

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

CHARAKTERISIERUNG DER ROLLE DES ZELLULÄREN
TRANSKRIPTIONSFAKTORS CSL/CBF1 IM LYTISCHEN
ZYKLUS KSHV-INFIZIERTER B-ZELLEN



Barbara A. Scholz

München, Juni 2011

Dissertation eingereicht am 27. Juni 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Bettina Kempkes

2. Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 2011

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung..... | 1 |
| 1 Einleitung | 2 |
| 1.1 Das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV)..... | 2 |
| 1.1.1 Geschichte, Evolution und Epidemiologie von KSHV | 2 |
| 1.1.2 KSHV-assoziierte Erkrankungen | 3 |
| 1.1.3 Das KSHV-Genom..... | 5 |
| 1.1.4 Die Phasen der KSHV-Infektion..... | 7 |
| 1.1.5 Der Lebenszyklus von KSHV | 8 |
| 1.1.5.1 Die latente Phase von KSHV | 8 |
| 1.1.5.2 Der lytische Zyklus von KSHV | 9 |
| 1.1.6 KSHV-Wirtszellen | 10 |
| 1.2 Regulationsmechanismen des lytischen Zyklus von KSHV..... | 12 |
| 1.2.1 Die Rolle des lytischen Zyklus in KSHV-assoziiierter Pathogenese | 12 |
| 1.2.2 Die direkte und indirekte Aktivierung lytischer KSHV-Gene | 13 |
| 1.3 Die Rolle von CBF1 während des Lebenszyklus von KSHV | 15 |
| 1.3.1 CBF1, ein wichtiges Effektormolekül des Notch-Signalweges | 15 |
| 1.3.2 Die Rolle von CBF1 bei der Aktivierung von KSHV-Genen | 17 |
| 1.3.3 Der Einfluss von CBF1 und Notch-IC auf den Lebenszyklus von KSHV..... | 19 |
| 1.4 Das rekombinante KSHV rKSHV.219-System..... | 23 |
| 1.5 Zielsetzung..... | 24 |
| 2 Material | 26 |
| 2.1 Bakterienstämme | 26 |
| 2.2 Zelllinien | 26 |
| 2.3 Oligonukleotide/ Primer..... | 27 |
| 2.4 Plasmide..... | 30 |
| 2.5 Antikörper | 31 |
| 2.6 Material für Bakterienstämme..... | 31 |
| 2.7 Material für Zellkultur | 31 |
| 2.8 DNA- und Protein-Standards | 32 |
| 2.9 Enzyme und Reagenziensysteme | 32 |
| 2.10 Chemikalien und Reagenzien | 32 |
| 2.11 Verbrauchsmaterial..... | 33 |
| 2.12 Laborausstattung..... | 34 |
| 2.13 Datenbanken, Internet-Programme und Computer-Software..... | 34 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3 | Methoden..... | 36 |
| 3.1 | Arbeiten mit Bakterienkulturen..... | 36 |
| 3.1.1 | Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien..... | 36 |
| 3.1.2 | Herstellung CaCl ₂ - kompetenter Bakterien..... | 36 |
| 3.1.3 | Bestimmung der Transformationseffizienz chemisch kompetenter Bakterien..... | 36 |
| 3.1.4 | Transformation chemisch kompetenter Bakterien..... | 37 |
| 3.2 | Arbeiten mit eukaryotischen Zellen..... | 37 |
| 3.2.1 | Kultivierung und Aufbewahrung von Suspensionszellen und adhärenen Zelllinien..... | 37 |
| 3.2.2 | Bestimmung der Zellzahl..... | 38 |
| 3.2.3 | Induktion des lytischen Zyklus KSHV-positiver Zellen..... | 38 |
| 3.2.4 | Präparation von VK219-Virusüberständen und Bestimmung der infektiösen Einheiten pro ml Virusüberstand..... | 39 |
| 3.2.5 | Infektion der wt- und CBF1-ko-DG75-Zelllinien mit VK219-Virusüberstand..... | 39 |
| 3.2.6 | Transiente Transfektion von adhärenen Zellen mit Polyethylenimin (PEI)..... | 40 |
