): p. 4736-40.
33. Cohen, D.R., et al., *The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes*. Genes Dev, 1989. **3**(2): p. 173-84.
34. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 1997. **326 ( Pt 1)**: p. 1-16.
35. Cuddihy, A.R., et al., *Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2475-84.
36. Cuddihy, A.R., et al., *The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro*. Oncogene, 1999. **18**(17): p. 2690-702.
37. Curreli, F., et al., *Transcriptional downregulation of ORF50/Rta by methotrexate inhibits the switch of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 from latency to lytic replication*. J Virol, 2002. **76**(10): p. 5208-19.
38. Davis, R.J., *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases*. Cell, 2000. **103**(2):

- p. 239-52.
39. De Smedt, T., et al., *Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function*. Eur J Immunol, 1997. **27**(5): p. 1229-35.
  40. Deffie, A., et al., *The tumor suppressor p53 regulates its own transcription*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(6): p. 3415-23.
  41. Deng, H., et al., *Rta of the human herpesvirus 8/Kaposi sarcoma-associated herpesvirus up-regulates human interleukin-6 gene expression*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1919-21.
  42. Deng, H., et al., *Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)*. J Virol, 2002. **76**(16): p. 8252-64.
  43. Deng, H., A. Young, and R. Sun, *Auto-activation of the rta gene of human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 12): p. 3043-8.
  44. Devergne, O., et al., *Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 7098-108.
  45. Dittmer, D., et al., *A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 8309-15.
  46. Djerbi, M., et al., *The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 1025-32.
  47. Du, M.Q., et al., *Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infects monotypic (IgM lambda) but polyclonal naive B cells in Castleman disease and associated lymphoproliferative disorders*. Blood, 2001. **97**(7): p. 2130-6.
  48. Dupin, N., et al., *Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4546-51.
  49. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 859-68.
  50. el-Deiry, W.S., et al., *Definition of a consensus binding site for p53*. Nat Genet, 1992. **1**(1): p. 45-9.
  51. Erster, S., et al., *In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(15): p. 6728-41.
  52. Fadok, V.A., et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 890-8.
  53. Falke, D., R. Siegert, and W. Vogell, *[Electron microscopic findings on the problem of double membrane formation in herpes simplex virus.]*. Arch Gesamte Virusforsch, 1959. **9**: p. 484-96.
  54. Fan, T.J., et al., *Caspase family proteases and apoptosis*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005. **37**(11): p. 719-27.
  55. Fang, S., et al., *Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8945-51.
  56. Fischer, U., R.U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff, *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 76-100.
  57. Flore, O., et al., *Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's*

- sarcoma-associated herpesvirus*. Nature, 1998. **394**(6693): p. 588-92.
58. Foreman, K.E., *Kaposi's sarcoma: the role of HHV-8 and HIV-1 in pathogenesis*. Expert Rev Mol Med, 2001. **2001**: p. 1-17.
  59. Franz, W.M., P. Berger, and J.Y. Wang, *Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential*. Embo J, 1989. **8**(1): p. 137-47.
  60. Freedman, D.A. and A.J. Levine, *Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 7288-93.
  61. Friborg, J., Jr., et al., *p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death*. Nature, 1999. **402**(6764): p. 889-94.
  62. Friborg, J., Jr., et al., *Distinct biology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from primary lesions and body cavity lymphomas*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 10073-82.
  63. Friedman, P.N., et al., *The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3319-23.
  64. Fuchs, S.Y., et al., *Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination*. Oncogene, 1998. **17**(19): p. 2543-7.
  65. Gaidano, G., et al., *Association of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-positive primary effusion lymphoma with expression of the CD138/syndecan-1 antigen*. Blood, 1997. **90**(12): p. 4894-900.
  66. Gao, S.J., et al., *KSHV ORF K9 (vIRF) is an oncogene which inhibits the interferon signaling pathway*. Oncogene, 1997. **15**(16): p. 1979-85.
  67. Gao, Y., et al., *Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis*. J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 887-96.
  68. Gatti, A., et al., *Phosphorylation of human p53 on Thr-55*. Biochemistry, 2000. **39**(32): p. 9837-42.
  69. Gentry, G.A., *Viral thymidine kinases and their relatives*. Pharmacol Ther, 1992. **54**(3): p. 319-55.
  70. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. Cell, 2002. **109** **Suppl**: p. S81-96.
  71. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
  72. Gill, M.B., J.E. Murphy, and J.D. Fingerroth, *Functional divergence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and related gamma-2 herpesvirus thymidine kinases: novel cytoplasmic phosphoproteins that alter cellular morphology and disrupt adhesion*. J Virol, 2005. **79**(23): p. 14647-59.
  73. Goltz, M., et al., *Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4: its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses*. Virus Genes, 1994. **9**(1): p. 53-9.
  74. Gradoville, L., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50/Rta protein activates the entire viral lytic cycle in the HH-B2 primary effusion lymphoma cell line*. J Virol, 2000. **74**(13): p. 6207-12.
  75. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
  76. Grand, R.J., et al., *The high levels of p53 present in adenovirus early region 1-transformed human cells do not cause up-regulation of MDM2 expression*. Virology, 1995. **210**(2): p. 323-34.
  77. Grebenok, R.J., et al., *Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of*

- nuclear targeting*. Plant J, 1997. **11**(3): p. 573-86.
78. Greenblatt, M.S., et al., *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. Cancer Res, 1994. **54**(18): p. 4855-78.
  79. Groves, A.K., et al., *The latency-associated nuclear antigen encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates two major essential Epstein-Barr virus latent promoters*. J Virol, 2001. **75**(19): p. 9446-57.
  80. Grundhoff, A. and D. Ganem, *Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis*. J Clin Invest, 2004. **113**(1): p. 124-36.
  81. Gu, W., X.L. Shi, and R.G. Roeder, *Synergistic activation of transcription by CBP and p53*. Nature, 1997. **387**(6635): p. 819-23.
  82. Gustafson, E.A., et al., *The Epstein-Barr virus thymidine kinase does not phosphorylate ganciclovir or acyclovir and demonstrates a narrow substrate specificity compared to the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(11): p. 2923-31.
  83. Gustafson, E.A., R.F. Schinazi, and J.D. Fingerroth, *Human herpesvirus 8 open reading frame 21 is a thymidine and thymidylate kinase of narrow substrate specificity that efficiently phosphorylates zidovudine but not ganciclovir*. J Virol, 2000. **74**(2): p. 684-92.
  84. Gwack, Y., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50 represses p53-induced transcriptional activity and apoptosis*. J Virol, 2001. **75**(13): p. 6245-8.
  85. Haupt, Y., et al., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 296-9.
  86. Haupt, Y., et al., *Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53*. Genes Dev, 1995. **9**(17): p. 2170-83.
  87. Hernandez, S.E., et al., *How do Abl family kinases regulate cell shape and movement?* Trends Cell Biol, 2004. **14**(1): p. 36-44.
  88. Herrold, R.E., et al., *Glycoprotein 110, the Epstein-Barr virus homolog of herpes simplex virus glycoprotein B, is essential for Epstein-Barr virus replication in vivo*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 2049-54.
  89. Holton, R.H. and G.A. Gentry, *The Epstein-Barr virus genome encodes deoxythymidine kinase activity in a nested internal open reading frame*. Intervirology, 1996. **39**(4): p. 270-4.
  90. Honda, R., H. Tanaka, and H. Yasuda, *Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53*. FEBS Lett, 1997. **420**(1): p. 25-7.
  91. Hu, S., et al., *I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17255-7.
  92. Hupp, T.R., et al., *Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(14): p. 3167-74.
  93. Hwang, E.S., L.K. Naeger, and D. DiMaio, *Activation of the endogenous p53 growth inhibitory pathway in HeLa cervical carcinoma cells by expression of the bovine papillomavirus E2 gene*. Oncogene, 1996. **12**(4): p. 795-803.
  94. Hwang, E.S., et al., *Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene*. J Virol, 1993. **67**(7): p. 3720-9.
  95. Hyun, T.S., et al., *Latency-associated nuclear antigen encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with Tat and activates the long terminal repeat of*