| 3.2.7 | Transiente Transfektion von Suspensionszelllinien durch Elektroporation..... | 40 |
| 3.2.8 | Promotor-Reportergenstudie..... | 40 |
| 3.2.9 | "Fluorescence activated cell sorting" (FACS)..... | 41 |
| 3.2.9.1 | Nachweis der GFP-Expression..... | 41 |
| 3.2.9.2 | Quantifizierung und Sortierung GFP-RFP-doppelt-positiver Zellen im Durchfluss- zytometer..... | 42 |
| 3.3 | Molekularbiologische Methoden..... | 42 |
| 3.3.1 | Arbeiten mit DNA..... | 42 |
| 3.3.1.1 | Schnelle Plasmidisolierung..... | 42 |
| 3.3.1.2 | Präparative Plasmidisolierung..... | 43 |
| 3.3.1.3 | Isolierung genomischer DNA..... | 43 |
| 3.3.1.4 | Spektrometrische Konzentrationsbestimmung der DNA..... | 43 |
| 3.3.1.5 | Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 44 |
| 3.3.1.6 | Aufreinigung von DNA-Fragmenten..... | 44 |
| 3.3.1.7 | Agarosegelelektrophorese..... | 45 |
| 3.3.1.8 | Restriktionsverdau von DNA..... | 45 |
| 3.3.1.9 | Ligation von DNA..... | 45 |
| 3.3.1.10 | Klonierung von Plasmidvektoren..... | 46 |
| 3.3.1.10.1 | Konventionelle Klonierung von Plasmidvektoren..... | 46 |
| 3.3.1.10.2 | Das Gateway®-System..... | 46 |
| 3.3.1.11 | Sequenzierung der DNA..... | 47 |
| 3.3.1.12 | <i>real-time</i> PCR..... | 47 |
| 3.3.2 | Arbeiten mit RNA..... | 49 |
| 3.3.2.1 | Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen..... | 49 |
| 3.3.2.2 | Spektrometrische Konzentrationsbestimmung der RNA..... | 49 |
| 3.3.2.3 | Agarose-Gelelektrophorese von RNA..... | 50 |
| 3.3.2.4 | DNase-Verdau von RNA..... | 50 |
| 3.3.2.5 | Reverse Transkription in cDNA..... | 50 |
| 3.3.2.6 | Herstellung von cDNA-Proben für den <i>real-time</i> PCR KSHV-Array..... | 51 |
| 3.3.2.6.1 | Durchführung einer NaB-Induktionskinetik der K-DG75-wt- oder CBF1-ko- Zelllinie..... | 51 |
| 3.3.2.6.2 | Isolierung von RNA und Anreicherung von mRNA..... | 51 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.3.2.6.3 | Reverse Transkription und Testen der cDNA-Proben | 52 |
| 3.3.2.6.4 | Durchführung des KSHV-Arrays | 52 |
| 3.4 | Proteinbiochemische Methoden | 53 |
| 3.4.1 | Herstellung von Proteinextrakten | 53 |
| 3.4.2 | Expression und Präparation des rekombinanten CBF1-Proteins | 53 |
| 3.4.3 | Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford | 54 |
| 3.4.4 | SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 54 |
| 3.4.5 | Western Blot | 54 |
| 3.4.6 | Gel-Retardationsanalysen | 55 |
| 3.5 | Bioinformatische Methoden | 57 |
| 3.5.1 | Clusteranalyse der KSHV-Array-Daten | 57 |
| 3.5.2 | Promotoranalyse ausgewählter KSHV-Gene | 57 |
| 4 | Ergebnisse | 59 |
| 4.1 | Etablierung von KSHV-infizierten CBF1-positiven und -negativen B-Zell -linien | 60 |
| 4.1.1 | Experimentelle Durchführung der Infektion der CBF1-positiven oder -negativen B- Zelllinie DG75 | 60 |
| 4.1.2 | Nach Infektion und Selektion mit dem rekombinanten KSHV rKSHV.219 können B-Zellen etabliert werden, die stabil das GFP-Markergen exprimieren und das KSHV- Genom tragen | 61 |
| 4.1.3 | Die Kultivierung der wt- und CBF1-ko-K-DG75-Zellen ohne Puromycin führt kontinuierlich zum Verlust der GFP-Expression | 67 |
| 4.1.4 | Reaktivierung des lytischen Zyklus der KSHV-infizierten B-Zellen | 69 |
| 4.1.4.1 | Die Behandlung mit NaB induziert die Expression der frühen lytischen Gene in 2% der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen | 69 |
| 4.1.4.2 | Nach Induktion des lytischen Zyklus produzieren nur die CBF1-positiven K-DG75-Zellen infektiöse Viruspartikel | 72 |
| 4.2 | Genomweite Charakterisierung der viralen Genexpressionsprofile nach lytischer Reaktivierung | 76 |
| 4.2.1 | Der <i>real-time</i> PCR KSHV-Array ermöglichte die Analyse der Expression viraler Gene KSHV-infizierter DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen | 76 |
| 4.2.1.1 | Aufbau des KSHV-Arrays und experimentelle Durchführung | 77 |
| 4.2.1.2 | Auswertung des KSHV-Arrays | 79 |
| 4.2.1.3 | In den CBF1-negativen K-DG75-Zellen ist die Expression der viralen Transkripte stark beeinträchtigt | 81 |
| 4.2.2 | Bestätigung und Vergleich der Genexpressionsmuster ausgewählter KSHV-Gene in weiteren <i>real-time</i> PCR-Analysen | 87 |
| 4.2.2.1 | Durchführung der <i>real-time</i> PCR-Analysen | 87 |
| 4.2.2.2 | Untersuchung der Transkriptlevel nicht-induzierter CBF1-positiver und -negativer K-DG75-Zellen | 88 |
| 4.2.2.3 | Die Expression der ausgewählten KSHV-Gene ist nach Reaktivierung in den CBF1- negativen B-Zellen stark beeinträchtigt | 89 |
| 4.2.3 | Auch in der angereicherten GFP-RFP-doppelt-positiven K-DG75-CBF1-ko-Zell- population ist die Induktion viraler Transkripte reduziert | 96 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.2.4 | Die Überexpression des KSHV-Gens ORF50/Rta fördert nicht die Expression viraler Gene in den CBF1-negativen Zellen..... | 98 |
| 4.3 | Untersuchung der CBF1-abhängigen Regulation ausgewählter KSHV-Promotoren..... | 101 |
| 4.3.1 | Charakterisierung CBF1-abhängig regulierter KSHV-Gene..... | 101 |
| 4.3.2 | Promotoranalyse potentiell CBF1-abhängig regulierter KSHV-Gene | 103 |
| 4.3.2.1 | Die Aktivierung der ORF29a- und ORF65-Promotorbereiche durch ORF50/Rta ist partiell CBF1-abhängig..... | 105 |
| 4.3.3 | Nachweis der direkten CBF1-Bindung in den Promotorbereichen der KSHV-Gene ORF29a und ORF65..... | 109 |
| 5 | Diskussion..... | 115 |
| 5.1 | Nach Etablierung KSHV-infizierter CBF1-positiver und -negativer B-Zellen konnte nur in Anwesenheit von CBF1 die Produktion von infektiösen Viruspartikeln beobachtet werden..... | 115 |
| 5.2 | Die Induktion der viralen Genexpression ist in den KSHV-infizierten CBF1-negativen B-Zellen stark beeinträchtigt..... | 121 |
| 5.3 | Für die Promotoren der KSHV-Gene ORF65 und ORF29a wurde eine direkte funktionelle CBF1-Bindung nachgewiesen | 127 |
| 5.4 | Résumé..... | 131 |
| 5.5 | Ausblick | 132 |
| 6 | Abkürzungsverzeichnis..... | 136 |
| 7 | Ehrenwörtliche Versicherung | 139 |
| 8 | Danksagung | 140 |
| 9 | Veröffentlichungen | 141 |
| 10 | Literaturverzeichnis | 142 |