- human immunodeficiency virus type 1 in human cells.* J Virol, 2001. **75**(18): p. 8761-71.
96. Izumi, K.M., K.M. Kaye, and E.D. Kieff, *The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): p. 1447-52.
  97. Izumi, K.M. and E.D. Kieff, *The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12592-7.
  98. Jeong, J., J. Papin, and D. Dittmer, *Differential regulation of the overlapping Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vGCR (orf74) and LANA (orf73) promoters.* J Virol, 2001. **75**(4): p. 1798-807.
  99. Jochum, W., E. Passegue, and E.F. Wagner, *AP-1 in mouse development and tumorigenesis.* Oncogene, 2001. **20**(19): p. 2401-12.
  100. Jones, K.D., et al., *Involvement of interleukin-10 (IL-10) and viral IL-6 in the spontaneous growth of Kaposi's sarcoma herpesvirus-associated infected primary effusion lymphoma cells.* Blood, 1999. **94**(8): p. 2871-9.
  101. Kao, C.C., P.R. Yew, and A.J. Berk, *Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins.* Virology, 1990. **179**(2): p. 806-14.
  102. Kapoor, M. and G. Lozano, *Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2834-7.
  103. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.
  104. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death.* Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 221-7.
  105. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 240-6.
  106. Karsenty, G. and E.F. Wagner, *Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development.* Dev Cell, 2002. **2**(4): p. 389-406.
  107. Katano, H., et al., *Expression of human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded immediate early protein, open reading frame 50, in HHV-8-associated diseases.* J Hum Virol, 2001. **4**(2): p. 96-102.
  108. Katano, H., Y. Sato, and T. Sata, *Expression of p53 and human herpesvirus-8 (HHV-8)-encoded latency-associated nuclear antigen with inhibition of apoptosis in HHV-8-associated malignancies.* Cancer, 2001. **92**(12): p. 3076-84.
  109. Kedes, D.H. and D. Ganem, *Sensitivity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication to antiviral drugs. Implications for potential therapy.* J Clin Invest, 1997. **99**(9): p. 2082-6.
  110. Kedes, D.H. and D. Ganem, *Sensitivity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication to antiviral drugs. Implications for potential therapy.* J Clin Invest, 1997. **99**(9): p. 2082-6.
  111. Kieser, A., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade.* Embo J, 1997. **16**(21): p. 6478-85.
  112. Kim, O. and S.J. Yi, *Lytic replication of Human herpesvirus 8 and induction of*

- apoptosis. *Acta Virol*, 2003. **47**(2): p. 91-5.
113. Klass, C.M., et al., *The targeting of primary effusion lymphoma cells for apoptosis by inducing lytic replication of human herpesvirus 8 while blocking virus production*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4028-34.
  114. Knight, J.S., M.A. Cotter, 2nd, and E.S. Robertson, *The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus transactivates the telomerase reverse transcriptase promoter*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(25): p. 22971-8.
  115. Krishnan, H.H., et al., *Concurrent expression of latent and a limited number of lytic genes with immune modulation and antiapoptotic function by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus early during infection of primary endothelial and fibroblast cells and subsequent decline of lytic gene expression*. *J Virol*, 2004. **78**(7): p. 3601-20.
  116. Kroemer, G. and J.C. Reed, *Mitochondrial control of cell death*. *Nat Med*, 2000. **6**(5): p. 513-9.
  117. Kubbutat, M.H. and K.H. Vousden, *Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(1): p. 460-8.
  118. Kunsch, C., S.M. Ruben, and C.A. Rosen, *Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(10): p. 4412-21.
  119. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. *Nature*, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
  120. Lee, H., et al., *Deregulation of cell growth by the K1 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. *Nat Med*, 1998. **4**(4): p. 435-40.
  121. Lenart, P. and J. Ellenberg, *Monitoring the permeability of the nuclear envelope during the cell cycle*. *Methods*, 2006. **38**(1): p. 17-24.
  122. Levine, A.J., *The p53 protein and its interactions with the oncogene products of the small DNA tumor viruses*. *Virology*, 1990. **177**(2): p. 419-26.
  123. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 323-31.
  124. Li, H.H., et al., *Phosphorylation on Thr-55 by TAF1 mediates degradation of p53: a role for TAF1 in cell G1 progression*. *Mol Cell*, 2004. **13**(6): p. 867-78.
  125. Li, M., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin*. *J Virol*, 1997. **71**(3): p. 1984-91.
  126. Lill, N.L., et al., *Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators*. *Nature*, 1997. **387**(6635): p. 823-7.
  127. Lim, C., et al., *The transcriptional activity of cAMP response element-binding protein-binding protein is modulated by the latency associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(33): p. 31016-22.
  128. Liu, L., et al., *The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the Ikappa B kinase complex*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(16): p. 13745-51.
  129. Liu, L., et al., *p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(2): p. 1202-9.
  130. Lock, M.J., et al., *Azidodeoxythymidine and didehydrodeoxythymidine as inhibitors and substrates of the human herpesvirus 8 thymidine kinase*. *J Antimicrob Chemother*, 2002. **49**(2): p. 359-66.
  131. Lu, H., et al., *Ultraviolet radiation, but not gamma radiation or etoposide-induced DNA damage, results in the phosphorylation of the murine p53 protein at serine-389*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(11): p. 6399-402.

132. Lu, M., et al., *Dissection of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression program by using the viral DNA replication inhibitor cidofovir*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 13637-52.
133. Lukac, D.M., J.R. Kirshner, and D. Ganem, *Transcriptional activation by the product of open reading frame 50 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is required for lytic viral reactivation in B cells*. J Virol, 1999. **73**(11): p. 9348-61.
134. Lukac, D.M., et al., *Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein*. Virology, 1998. **252**(2): p. 304-12.
135. Lukas, J., et al., *DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1*. J Cell Biol, 1994. **125**(3): p. 625-38.
136. Luppi, M., et al., *Nonmalignant disease associated with human herpesvirus 8 reactivation in patients who have undergone autologous peripheral blood stem cell transplantation*. Blood, 2000. **96**(7): p. 2355-7.
137. Maniatis, T., *A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kappaB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways*. Genes Dev, 1999. **13**(5): p. 505-10.
138. Marchenko, N.D., A. Zaika, and U.M. Moll, *Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16202-12.
139. Marchetti, P., et al., *Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1155-60.
140. Marchetti, P., et al., *Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis*. J Immunol, 1996. **157**(11): p. 4830-6.
141. Mashima, T., M. Naito, and T. Tsuruo, *Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis*. Oncogene, 1999. **18**(15): p. 2423-30.
142. Matolcsy, A., et al., *Immunoglobulin VH gene mutational analysis suggests that primary effusion lymphomas derive from different stages of B cell maturation*. Am J Pathol, 1998. **153**(5): p. 1609-14.
143. Matta, H. and P.M. Chaudhary, *Activation of alternative NF-kappa B pathway by human herpes virus 8-encoded Fas-associated death domain-like IL-1 beta-converting enzyme inhibitory protein (vFLIP)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9399-404.
144. Matta, H., et al., *Molecular genetic analysis of human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein-induced NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52406-11.
145. Meek, D.W., *Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification?* Oncogene, 1999. **18**(53): p. 7666-75.
146. Michel, D. and T. Mertens, *The UL97 protein kinase of human cytomegalovirus and homologues in other herpesviruses: impact on virus and host*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1697**(1-2): p. 169-80.
147. Michelson, S., *Consequences of human cytomegalovirus mimicry*. Hum Immunol, 2004. **65**(5): p. 465-75.
148. Mihara, M., et al., *p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 577-90.
149. Miller, G., et al., *Selective switch between latency and lytic replication of Kaposi's*

- sarcoma herpesvirus and Epstein-Barr virus in dually infected body cavity lymphoma cells.* J Virol, 1997. **71**(1): p. 314-24.
150. Miyashita, T. and J.C. Reed, *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.* Cell, 1995. **80**(2): p. 293-9.
  151. Montaner, S., et al., *Endothelial infection with KSHV genes in vivo reveals that vGPCR initiates Kaposi's sarcomagenesis and can promote the tumorigenic potential of viral latent genes.* Cancer Cell, 2003. **3**(1): p. 23-36.
  152. Moore, P.S., et al., *Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae.* J Virol, 1996. **70**(1): p. 549-58.
  153. Morgenbesser, S.D., et al., *p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens.* Nature, 1994. **371**(6492): p. 72-4.
  154. Mosavi, L.K., D.L. Minor, Jr., and Z.Y. Peng, *Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16029-34.
  155. Mosialos, G., et al., *The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family.* Cell, 1995. **80**(3): p. 389-99.
  156. Mund, T., et al., *Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum.* Faseb J, 2003. **17**(6): p. 696-8.
  157. Musacchio, A., M. Wilmanns, and M. Saraste, *Structure and function of the SH3 domain.* Prog Biophys Mol Biol, 1994. **61**(3): p. 283-97.
  158. Nakamura, H., et al., *Global changes in Kaposi's sarcoma-associated virus gene expression patterns following expression of a tetracycline-inducible Rta transactivator.* J Virol, 2003. **77**(7): p. 4205-20.
  159. Neipel, F., J.C. Albrecht, and B. Fleckenstein, *Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity?* J Virol, 1997. **71**(6): p. 4187-92.
  160. Neipel, F. and B. Fleckenstein, *The role of HHV-8 in Kaposi's sarcoma.* Semin Cancer Biol, 1999. **9**(3): p. 151-64.
  161. Newcomb, W.W., et al., *Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation.* J Mol Biol, 1996. **263**(3): p. 432-46.
  162. Newcomb, W.W., et al., *Assembly of the herpes simplex virus procapsid from purified components and identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins.* J Virol, 1999. **73**(5): p. 4239-50.
  163. Newman, S.L., J.E. Henson, and P.M. Henson, *Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages.* J Exp Med, 1982. **156**(2): p. 430-42.
  164. Nicotera, P. and M. Leist, *Energy supply and the shape of death in neurons and lymphoid cells.* Cell Death Differ, 1997. **4**(6): p. 435-42.
  165. Oda, E., et al., *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis.* Science, 2000. **288**(5468): p. 1053-8.
  166. Oda, K., et al., *p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53.* Cell, 2000. **102**(6): p. 849-62.
  167. Oettle, A.G., *Geographical and racial differences in the frequency of Kaposi's sarcoma as evidence of environmental or genetic causes.* Acta Unio Int Contra Cancrum, 1962. **18**: p. 330-63.

168. Omura, S., et al., *A new alkaloid AM-2282 OF Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization.* J Antibiot (Tokyo), 1977. **30**(4): p. 275-82.
169. Orłowski, R.Z. and A.S. Baldwin, Jr., *NF-kappaB as a therapeutic target in cancer.* Trends Mol Med, 2002. **8**(8): p. 385-9.
170. Osborne, J., P.S. Moore, and Y. Chang, *KSHV-encoded viral IL-6 activates multiple human IL-6 signaling pathways.* Hum Immunol, 1999. **60**(10): p. 921-7.
171. Pastore, R.D., et al., *Novel association of haemophagocytic syndrome with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related primary effusion lymphoma.* Br J Haematol, 2000. **111**(4): p. 1112-5.
172. Pereira, L., *Function of glycoprotein B homologues of the family herpesviridae.* Infect Agents Dis, 1994. **3**(1): p. 9-28.
173. Petit, P.X., et al., *Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis.* J Cell Biol, 1995. **130**(1): p. 157-67.
174. Polyak, K., et al., *Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest.* Genes Dev, 1996. **10**(15): p. 1945-52.
175. Polyak, K., et al., *A model for p53-induced apoptosis.* Nature, 1997. **389**(6648): p. 300-5.
176. Prasad, S.C., et al., *Apoptosis-associated proteolysis of vimentin in human prostate epithelial tumor cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **249**(2): p. 332-8.
177. Prives, C. and P.A. Hall, *The p53 pathway.* J Pathol, 1999. **187**(1): p. 112-26.
178. Puntervoll, P., et al., *ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3625-30.
179. Puri, P.L., et al., *A myogenic differentiation checkpoint activated by genotoxic stress.* Nat Genet, 2002. **32**(4): p. 585-93.
180. Radkov, S.A., P. Kellam, and C. Boshoff, *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, 2000. **6**(10): p. 1121-7.
181. Rayet, B. and C. Gelinas, *Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer.* Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6938-47.
182. Reich, N.C. and A.J. Levine, *Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells.* Nature, 1984. **308**(5955): p. 199-201.
183. Renne, R., et al., *Modulation of cellular and viral gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.* J Virol, 2001. **75**(1): p. 458-68.
184. Renne, R., et al., *Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture.* Nat Med, 1996. **2**(3): p. 342-6.
185. Ricciardi-Castagnoli, P. and F. Granucci, *Opinion: Interpretation of the complexity of innate immune responses by functional genomics.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(11): p. 881-9.
186. Rivas, C., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53.* J Virol, 2001. **75**(1): p. 429-38.
187. Rothwarf, D.M. and M. Karin, *The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus.* Sci STKE, 1999. **1999**(5): p. RE1.
188. Ruegg, U.T. and G.M. Burgess, *Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases.* Trends Pharmacol Sci, 1989. **10**(6): p. 218-20.

189. Russo, J.J., et al., *Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14862-7.
190. Ryan, K.M., A.C. Phillips, and K.H. Vousden, *Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(3): p. 332-7.
191. Said, J.W., et al., *Herpesvirus 8 inclusions in primary effusion lymphoma: report of a unique case with T-cell phenotype*. Arch Pathol Lab Med, 1999. **123**(3): p. 257-60.
192. Sakaguchi, K., et al., *DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade*. Genes Dev, 1998. **12**(18): p. 2831-41.
193. Sakaguchi, K., et al., *Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53*. Biochemistry, 1997. **36**(33): p. 10117-24.
194. Salcedo, M., et al., *Changes in retinoblastoma gene expression during cervical cancer progression*. Int J Exp Pathol, 2002. **83**(6): p. 275-86.
195. Salvioli, S., et al., *JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis*. FEBS Lett, 1997. **411**(1): p. 77-82.
196. Sandberg, M., W. Hammerschmidt, and B. Sugden, *Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4649-56.
197. Sarnow, P., et al., *Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells*. Cell, 1982. **28**(2): p. 387-94.
198. Sattler, M., et al., *The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway*. Oncogene, 1996. **12**(4): p. 839-46.
199. Savill, J. and V. Fadok, *Corpse clearance defines the meaning of cell death*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 784-8.
200. Scheffner, M., et al., *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1129-36.
201. Schuler, M., et al., *p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 7337-42.
202. Schuler, M. and D.R. Green, *Mechanisms of p53-dependent apoptosis*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 6): p. 684-8.
203. Schulz, T.F., *KSHV/HHV8-associated lymphoproliferations in the AIDS setting*. Eur J Cancer, 2001. **37**(10): p. 1217-26.
204. Schwerk, C. and K. Schulze-Osthoff, *Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(8): p. 1453-8.
205. Scinicariello, F., et al., *Occurrence of human papillomavirus and p53 gene mutations in Kaposi's sarcoma*. Virology, 1994. **203**(1): p. 153-7.
206. Searles, R.P., et al., *Sequence and genomic analysis of a Rhesus macaque rhadinovirus with similarity to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3040-53.
207. Seedorf, K., et al., *Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells*. Embo J, 1987. **6**(1): p. 139-44.
208. Sheaffer, A.K., et al., *Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 687-98.
209. Shieh, S.Y., et al., *DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2*. Cell, 1997. **91**(3): p. 325-34.

210. Silverman, N. and T. Maniatis, *NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity*. Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2321-42.
211. Soulier, J., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemans disease*. Blood, 1995. **86**(4): p. 1276-80.
212. Souverijn, J.H., et al., *The adenine nucleotide translocator and the nucleotide specificity of oxidative phosphorylation*. Biochim Biophys Acta, 1970. **223**(1): p. 31-5.
213. Staskus, K.A., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 715-9.
214. Stenger, J.E., et al., *Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers*. Mol Carcinog, 1992. **5**(2): p. 102-6.
215. Stochaj, U. and P. Silver, *Nucleocytoplasmic traffic of proteins*. Eur J Cell Biol, 1992. **59**(1): p. 1-11.
216. Sun, Q., S. Zachariah, and P.M. Chaudhary, *The human herpes virus 8-encoded viral FLICE-inhibitory protein induces cellular transformation via NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52437-45.
217. Sun, R., et al., *A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10866-71.
218. Sylla, B.S., et al., *Epstein-Barr virus-transforming protein latent infection membrane protein 1 activates transcription factor NF-kappaB through a pathway that includes the NF-kappaB-inducing kinase and the IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 10106-11.
219. Tan, S., M. Wood, and P. Maher, *Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells*. J Neurochem, 1998. **71**(1): p. 95-105.
220. Tappero, J.W., et al., *Kaposi's sarcoma. Epidemiology, pathogenesis, histology, clinical spectrum, staging criteria and therapy*. J Am Acad Dermatol, 1993. **28**(3): p. 371-95.
221. Taylor, P.R., et al., *A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo*. J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 359-66.
222. Thome, M., et al., *Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 517-21.
223. Tinari, A., et al., *Lytic growth of human herpesvirus 8: morphological aspects*. Ultrastruct Pathol, 2000. **24**(5): p. 301-10.
224. Tung, P.P. and W.C. Summers, *Substrate specificity of Epstein-Barr virus thymidine kinase*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(9): p. 2175-9.
225. Ueda, K., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) replication and transcription factor activates the K9 (vIRF) gene through two distinct cis elements by a non-DNA-binding mechanism*. J Virol, 2002. **76**(23): p. 12044-54.
226. Urban, M.B., R. Schreck, and P.A. Baeuerle, *NF-kappa B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit*. Embo J, 1991. **10**(7): p. 1817-25.
227. Utz, P.J. and P. Anderson, *Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules*. Cell Death Differ, 2000. **7**(7): p. 589-602.
228. von Arnim, A.G., X.W. Deng, and M.G. Stacey, *Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants*. Gene, 1998. **221**(1): p. 35-43.
229. Wagner, E.F., *AP-1--Introductory remarks*. Oncogene, 2001. **20**(19): p. 2334-5.
230. Wang, C.Y. and B. Sugden, *New viruses shake old paradigms*. J Clin Invest, 2004.