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abb. 1: Darstellung des KSHV-Genoms | 6 |
| Abb. 2: Die Rolle von CBF1 im Verlauf des Lebenszyklus von KSHV | 22 |
| Abb. 3: Das rekombinante KSHV rKSHV.219-System von J. Vieira und M. O’Hearn | 24 |
| Abb. 4: Schematische Darstellung der Infektion von DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen mit rekombinantem rKSHV.219-Virusüberstand | 60 |
| Abb. 5: Die Infektion von DG75-wt- und CBF1-ko-Zelllinien mit dem rekombinanten Virus rKSHV.219 und die Selektion GFP-positiver KSHV-infizierter Zellen. | 64 |
| Abb. 6: Das Transkriptniveau des latenten Gens ORF73/LANA weist zwischen den nicht-induzierten wt- und CBF1-negativen Zellen keine Unterschiede auf | 65 |
| Abb. 7: Vergleich der Anzahl viraler Genome zwischen den wt- und CBF1-negativen Zellen..... | 66 |
| Abb. 8: Die KSHV-Infektion der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen bleibt im Verlauf einer Langzeitkultivierung unter Puromycinselektion stabil..... | 68 |
| Abb. 9: Nach Absetzen der Puromycinselektion kommt es zur Abnahme der GFP-positiven K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen..... | 69 |
| Abb. 10: 48 Stunden nach der NaB-Induktion sind durchschnittlich 2% der KSHV-infizierten DG75-wt- und CBF1-ko-Zelllinien GFP-RFP-doppelt-positiv..... | 71 |
| Abb. 11: Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung der HEK293-Infektionsstudien mit K-DG75-wt- und CBF1-ko-Virusüberstand..... | 73 |
| Abb. 12: Die Produktion von infektiösen Viruspartikeln nach Reaktivierung des lytischen Zyklus konnte nur für die CBF1-positive K-DG75-Zelllinie nachgewiesen werden..... | 75 |
| Abb. 13: Vergleich der viralen Genexpressionsprofile der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen..... | 82 |
| Abb. 14: Nach lytischer Reaktivierung war das Expressionsprofil viraler Transkripte der verschiedenen Phasen des lytischen Zyklus in den CBF1-ko-Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen deutlich eingeschränkt..... | 84 |
| Abb. 15: Vergleich der Transkriptlevel zum Zeitpunkt Null der ausgewählten viralen Gene im nicht-induzierten Zustand der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen..... | 89 |
| Abb. 16: Vergleich der viralen Genexpressionsprofile von K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen zwischen den KSHV-Array-Daten und den <i>real-time</i> PCR-Analysen..... | 91 |
| Abb. 17: Untersuchung der im KSHV-Array regulierten Gene im Verlauf des lytischen Zyklus mittels <i>real-time</i> PCR | 92 |
| Abb. 18: Vergleich der Expression der 21 Gene in reaktivierten wt- und CBF1-negativen Zellen..... | 93 |
| Abb. 19: Die stark verminderte Induktion viraler Transkripte in Abwesenheit von CBF1 zeigt sich auch in einer GFP-RFP-doppelt-positiven angereicherten Zellpopulation | 97 |
| Abb. 20: Die transiente Überexpression von ORF50/Rta in den K-DG75-CBF1-ko-Zellen kann die wt-Genexpression nicht rekonstituieren | 100 |
| Abb. 21: Für die Promotorregionen der KSHV-Gene ORF29a und ORF65 konnte eine signifikante CBF1-abhängige Aktivierung durch ORF50/Rta gezeigt werden..... | 107 |
| Abb. 22: Die reduzierte Aktivierung der ORF29a- und ORF65-Promotorkonstrukte in den DG75-CBF1-ko-Zellen kann durch die Expression von CBF1 rekonstituiert werden..... | 108 |
| Abb. 23: Schematische Darstellung der vorhergesagten CBF1-Bindungsstellen im Promotorbereich der KSHV-Gene ORF29a und ORF65 | 110 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 24: Sowohl im Promotorbereich des ORF29a- als auch des ORF65-Gens konnte eine CBF1-Bindungsstelle nachgewiesen werden | 111 |
| Abb. 25: Vergleich der CBF1-Bindungsstärke der identifizierten CBF1-Bindungsstellen im Promotorbereich des ORF29a- und ORF65-Gens..... | 113 |
| | |
| Tab. 1: Vergleich der potentiellen CBF1-Bindungsstellen im KSHV-Genom des M- und P-Typs.... | 18 |
| Tab. 2: Für die hier aufgelisteten KSHV-Gene ist die CBF1-abhängige Regulation in der Literatur beschrieben..... | 19 |
| Tab. 3: Allgemeine Zelllinien..... | 26 |
| Tab. 4: In der AG Kempkes hergestellte Zelllinien..... | 26 |
| Tab. 5: In dieser Arbeit hergestellte Zelllinien..... | 27 |
| Tab. 6: Primer zur Quantifizierung von Transkripten mittels <i>real-time</i> PCR | 28 |
| Tab. 7: Oligonukleotide für die Gel-Retardationsstudien | 29 |
| Tab. 8: Primer zur Herstellung der Promotorfragmente ausgewählter KSHV-Gene | 29 |
| Tab. 9: Primer zur Herstellung der Expressionskonstrukte mittels konventioneller oder Gateway-Klonierung..... | 30 |
| Tab. 10: In der Arbeitsgruppe Kempkes bereits vorhandene Plasmide..... | 30 |
| Tab. 11: In dieser Arbeit hergestellte Entry- oder Säugerzellexpressionsvektoren..... | 30 |
| Tab. 12: In dieser Arbeit hergestellte Promotor-Reportergenkonstrukte | 31 |
| Tab. 13: Primäre Antikörper..... | 31 |
| Tab. 14: Sekundäre Antikörper | 31 |
| Tab. 15: PCR-Programm für die PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase..... | 44 |
| Tab. 16: Das <i>real-time</i> PCR-Programm | 49 |
| Tab. 17: Das Programm für die cDNA-Synthese | 51 |
| Tab. 18: Der T4-Polynukleotid-Kinase (PNK)-Reaktionsansatz | 55 |
| Tab. 19: Zusammensetzung der Gelelektrophorese-Proben..... | 56 |
| Tab. 20: Zusammensetzung eines 6%-igen Polyacrylamidgeles..... | 57 |
| Tab. 21: Auflistung der im KSHV-Array enthaltenen viralen Gene. | 79 |
| Tab. 22: Auflistung der Ct-Rohwerte, der im Array getesteten Haushaltsgene beta-Aktin, GAPDH und HPRT-1 im Verlauf der Reaktivierungskinetik der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen..... | 80 |
| Tab. 23: Vergleich der Δ Ct-Mittelwerte der 86 getesteten KSHV-Gene zwischen den K-DG75-wt und CBF1-ko-Zellen. | 83 |
| Tab. 24: Das reduzierte Expressionsniveau in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen kann nicht auf eine bestimmte Genklasse eingeschränkt werden. | 86 |
| Tab. 25: Gegenüberstellung der KSHV-Array-Daten und der <i>real-time</i> PCR-Daten ausgewählter KSHV-Gene. | 96 |
| Tab. 26: Eine CBF1-abhängige Regulation der ausgewählten KSHV-Gene wurde bisher noch nicht beschrieben..... | 103 |
| Tab. 27: Auflistung der potentiellen CBF1-Bindungsstellen in den Promotorbereichen der KSHV-Gene ORF4, ORF9, ORF29a, ORF62, ORF65, K5 und K10. | 104 |

Zusammenfassung

Das humanpathogene Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV) wird neben dem Kaposi-Sarkom (KS) mit zwei lymphoproliferativen Erkrankungen, dem primären Effusionslymphom (PEL) und der multizentrischen Castleman-Erkrankung (MCD) in Verbindung gebracht. Wie alle Herpesviren zeichnet sich KSHV durch eine latente und lytische Lebensphase aus. Die Induktion des lytischen Zyklus latent infizierter Zellen erfolgt durch den viralen Transkriptionsfaktor ORF50/Rta. ORF50/Rta kann entweder direkt oder über zelluläre DNA-Bindeproteine - so zum Beispiel CSL/CBF1 - an die Promotoren viraler Gene rekrutiert werden und deren Expression initiieren. In KSHV-infizierten CBF1-negativen murinen Fibroblasten können weder die virale Replikation noch die Virusproduktion nachgewiesen werden.

Da humane B-Zellen ein wichtiges Reservoir im latent KSHV-infizierten Wirt darstellen sowie die Tumorzellen der KSHV-assoziierten Erkrankungen PEL und MCD einen B-Zell-Charakter aufweisen und der lytische Zyklus wahrscheinlich maßgeblich zur Pathogenese dieser Krankheiten beiträgt, war es Ziel dieser Arbeit, den Beitrag von CSL/CBF1 in KSHV-infizierten B-Zelllinien zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher erstmalig CBF1-positive und -negative humane B-Zellen mit rekombinantem KSHV infiziert und stabile Linien etabliert, die das KSHV-Genom tragen. Mit diesem neuen biologisch relevanten B-Zellsystem konnte erstmalig der Einfluss von CBF1 auf die virale Reaktivierung in humanen B-Zellen charakterisiert werden.