- 113**(1): p. 21-3.
231. Wang, H.W., et al., *Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin*. *Embo J*, 2002. **21**(11): p. 2602-15.
  232. Wang, J.Y., *Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation*. *Curr Opin Genet Dev*, 1993. **3**(1): p. 35-43.
  233. Wang, S., et al., *Identification of a cellular protein that interacts and synergizes with the RTA (ORF50) protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in transcriptional activation*. *J Virol*, 2001. **75**(24): p. 11961-73.
  234. Watanabe, Y. and T. Akaike, *Possible involvement of caspase-like family in maintenance of cytoskeleton integrity*. *J Cell Physiol*, 1999. **179**(1): p. 45-51.
  235. Waterman, M.J., et al., *ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins*. *Nat Genet*, 1998. **19**(2): p. 175-8.
  236. Werness, B.A., A.J. Levine, and P.M. Howley, *Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53*. *Science*, 1990. **248**(4951): p. 76-9.
  237. Wisdom, R., *AP-1: one switch for many signals*. *Exp Cell Res*, 1999. **253**(1): p. 180-5.
  238. Woodring, P.J., T. Hunter, and J.Y. Wang, *Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 13): p. 2613-26.
  239. Woodring, P.J., et al., *Modulation of the F-actin cytoskeleton by c-Abl tyrosine kinase in cell spreading and neurite extension*. *J Cell Biol*, 2002. **156**(5): p. 879-92.
  240. Wu, F.Y., et al., *Origin-independent assembly of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA replication compartments in transient cotransfection assays and association with the ORF-K8 protein and cellular PML*. *J Virol*, 2001. **75**(3): p. 1487-506.
  241. Wu, X., et al., *The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop*. *Genes Dev*, 1993. **7**(7A): p. 1126-32.
  242. Yan, Y., et al., *Inhibition of protein phosphatase activity induces p53-dependent apoptosis in the absence of p53 transactivation*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(24): p. 15220-6.
  243. Yang, T.Y., et al., *Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma*. *J Exp Med*, 2000. **191**(3): p. 445-54.
  244. Yaron, A., et al., *Identification of the receptor component of the I $\kappa$ B $\alpha$ -ubiquitin ligase*. *Nature*, 1998. **396**(6711): p. 590-4.
  245. Yew, P.R. and A.J. Berk, *Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein*. *Nature*, 1992. **357**(6373): p. 82-5.
  246. Yew, P.R., X. Liu, and A.J. Berk, *Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53*. *Genes Dev*, 1994. **8**(2): p. 190-202.
  247. Yu, J., et al., *PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(4): p. 1931-6.
  248. Yu, J., et al., *Identification and classification of p53-regulated genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(25): p. 14517-22.
  249. Yu, Y., et al., *Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells*. *J Gen Virol*, 1999. **80** ( Pt 1): p. 83-90.
  250. Zhang, J., et al., *FADD-deficient T cells exhibit a disaccord in regulation of the cell cycle machinery*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(32): p. 29815-8.
  251. Zhang, L., J. Chiu, and J.C. Lin, *Activation of human herpesvirus 8 (HHV-8) thymidine*

- kinase (TK) TATAA-less promoter by HHV-8 ORF50 gene product is SP1 dependent.* DNA Cell Biol, 1998. **17**(9): p. 735-42.
252. Zhong, W., et al., *Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6641-6.
253. Zhu, F.X., et al., *Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.* J Virol, 2005. **79**(2): p. 800-11.
254. Zhu, F.X., T. Cusano, and Y. Yuan, *Identification of the immediate-early transcripts of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.* J Virol, 1999. **73**(7): p. 5556-67.
255. Zhu, J. and J.Y. Wang, *Death by Abl: a matter of location.* Curr Top Dev Biol, 2004. **59**: p. 165-92.
256. Zhu, W., et al., *Potent antiviral activity of north-methanocarbothymidine against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.* Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(12): p. 4965-73.
257. Ziauddin, J. and D.M. Sabatini, *Microarrays of cells expressing defined cDNAs.* Nature, 2001. **411**(6833): p. 107-10.
258. Zietz, C., et al., *MDM-2 oncoprotein overexpression, p53 gene mutation, and VEGF up-regulation in angiosarcomas.* Am J Pathol, 1998. **153**(5): p. 1425-33.
259. Zoratti, M. and I. Szabo, *The mitochondrial permeability transition.* Biochim Biophys Acta, 1995. **1241**(2): p. 139-76.

## 6.1 Bücher

1. Frizzera, G. 1992. Atypical lymphoproliferative disorders, p. 459–496. *In* D. M. Knowles (ed.), Neoplastic hematopathology. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.)
2. Roizman B, Furlong D. The replication of herpesviruses. *In*: Fraenkel-Conrat H, Wagner RR, eds. *Comprehensive Virology*, vol 3. New York: Plenum Press, 1974:229–403
3. Kaposi M, 1872, Idiopathic, multiple, pigmented sarcoma of the skin
4. Freshney, R. (1987) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, p. 117, Alan R. Liss, Inc., New York.)

## 7. Lebenslauf

René Leubert, geboren am 21. März 1975 in Dresden

### Schulbildung

---

1992 Realschulabschluss  
Realschule Tett nang

1992 - 1995 Abitur  
Droste-Hülshoff-Schule in Friedrichshafen

### Zivildienst

---

1995 - 1996 Zivildienst bei der Arbeiterwohlfahrt Kreisverband Bodensee-Oberschwaben e.V. in Friedrichshafen

### Hochschulausbildung

---

1996 - 2002 **Studium:** Biologie an der Technischen Universität München

Hauptfach: Technische Biologie  
geprüfte Nebenfächer: Genetik und Immunologie  
bescheinigte Nebenfächer: Virologie, Mikrobiologie, Biophysik,  
Bioreaktionstechnik

**Abschluss:** Diplom (sehr gut)  
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie des Institutes für Organische Chemie und Biochemie der TUM

Thema: *Rekombinante Expression, Reinigung und Charakterisierung des Chaperons GRP94*

2002 - 2006 **Promotion** zum Dr. rer. nat am GSF-Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Neuherberg, Institute für Molekulare Virologie

Thema: *Modulation von p53 durch die N-terminale Domäne der Thymidinkinase des Humanen-Herpesvirus-8*

## Publikationen:

1. Naschberger E, Werner T, Vicente AB, Guenzi E, Topolt K, **Leubert R**, Lubeseder-Martellato C, Nelson PJ, Sturzl M. , ***Nuclear factor-kappaB motif and interferon-alpha-stimulated response element co-operate in the activation of guanylate-binding protein-1 expression by inflammatory cytokines in endothelial cells.*** **Biochem J, 2004. 379(Pt 2): p. 409-20.**

## Posterpräsentationen:

- 2003 4th Symposium on the Biology of Endothelial Cells  
Molecular Cell Biology of the Endothelium in Development and Diseases  
July, 18 – 20, 2003, Munich, Germany
- 2004 IZKF Workshop on Functional Genomics, March, 2 – 4, 2004, Banz, Germany
- 2005 The XXII Symposium of the International Association for Comparative Research  
on Leukemia and Related Diseases IACRLRD July, 2 – 5, 2005, Heidelberg,  
Germany

## 8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Stürzl für die interessante Themenstellung, die Betreuung und seinen unermütlchen Einsatz die Forschung voranzutreiben, sowie für das in mich gesetzte Vertrauen diese Arbeit selbstständig zu bewältigen.

Herrn Prof. Dr. V. Erfle möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit am Institut für Virologie durchführen zu können. Besonders möchte ich mich bei PD Dr. R. Brack-Werner für die hilfreiche Betreuung und Ratschläge bedanken.

Herrn PD Dr. B. Salmons gilt mein besonderer Dank für die Betreuung meiner Arbeit an der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Dr. E. Guenzi möchte ich für die wegbereitende Hilfe und Aufmunterungen danken.

Vielen Dank Frank für Deine Teamarbeit und die zusammen verbrachten Jahre.

Herzlichen Dank den Mitgliedern des Institut für Virologie der GSF für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung, meinen Kollegen, Barbara, Glenda, Horst, Katrin, Kristin, Lisa, Manja, Nico, Thomas und Andrea; Florian, Horst und Manja fürs Korrekturlesen, Eure unendliche Geduld und Unterstützung.

Im besonderen gilt mein Dank meiner Schwester und meinem Bruder, die mich in jeder Phase der Promotion ermutigt haben und immer zur Seite standen.

Danke an meine Eltern, die mir im Sturm immer ein Leuchtturm waren und mir halfen nie aufzugeben.

## 9. Anhänge

HHV-8-Gen	Alias Name und Besonderheit	HHV-8-Gen	Alias Name und Besonderheit
ORF 2	DHFR	ORF 54	(#)
ORF 4	(#)	ORF 55	
ORF 6	(#)	ORF 56	
ORF 7	(#)	ORF 57r	MTA/(*)
ORF 9	(#)	ORF 57b	(*) (#)
ORF 10	(#)	ORF 58	
ORF 11	(#)	ORF 69	
ORF 17	(#)	ORF 70	TS (#)
ORF 18		ORF 72	FGARAT (#)
ORF 19	(#)	K1	(#)
ORF 20		K2	vIL6 (#)
ORF 21	TK (¥)	K3	MIR I
ORF 22	gH	K4	vMipII (¥)
ORF 23		K4.1	vMipIII (¥)
ORF 24	(¥)	K4.2	KIE-3 (¥)
ORF 26	TRI-2 (#)	K5	MIR II
ORF 27		K6	vMIP I
ORF 28		K7	PAN (¥)
ORF 29		K8	K-bZIP / RAP (¥)
ORF 30		K9	vIRF9 (#)
ORF 31	(¥)	K10	
ORF 32	(¥)	K10.7	(#)
ORF 33	(¥)	K11	(¥)
ORF 34	(¥)	K11.1	(#)
ORF 35	(¥)	K12-A	Kaposin-A (#)
ORF 36	(¥)	K13	vFLIP
ORF 37	(#)	K14	vOX2
ORF 40		K15	LAMP
ORF 42		K15s	LAMP, ohne Myc/HIS Tag
ORF 47	gL (#)		

Tabelle I, HHV-8 Expressionsplasmide mit Genen, die Homologien zu anderen Herpesviren aufweisen und HHV-8 einmaligen Gene.

Angegeben ist das korrespondierende HHV-8-Gen und der alternative Name. (\*) Orf57r wurde wie in (Russo *et al.* 1996) und Orf57b wie in (Bello *et al.* 1999) beschrieben amplifiziert. Alle Plasmide sind, wenn nicht anders aufgeführt, C-terminal Myc-His getagged. Expressionsplasmide die nicht sequenzidentisch zu KSU75698 oder U93872 waren (#) und Plasmide von Dr. M. Bauer und M. Manoharran (¥) sind markiert.

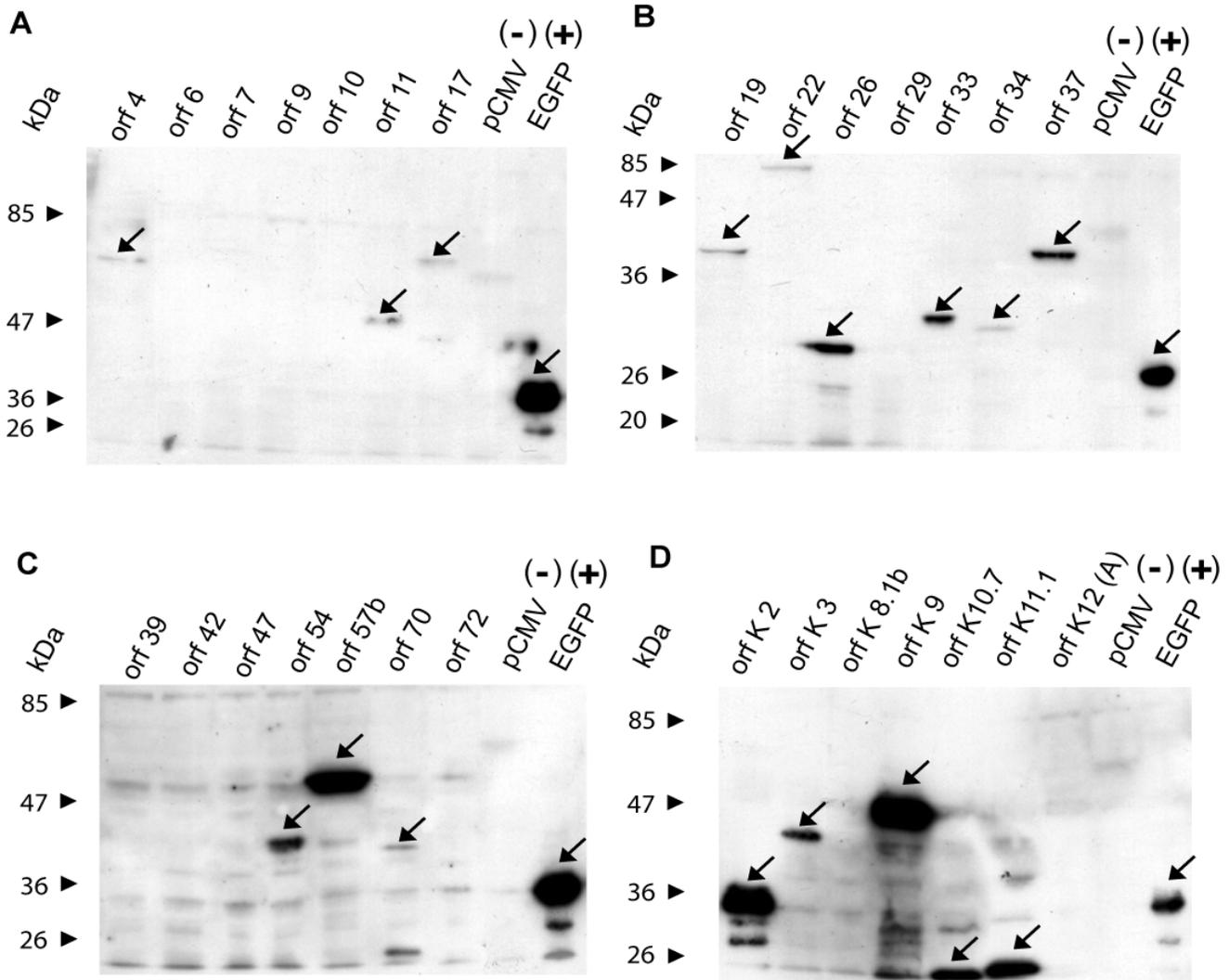


Abb. I, Westernblotanalyse zum Nachweis der Expression von (Panel A) ORF 4, 6, 7, 9, 10, 11, 17, (Panel B) 19, 22, 26, 29, 33, 34, 37, (Panel C) 39, 42, 47, 54, 57b, 70, 72, (Panel D) K2, K3, K8.1b, K9, K10.7, K11.1 und K12 (Kaposin-A). Die angegebenen Expressionsplasmide, der Leervektor pCMV als Negativkontrolle (-) und ein Myc/His-getaggetes GFP143 als Positivkontrolle (+) wurden jeweils in HEK293T transfiziert. Nach 48 h wurden Zellextrakte geerntet und lysiert, mittels PAGE die Proteine der Größe nach getrennt und damit ein Westernblot durchgeführt. Zur Detektion wurde als primär  $\alpha$ -Myc (Maus) 1:1000 (4°C über Nacht) und sekundär ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter  $\alpha$ -Maus (Hase) Antikörper 1:2000 (RT, 1 h) verwendet. Der Laufmarker ist schematisch in kDa angegeben (Pfeile bei 85, 47, 36, 26 kDa). Detektierbare Banden, die mit den errechneten Laufgrößen korrespondieren, sind durch Pfeile aufgezeigt.

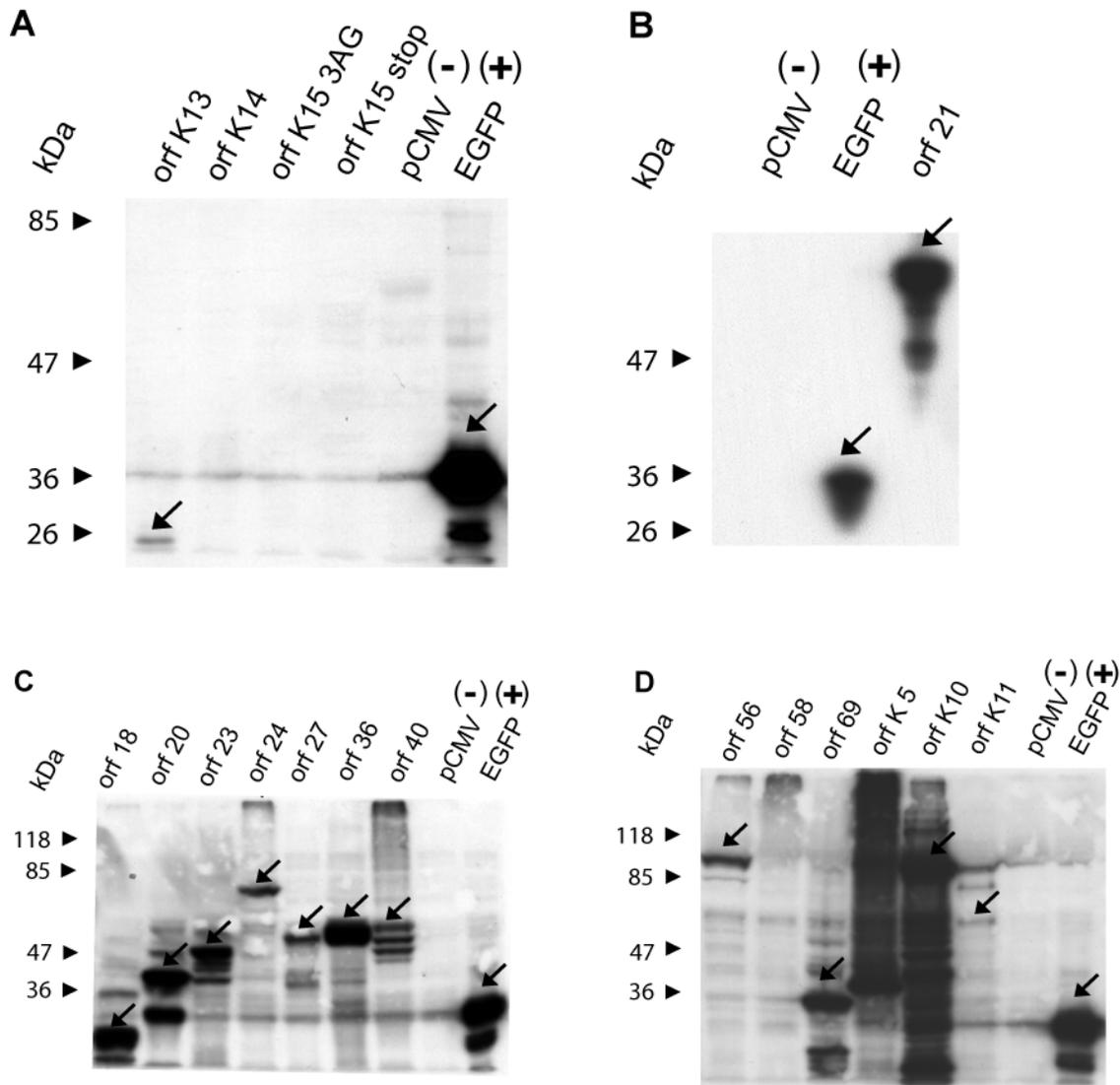


Abb. II, Westernblotanalyse zum Nachweis der Expression von (Panel A) K13, K14, K15, (Panel B) ORF 21, (Panel C) ORF 18, 20, 23, 24, 27, 36, 40, (Panel D) 56, 58, 69, K5, K10 und K11. Die angegebenen Expressionsplasmide, der Leervektor pCMV als Negativkontrolle (-) und ein Myc/His-getaggetes GFP143 als Positivkontrolle (+) wurden jeweils in HEK293T transfiziert. Nach 48 h wurden Zellextrakte geerntet und lysiert, mittels PAGE die Proteine der Größe nach getrennt und damit ein Westernblot durchgeführt. Zur Detektion wurde als primär  $\alpha$ -Myc (Maus) 1:1000 (4°C über Nacht) und sekundär ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter  $\alpha$ -Maus (Hase) Antikörper 1:2000 (RT, 1 h) verwendet. Der Laufmarker ist schematisch in kDa angegeben (Pfeile bei 85, 47, 36, 26 kDa). Detektierbare Banden, die mit den errechneten Laufgrößen korrespondieren, sind durch Pfeile aufgezeigt.