Weder in der Anzahl der Viruskopien noch im Expressionsniveau des latenten ORF73/LANA-Transkripts konnten Unterschiede zwischen den CBF1-positiven und -negativen KSHV-infizierten B-Zellen beobachtet werden. Die chemische Reaktivierung führte jedoch nur in den CBF1-positiven Zellen zur Produktion infektiöser Viren. In der genomweiten Analyse viraler Transkripte zeichnete sich in den CBF1-negativen B-Zellen 32 Stunden nach lytischer Reaktivierung für mindestens 50% der Gene eine stark verminderte Induktion ab. Bei der Charakterisierung von 5 potentiellen CBF1-abhängig regulierten Kandidaten in Reporter- und Gel-Retardationsanalysen, konnte für zwei Gene, ORF29a und ORF65, die direkte Bindung von CBF1 im Promotorbereich und eine partiell CBF1-abhängige Aktivierung über ORF50/Rta nachgewiesen werden. ORF65 und ORF29a nehmen eine wichtige Funktion bei der Morphogenese des Viruskapsids und der Verpackung der Virusgenome ein. Die deutlich eingeschränkte Expression lytischer Gene in den CBF1-negativen Zellen, die zum Teil notwendig für die Virusmorphogenese sind, deutet an, dass die Akkumulation von direkt oder indirekt CBF1-abhängigen Ereignissen letztlich zum Verlust der Virusproduktion führen. CBF1 nimmt somit eine absolut essentielle Rolle im lytischen Reaktivierungsprozess KSHV-infizierter B-Zellen ein.

1 Einleitung

1.1 Das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV)

1.1.1 Geschichte, Evolution und Epidemiologie von KSHV

Im Jahr 1872 wurde das Kaposi-Sarkom (KS) erstmals von dem ungarischen Dermatologen Moritz K. Kaposi als „idiopathisches multiples Pigmentsarkom der Haut“ beschrieben. Das unregelmäßige geographische Auftreten dieser Hauterkrankung führte zu der Hypothese, dass es sich bei deren Ursache um einen infektiösen Erreger handelt. 1972 entdeckte Giraldo et al. Herpesvirus-ähnliche Partikel in Gewebekulturen von KS-Biopsien (Giraldo et al., 1972). Die endgültige Identifikation des humanen KSHV, auch als Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8) bezeichnet, gelang Chang et al. 1994 durch die Isolierung einer herpesviralen Sequenz aus dem Gewebe eines an KS erkrankten AIDS-Patienten (Chang et al., 1994).

KSHV und das nächst verwandte Epstein-Barr Virus (EBV) werden den γ -Herpesviren zugeordnet. Verwandte γ -Herpesviren treten in vielen Säugetierspezies auf, wobei von einer Koevolution der viralen Erreger mit ihrem Wirt ausgegangen wird. EBV wird als γ_1 -Herpesvirus der Gattung der Lymphocryptoviren und KSHV als γ_2 -Herpesvirus der Gattung der Rhadinoviren (RV) klassifiziert. Es wird zwischen zwei Rhadinovirus-Linien, RV1 und RV2, unterschieden. Bei KSHV handelt es sich um einen humanpathogenen Erreger, welcher der RV1-Linie zugeordnet wird (Jarviluoma and Ojala, 2006, Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, S. 2847-2849).

Basierend auf dem KSHV-Gen K1, dessen Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Isolaten eine Variation von 30-60% aufweist, wird KSHV in fünf Gruppen A-E unterteilt, welche sich wahrscheinlich innerhalb der menschlichen Bevölkerung aufgrund der Migration im Laufe der letzten 30-40000 Jahre in verschiedene Richtungen entwickelten. Die Gruppen B, D und E treten vornehmlich bei Menschen afrikanischer, asiatischer oder polynesischer Abstammung auf, wohingegen die Gruppen A und C in Nord-Europa, Amerika und Asien zum Vorschein kamen. Die Variation der KSHV-Nukleotidsequenz dieser Gruppen beläuft sich auf weniger als 3% (Schulz, 2006, Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, S. 2849-2851).

Die Gruppen A und C werden wegen Sequenzunterschieden in einem Bereich, der sich über die kodierende Region der KSHV-Gene K15 und ORF75 erstreckt, in den M (*minor*)-Typ (PEL; NCBI Referenznummer NC_U75698) und P (*prototype/predominant*)-Typ

(klassische KS-Tumor-Biopsie, GK18, NCBI Referenznummer NC_009333) unterteilt. Beide Varianten besitzen ein funktionelles K15-Gen, welches für einen Transmembranrezeptor kodiert und zwischen dem M- und dem P-Typ nur eine 33%-ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz aufweist (Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, S. 2850-2851).

KSHV ist in vielen Teilen der Erde verbreitet, wobei sich unregelmäßige geographische Verteilungen zeigen. In serologischen Studien konnte bei über 50% der erwachsenen Bevölkerung in Afrika, vor allem südlich der Sahara, eine KSHV-Infektion nachgewiesen werden. Im mediterranen Raum konnte ein serologischer Nachweis von KSHV bei 10-30% der Bevölkerung erbracht werden. Für die Bevölkerung in Nord-Europa, Asien und Amerika ist eine KSHV-Seroprävalenz von unter 10% beschrieben (Mesri et al., 2010).