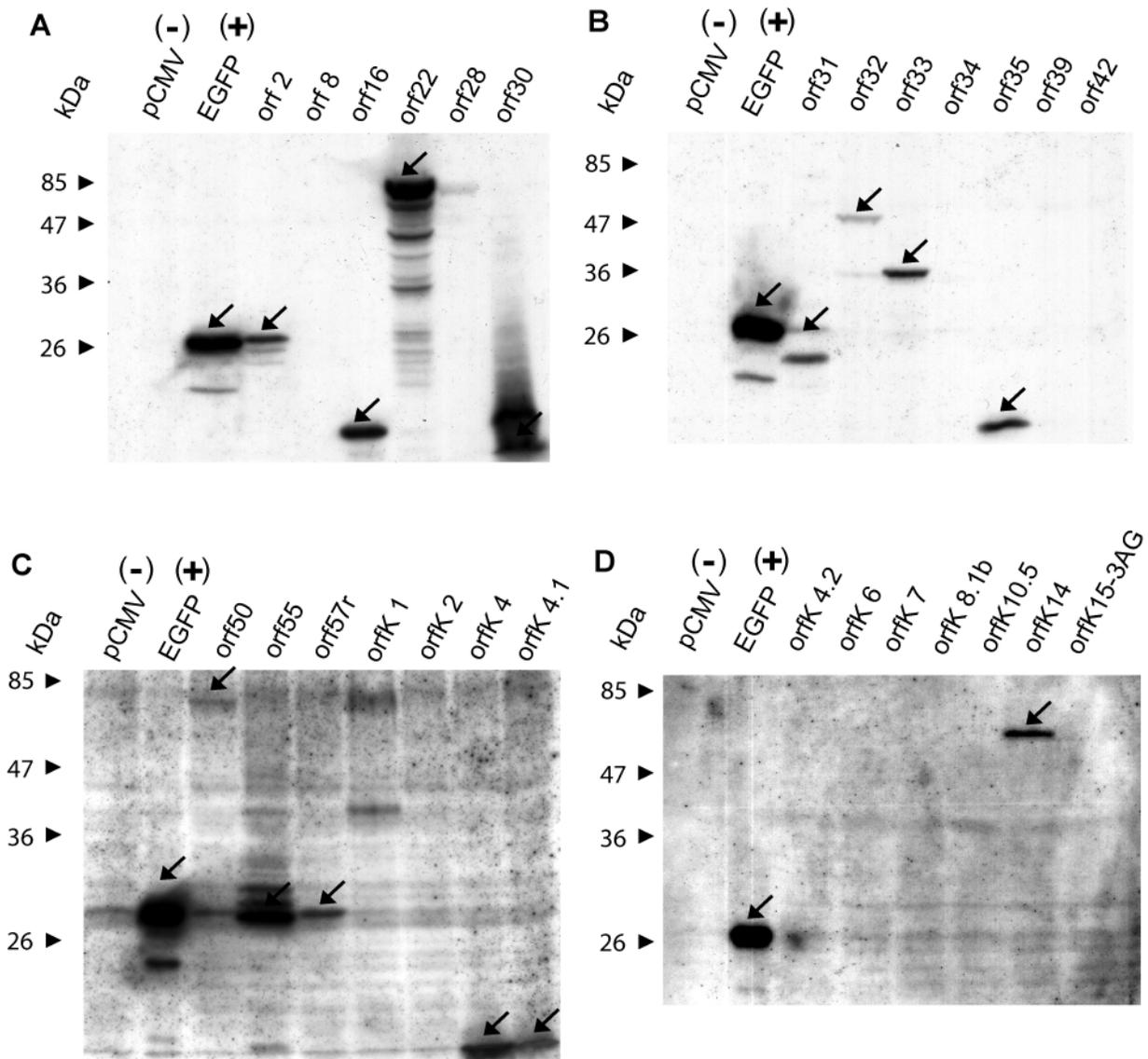


Abb. III, Westernblotanalyse zum Nachweis der Expression von (Panel A) ORF 2, 8, 16, 22, 28, 30, (Panel B), 31, 32, 33, 34, 35, 39, 42 (Panel C) 50, 55, 57r, K1, K2, K4, K4.1, (Panel D) K4.2, K6, K7, K8.1b, K10.5, K14 und K15. Die angegebenen Expressionsplasmide, der Leervektor pCMV als Negativkontrolle (-) und ein Myc/His-getaggtes GFP143 als Positivkontrolle (+) wurden jeweils in HEK293T transfiziert. Nach 48 h wurden Zellextrakte geerntet und lysiert, mittels PAGE die Proteine der Größe nach getrennt und damit ein Westernblot durchgeführt. Zur Detektion wurde als primär  $\alpha$ -Myc (Maus) 1:1000 (4°C über Nacht) und sekundär ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter  $\alpha$ -Maus (Hase) Antikörper 1:2000 (RT, 1 h) verwendet. Der Laufmarker ist schematisch in kDa angegeben (Pfeile bei 85, 47, 36, 26 kDa). Detektierbare Banden, die mit den errechneten Laufgrößen korrespondieren, sind durch Pfeile aufgezeigt.

Plasmidname	HHV-8-Gen	Errechnete Größe (inklusive Tag) in kDa	Durch Westernblot nachgewiesen
pcDNA4-orf002	ORF 2	28	ja
pcDNA4-orf004	ORF 4	64	nein
pcDNA4-orf006	ORF 6	130	nein
pcDNA4-orf007	ORF 7	80	nein
pcDNA4-orf009	ORF 9	117	nein
pcDNA4-orf010	ORF 10	51	nein
pcDNA4-orf011	ORF 11	50	ja
pcDNA4-orf016	ORF 16	22	ja
pcDNA4-orf017	ORF 17	64	ja
pcDNA4-orf018	ORF 18	31	ja
pcDNA4-orf019	ORF 19	64	ja
pcDNA4-orf020	ORF 20	38	ja
pcDNA4-orf021	ORF 21	67	ja
pcDNA4-orf022	ORF 22	84	ja
pcDNA4-orf023	ORF 23	48	ja
pcDNA4-orf024	ORF 24	86	ja
pcDNA4-orf026	ORF 26	37	ja
pcDNA4-orf027	ORF 27	43	ja
pcDNA4-orf028	ORF 28	14	nein
pcDNA4-orf029	ORF 29	42	nein
pcDNA4-orf030	ORF 30	11	ja
pcDNA4-orf031	ORF 31	28	ja
pcDNA4-orf032	ORF 32	53	ja
pcDNA4-orf033	ORF 33	42	ja
pcDNA4-orf034	ORF 34	39	ja
pcDNA4-orf035	ORF 35	19	ja
pcDNA4-orf036	ORF 36	54	ja
pcDNA4-orf037	ORF 37	58	ja
pcDNA4-orf039	ORF 39	47	nein
pcDNA4-orf040	ORF 40	55	ja
pcDNA4-orf042	ORF 42	34	nein
pcDNA4-orf047	ORF 47	21	nein
pcDNA4-orf054	ORF 54	40	ja
pcDNA4-orf055	ORF 55	28	ja
pcDNA4-orf056	ORF 56	98	ja
pcDNA4-orf057r	ORF 57r	33	ja

Plasmidname	HHV-8-Gen	Errechnete Größe (inklusive Tag) in kDa	Durch Westernblot nachgewiesen
pcDNA4-orf057b	ORF 57b	57	ja
pcDNA4-orf058	ORF 58	42	nein
pcDNA4-orf069	ORF 69	36	ja
pcDNA4-orf070	ORF 70	40	ja
pcDNA4-orf072	ORF 72	33	nein
pcDNA4-orfK01	K1	34	ja
pcDNA4-orfK02	K2	28	ja
pcDNA4-orfK03	K3	40	ja
pcDNA4-orfK04	K4	15	ja
pcDNA4-orfK04.1	K4.1	15	ja
pcDNA4-orfK04.2	K4.2	23	nein
pcDNA4-orfK05	K5	33	ja
pcDNA4-orfK06	K6	13	nein
pcDNA4-orfK07	K7	17	nein
pcDNA4-orfK08	K8	29	nein
pcDNA4-orfK09	K9	53	ja
pcDNA4-orfK10	K10	80	ja
pcDNA4-orfK10.5	K10.5	66	ja
pcDNA4-orfK10.7	K10.7	20	ja
pcDNA4-orfK11	K11	55	ja
pcDNA4-orfK11.1	K11.1	21	ja
pcDNA4-orfK12	K12-A	9	nein
pcDNA4-orfK13	K13	24	ja
pcDNA4-orfK14	K14	33	nein
pcDNA4-orfK15-3AG	K15	59	nein
pcDNA4-orfK15-STOP	K15s	56	Kein Myc/His-Tag

Tabelle II, Übersicht über die mit Hilfe des Westernblot auf Expression überprüften Plasmide. Angegeben ist der Plasmidname, der korrespondierende ORF, die errechnete Größe in kDa und die Nachweisbarkeit.

		1		50
AP-1-LUC	(1)	--GCGG	AGACTCTAGAGGGTATATAATGGAAGCT	CGAATTCCAGCTTGGC
NFKB-LUC	(1)	--GCGGT	GACTCTAGAGGGTATATAATGGAAGCT	CGAATTCCAGCTTGGC
Myc-TA-LUC	(1)	-----	AGA-TCT---GGGTATATAATGGAAGCT	-----TGGC
pNFAT-TA-Luc	(1)	AGATCT	AGACTCTAGAGGGTATATAATGGAAGCT	CGAATTCCAGCTTGGC
pTRE-TA-SEAP	(1)	-----	AGA-TCT---GGGTATATAATGGAAGCT	TCCAATC-----GCGA
Konsensusseq.	(1)		AGACTCTAGAGGGTATATAATGGAAGCT	CGAATTCCAGCTTGGC
		51		98
AP-1-LUC	(49)		ATTCCGGTACTGTTGGTAAA	-----
NFKB-LUC	(49)		ATTCCGGTACTGTTGGTAAA	-----
Myc-TA-LUC	(29)		ATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACC	-----
pNFAT-TA-Luc	(51)		ATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAA	
pTRE-TA-SEAP	(36)		ATTCCGCCACCATG	-----
Konsensusseq.	(51)		ATTCCGGTACTGTTGGTAAA	

Abb. IV, Vergleichende Sequenzanalyse verschiedener TATA-Minimalpromotoren

Alignment der TATA-Minimalpromotorsequenzen von AP-1-LUC (Clontech), NFκB-LUC (Clontech), Myc-TA-LUC (Clontech), pNFAT-TA-LUC (Stratagene), pTRE-TA-SEAP (Stratagene),

Die ermittelte Konsensussequenz (Konsensusseq.) ergab den verwendeten TATA-Minimalpromotor.

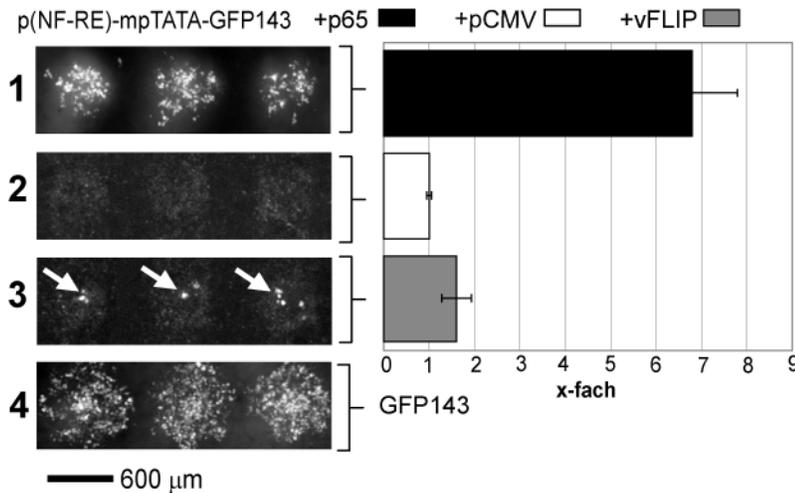


Abb. V, Mit dem NFκB-Reporterplasmid und mit Hilfe der Arraytransfektion mit dem 600 μm Glaspin lässt sich die Induktion der NFκB-Transkriptionsaktivierung durch p65 (1) und vFLIP (3) nachweisen.

(1-3) p(NF-RE)-mpTATA-GFP143 wurde mit p65 (1), pCMV (2) oder vFLIP (3), sowie GFP143 als Transfektionskontrolle (Spur 4), mit Hilfe des Arraytransfektionsverfahrens gedruckt, Zellen ausgesät und nach 44 h die Fluoreszenz mit Hilfe eines Objektträgerlesegerätes (Fujitsu, FLA-8000) ermittelt und als Diagramm dargestellt. p65 induzierte die NFκB-Transkriptionsaktivierung am stärksten (Spur 1, schwarzer Balken,) im Gegensatz zur Negativkontrolle (Spur 2, weißer Balken). Die Induktion durch vFLIP ließ sich verfolgen (Spur 3 mit weißen Pfeilen, grauer Balken).

## AP-1

Array 1	
Gen	RLE
ORF 31	25502
K4.2	23419
K15s	14832
LMP1	12740
ORF 21	12647
ORF 34	12392
ORF 2	9632
K14	9114
ORF 35	8695
ORF 73	7484
K2	7080
K8.1b	6826
ORF 30	6332
ORF 32	6038
ORF 42	5989
ORF 16	5981
ORF 22	5832
K4	5748
ORF 8	5523
ORF 39	5231
ORF 33	5036
ORF 55	4027
K7	3851
ORF 28	3615
K13	2939
K6	2775
ORF 50	2338
pCMV	1645
K4.1	1308
K10.1	930
K1	182
ORF 57r	-1940
K15	-14881

Array 2	
Gen	RLE
LMP1	27926
ORF 55	20458
K4	16556
K4.2	15704
ORF 21	14104
ORF 31	14100
ORF 57r	12198
ORF 42	11071
ORF 34	10626
ORF 50	10481
K15s	10353
K8.1b	10155
K14	9882
ORF 28	9739
ORF 16	9411
pCMV	7549
K15	4419
K4.1	4207
ORF 30	4168
K7	3912
ORF 8	3838
ORF 35	3118
ORF 39	2739
ORF 32	2663
ORF 73	2524
K13	1796
K1	1709
K10.1	731
K6	-249
ORF 33	-1063
ORF 2	-2493
K2	-9206
ORF 22	-12533

Array 3	
Gen	RLE
ORF 57r	464559
ORF 55	191252
K1	116595
K4.1	21685
ORF 33	14037
ORF 42	11463
ORF 50	6605
ORF 28	5511
ORF 21	4886
K15	4793
K15s	3637
ORF 22	2833
K4.2	2475
K7	2419
K2	2334
ORF 31	2236
ORF 30	1958
ORF 32	1230
LMP1	679
ORF 35	216
K8.1b	112
K14	-47
ORF 16	-63
K6	-84
K10.1	-85
ORF 39	-95
pCMV	-97
K4	-125
ORF 2	-471
ORF 34	-1792
K13	-2694
ORF 73	-3238
ORF 8	-10813

Tabelle III, Übersicht der Induktionsauswertung zu AP-1 verschiedenen Arrayansätzen (1-3)

Pro Array wurden die Signalweg zugehörigen Induktionen erfasst, um den Hintergrund korrigiert und mit dem höchsten Wert der RLE nach aufsteigen dargestellt.

Die drei Kandidaten mit der höchsten Induktion (hell grün hinterlegt) wurden markiert und bei Wiederfindung in anderen Arrayauswertungen als Treffer gewertet (dunkelgrün hinterlegt). Die Positivkontrollen (rot hinterlegt) und Negativkontrolle (blau hinterlegt) sind dargestellt.

**N**  
**kB**

K4.2 wurde, neben ORF 55, in Wiederholung als AP-1 induzierend in der Arraytransfektion detektiert.

Gen	RLE
LMP1	85455
K13	18043
ORF 39	8221
K2	5422
ORF 31	4601
ORF 35	4090
ORF 55	3535
K10.1	2756
ORF 30	2450
ORF 57r	2314
ORF 42	2299
ORF 32	2287
ORF 33	2020
K4.1	1750
K6	1396
K15s	1383
ORF 2	1148
ORF 22	1006
K4.2	860
ORF 34	801
K8.1b	695
ORF 16	573
K15	453
K4	397
ORF 21	309
ORF 28	304
K7	288
pCMV	134
ORF 50	26
ORF 32	-15
K14	-27
K1	-87
ORF 8	-163

Gen	RLE
LMP1	83157
K1	32217
ORF 22	17994
K13	17309
ORF 16	4221
K2	4140
K15s	3170
K10.1	2750
K7	2012
ORF 42	1693
K4.1	1668
ORF 55	1064
K4.2	1018
ORF 32	757
ORF 50	744
K4	736
ORF 21	728
ORF 34	715
ORF 35	632
ORF 30	573
ORF 32	527
K8.1b	514
ORF 28	490
K15	298
K14	174
ORF 39	122
pCMV	58
ORF 8	-135
ORF 31	-143
ORF 2	-169
ORF 57r	-418
K6	-767
ORF 33	-900

Gen	RLE
ORF 8	359379
K7	37055
LMP1	29737
ORF 22	14457
K13	10720
ORF 39	9040
ORF 30	8948
K4	8268
K1	7562
ORF 28	7363
ORF 42	6702
K15s	5040
K4.1	4731
K14	4585
K15	3699
ORF 34	3131
ORF 35	2892
K10.1	1552
K6	1420
ORF 32	1016
ORF 55	135
K8.1b	89
pCMV	37
ORF 31	36
K4.2	-31
ORF 21	-43
ORF 33	-79
K2	-97
ORF 50	-222
ORF 16	-646
ORF 57r	-1184
ORF 2	-1625
ORF 32	-4006

Tabelle IV, Übersicht der Induktionsauswertung zu NF $\kappa$ B mit verschiedenen Arrayansätzen (1-3)

Pro Array wurden die Signalweg zugehörigen Induktionen erfasst, um den Hintergrund korrigiert und mit dem höchsten Wert der RLE nach aufsteigen dargestellt.