Die Infektion mit KSHV kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. In endemischen Ländern kommt es hauptsächlich im Kindesalter zur Infektion, wobei die Übertragung direkt durch die Mutter erfolgt. Sexualverkehr, Kontakt mit Blut oder Speichel zählen zu den möglichen Ansteckungswegen im Erwachsenenalter. Die Infektion mit KSHV über Speichel stellt dabei den häufigsten Übertragungsweg dar (Schulz, 2006, Jarviluoma and Ojala, 2006).

1.1.2 KSHV-assoziierte Erkrankungen

KSHV wurde von der *International Agency for Research against Cancer* (IARC) in die Liste infektiöser Humanpathogene als Klasse I Kanzerogen aufgenommen. KSHV wird neben dem Kaposi-Sarkom, mit zwei lymphoproliferativen Erkrankungen, dem primären Effusionslymphom (PEL) und der multizentrischen Castleman-Erkrankung (MCD) in Verbindung gebracht (Schulz, 2006).

Bei dem **Kaposi-Sarkom** handelt es sich um eine abnormal vaskularisierende, tumorähnliche Erkrankung der Haut, Lymphknoten und inneren Organen. Die frühe Phase des KS ist durch das Auftreten von rötlich-violett-braunen Flecken, vor allem an den unteren Extremitäten, charakterisiert. In der späten Phase des KS, die als noduläre Phase bezeichnet wird, zeigt sich eine verstärkte Proliferation von Spindelzellen, wodurch es zur Neubildung zahlreicher Blutgefäße kommt. Die Einlagerung von Hämosiderin erklärt die Färbung der Läsionen (Jenner and Boshoff, 2002, Übersicht: Neipel and Fleckenstein, *Med. Virologie*, S.696-697).

Der zelluläre Ursprung der KS-Tumorzellen ist noch unklar. Für die meisten Spindelzellen konnte sowohl die Expression endothelialer als auch lymphatischer Zelloberflächenmarkern nachgewiesen werden. Die Identifizierung weiterer Zellmarker, die spezifisch für Muskelzellen und dendritische Zellen oder Makrophagen sind, lässt vermuten, dass es sich bei

den KS-Spindelzellen um keine einheitliche Zellpopulation handelt. In frühen KS-Läsionen sind um die 10%, in der nodulären Phase sogar 90% der Spindel- und Endothelzellen KSHV-positiv, wodurch von einem Wachstumsvorteil der infizierten Zellen auszugehen ist (Jenner and Boshoff, 2002).

Das KS wird in vier verschiedene Formen unterteilt: klassisches, epidemisches AIDS-assoziiertes (AKS), endemisches (EKS) und iatrogenes KS. Das klassische KS ist als langsam wachsender Tumor in den Extremitäten von älteren Männern aus mediterranem oder ost- und mitteleuropäischem Raum beschrieben. Bei dem AKS handelt es sich, aufgrund des 20000-fach erhöhten Erkrankungsrisikos bei paralleler HIV-Infektion, um die am häufigsten verbreitete Form. Durch die enorme Zunahme der AIDS-Erkrankungen stieg auch die KS-Inzidenz in Afrika an. Diese klinisch äußerst aggressive Form führt zu einer schnellen Zellentartung (Pyakurel et al., 2007). Die endemische Form des KS tritt vorwiegend im Kindesalter auf und ist in Ost- und Zentralafrika zu beobachten. Bei Organtransplantat-Empfängern und Patienten mit immunsuppressiver Therapie kann sich das iatrogene KS entwickeln. In den häufigsten Fällen ist das KS in Folge einer Reaktivierung der bereits vorhandenen KSHV-Infektion zu beobachten (Jarviluoma and Ojala, 2006, Jenner and Boshoff, 2002, Marcelin et al., 2007).