Die drei Kandidaten mit der höchsten Induktion (hell grün hinterlegt) wurden markiert und bei Wiederfindung in anderen Arrayauswertungen als Treffer gewertet (dunkelgrün hinterlegt). Die Positivkontrollen (rot hinterlegt) und Negativkontrolle (blau hinterlegt) sind dargestellt.

ORF 22 wurde in Wiederholung als NF $\kappa$ B induzierend in der Arraytransfektion identifiziert.

Array 1	
Gen	RLE
ORF 21	51752
ORF 16	34287
ORF 73	33239
ORF 8	31657
K14	30756
K2	29973
ORF 30	24530
K4.2	22664
p53	21656
ORF 33	21594
K4.1	21404
ORF 35	19394
K10.1	19249
K4	17409
ORF 73	14990
K7	13731
ORF 2	13418
ORF 39	12172
ORF 50	11771
ORF 31	9765
ORF 42	9589
ORF 22	8836
ORF 28	8420
K6	8341
K15	6826
ORF 57r	5500
K1	5068
K8.1b	3528
ORF 55	2541
pCMV	138
ORF 34	-497
K13	-4001
K15s	-5177

Array 2	
Gen	RLE
ORF 21	44142
K14	26942
K4.1	26428
ORF 34	26244
ORF 22	22454
ORF 16	15741
ORF 2	15094
p53	13434
K10.1	13237
ORF 28	11832
ORF 39	11566
ORF 57r	11003
ORF 73	10960
K7	10417
K4	9504
ORF 50	9387
ORF 31	8430
K15	8187
K15s	8098
ORF 8	7675
ORF 30	6925
ORF 73	5175
ORF 33	3809
K13	3583
K8.1b	3313
K2	3288
K1	2764
ORF 55	1985
ORF 42	1950
K4.2	840
ORF 35	530
K6	-987
pCMV	-22861

Array 3	
Gen	RLE
ORF 55	385696
K2	89281
K13	34671
K1	20422
K8.1b	13101
ORF 22	11271
K4	11237
ORF 21	10026
K6	8461
ORF 34	4837
ORF 30	3376
ORF 35	2434
p53	856
K14	571
ORF 50	461
ORF 39	255
K7	119
ORF 8	101
K15s	95
ORF 16	93
ORF 31	54
ORF 28	3
K15	-14
ORF 73	-46
K4.1	-63
K10.1	-97
ORF 33	-215
ORF 42	-291
K4.2	-789
ORF 57r	-793
pCMV	-848
ORF 2	-1046
ORF 73	-4241

Tabelle V, Übersicht der Induktionsauswertung zu p53 mit verschiedenen Arrayansätzen (1-3)

Pro Array wurden die Signalweg zugehörigen Induktionen erfasst, um den Hintergrund korrigiert und mit dem höchsten Wert der RLE nach aufsteigen dargestellt.

Die drei Kandidaten mit der höchsten Induktion (hell grün hinterlegt) wurden markiert und bei Wiederfindung in anderen Arrayauswertungen als Treffer gewertet (dunkelgrün hinterlegt). Die Positivkontrollen (rot hinterlegt) und Negativkontrolle (blau hinterlegt) sind dargestellt.

ORF 21 wurde in Wiederholung als p53 induzierend in der Arraytransfektion beobachtet.

<pre> [Parameters] RunType=MicroArray BarcodesEnabled=0 HaltBarcodes=1 CacheBarcodes=0 ClearBarcodes=0 WhereBarcodes=1 ExpectedBarcode1=[Unknown] ReloadPins=0 NumSourcePlates=1 WashAfterEveryVisit=1 WashAfterEverySample=0 RequestLogInfo=0 SourcePlate=384standardb.microplate ToolType=4x4 384 split.tool PromptPlates=0 PromptPlatesInterval=1 SourceWiggle=0 SourceDibble=0 RemoveOneLid=1 TargetDip=0 TargetWiggle=0 SoftTouchDistance=3 SoftTouchSpeed=3 DelayBefore=0 TargetDwell=1 DelayAfterSpotting=0.10000000149011 6 MultiStrikes=0 SoftTouch=1 TargetDepth=1 ILayout=0 PrespotRecycle=0 UseCamera=0 Microplates=1 PreSpot=0 SlideSize=25 NumSamples=1 LastPlateVisits=1 SpotsPerSource=1 AdapterPlate=slidesvertical extra.adapter AdapterPlate2=slidesvertical extra.adapter </pre>	<pre> [PinGrid] XSpots=5 YSpots=5 Line0=1, 1, 1, 1, 1, Line1=1, 1, 1, 1, 1, Line2=1, 1, 1, 1, 1, Line3=1, 1, 1, 1, 1, Line4=1, 1, 1, 1, 1, NthOrder=2 PatternFormat=2 ToolGridIndex=1, Splice=0 Pitch=0.899999976158142 NumCopies=1 [SlideLayout] BottomMargin=34.7099990844727 CentreHoriz=0 CentreVert=0 TopMargin=21.2800006866455 LeftMargin=1.57000005245209 RightMargin=4.59000015258789 XSpacing=0 Yspacing=0  [Wash] InterCycleDelay=1 LeftSeconds=5 RightSeconds=5 DrySeconds=2 VacuumEnabled=1 Cycles=4 MWSCycles=4 </pre>	<pre> [RunPrefs] PrintReplicatesFirst=1 SourceDipTop=0 SourceDipBottom=0 TargetDipTop=0 TargetDipBottom=0 VisionID= BioBankID=DEFAULT IOControl=0 Bath12ZOffset=2 Bath3ZOffset=-1 FeatureOffsetX=0 FeatureOffsetY=0 HumidStartRate=80 HumidRunRate=80 TargetHumidity=80 MinHumidity=80 UseHumidityControl=0 UseHumidityHEPA=0 PauseHumidity=0 EndHumidityOn=0 PrimeBath=1 AskLoadTool=0 WashAtStart=1 WashAtEnd=1 AskBioBank=0 AskTrays=0 SourceDwellTime=3 TargetDwellTime=1 SourceWiggles=0 SourceWiggleSize=0.25 SourceDips=1 SourceDipSize=2 TargetWiggles=0 TargetWiggleSize=0.25 TargetDips=0 TargetDipSize=2 SourceDepth=4 TargetDepth=0 BathFillTime=0.75 BathDrainTime=5 RecirculateAction=2 RecirculateStatic=1 RecirculateWiggleSize=5 RecirculateDipSize=10 </pre>
--	--	--

Tabelle VI a, Auflistung der Programmparametern für das Druckprogramm des Roboters

[RunPrefs](continuing)  
RecirculateWiggleSize=5  
RecirculateDipSize=10  
BlotFirstTimes=1  
BlotFirstSlides=20  
CacheBarcodes=1  
HaltNoWater=1  
BathWiggles=4  
BathWiggleSize=0  
HeaterOnTime=0  
HeaterOffTime=0  
HeaterCoolTime=0  
SourceSoftTouchSpeed=2  
TargetSoftTouchSpeed=4  
SourceSoftTouchEnabled=1  
TargetSoftTouchEnabled=0  
SourceSoftTouchDistance=5  
TargetSoftTouchDistance=1

[PreSpotLayout]  
BottomMargin=1.3999997615814  
CentreHoriz=1  
CentreVert=1  
TopMargin=1.3999997615814  
LeftMargin=3.40000009536743  
RightMargin=3.40000009536743  
XSpacing=0.20000002980232  
YSpacing=0  
ToolGridIndex=1, 2, 3, 4,  
Splice=0

[PreSpotting]  
Pitch=0.400000005960464  
SoftTouchDistance=1  
SoftTouchSpeed=4  
DelayBefore=0  
TargetDwell=1  
DelayAfterSpotting=0.10000000149011  
6  
MultiStrikes=1  
SoftTouch=1  
TargetDepth=1  
ISoftTouchDistance=0  
ISoftTouchSpeed=0  
IPitch=0  
IDelayBefore=1  
ITargetDwell=1  
IDelayAfterSpotting=1  
IMultiStrikes=1  
ISoftTouch=0  
ITargetDepth=1  
[LogFile]  
Operator\_name\*=\_  
Library=\_  
Gridding\_Number=\_  
Set\_Number=\_  
Replica\_Number=\_  
Date=\_  
Time=\_

Tabelle VI b, Auflistung der Programmparametern für das Druckprogramm des Roboters