Kurz nach der Entdeckung von KSHV in KS-Biopsien konnte Cesarman et al. eine Assoziation zu dem **primären Effusionslymphom**, auch als *body cavity-based Lymphoma* (BCBL) bezeichnet, herstellen (Cesarman et al., 1995). Bei dem PEL handelt es sich um ein seltenes Non-Hodgkin-Lymphom, das als maligne Effusion in pleuralen, pericardialen und peritonealen Hohlräumen charakterisiert ist. In seltenen Fällen kommt es zur Bildung von soliden Tumoren in lymphatischen Organen. 99% der PEL-Zellen sind KSHV-positiv. Meist tritt das PEL in Verbindung mit einer HIV-Infektion bei Patienten mit zunehmender Immunsuppression auf. Für Patienten mit diesem aggressiven Lymphom ist eine durchschnittliche Überlebenszeit von 2-6 Monaten beschrieben. Obwohl in 80% der Fälle des PEL eine Koinfektion mit EBV nachzuweisen ist, spielt KSHV die entscheidende Rolle bei der Pathogenese, da ein Auftreten von KSHV-negativen PEL-Zellen bisher nicht gezeigt werden konnte (Komanduri et al., 1996, Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, S. 2852).

Bei den PEL-Zellen handelt es sich um monoklonale, immortalisierte Zellen. Der zelluläre Ursprung und die viralen Gene, die für die Transformation der Zellen verantwortlich sind, sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Basierend auf der Hypermutation von Immunglobulinen und dem Nachweis von spezifischen Markern der B-Zell-Differenzierung wird

vermutet, dass es sich bei PEL-Zellen um post-keimzentrische B-Zellen handelt, welche in ihrer weiteren Entwicklung zu Plasmazellen gehemmt werden (Jenner and Boshoff, 2002, Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, S. 2852).

Bei der **multizentrischen Castleman-Erkrankung**, auch multizentrische angiofollikuläre lymphatische Hyperplasie (ALPD) genannt, wird zwischen dem Plasmazell-Typ und dem vaskulären Typ unterschieden. Es handelt sich um eine atypische lymphoproliferative Erkrankung, die durch eine erhöhte Zellproliferation in lymphoiden Organen wie Thymus, Knochenmark oder Milz charakterisiert ist. Nur der Plasmazell-Typ, die aggressive Variante der MCD, ist zu 50% mit KSHV assoziiert. Die MCD tritt dabei in 18% der Fälle in Verbindung mit PEL und in 13% in Verbindung mit KS auf. Zudem ist eine Assoziation mit der HIV-Infektion beschrieben, wobei 75% dieser Patienten am AIDS-assoziierten KS leiden (Soulier et al., 1995). In den vergrößerten Lymphknoten liegen Follikel mit vergrößerten Keimzentren vor, wobei die MCD-Zellen hauptsächlich in der Mantelzone lokalisiert sind. Bei den Tumorzellen handelt es sich um Zellen, die meist multiklonal und von plasmazellähnlicher Gestalt sind und keine somatische Hypermutation in den Immunglobulingenen aufweisen (Jenner and Boshoff, 2002, Übersicht: Neipel and Fleckenstein, *Med. Virologie*, S.696-697). Es wird vermutet, dass die erhöhte Produktion des humanen Interleukin 6 (hIL-6), welche durch das virale Protein K2/vIL (*viral interleukin*)-6 induziert wird, einen entscheidenden Faktor für die Entwicklung dieser Erkrankung darstellt (Oksenhendler et al., 2002).

1.1.3 Das KSHV-Genom

Im viralen Kapsid liegt das Genom als lineare doppelsträngige DNA vor, die nach Infektion der Wirtszellen in den Zellkern injiziert wird und zu einem doppelsträngigen Episom zirkularisiert. Das KSHV-Genom umfasst eine Größe von 165-170 kb mit einer genkodierenden Region von über 145 kb, die von multiplen terminalen Wiederholungselementen (*terminal repeat units*, TRs) flankiert wird. Die TRs setzen sich aus 801 Basenpaaren (bp) zusammen und weisen einen hohen Gehalt an Guanin und Cytosin (84,5%) auf (Russo et al., 1996b, Renne et al., 1996b, Neipel et al., 1998).

In der kodierenden Region sind über 85 offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) beschrieben, wobei die genaue Anzahl an Exons und Introns noch nicht vollständig charakterisiert ist. Das Genom ist in sieben hoch konservierte Genbereiche gegliedert, die durch KSHV-spezifische ORFs, die für sogenannte „*unique genes*“ kodieren, oder durch

ORFs, für die Homologien zu ORFs anderer Herpesviren beschrieben wurden, getrennt sind. Für 67 ORFs konnten Homologien zu dem verwandten Herpesvirus Saimiri (HVS) hergestellt werden. Diese Gene (ORF4-ORF11, ORF16-ORF69, ORF71-ORF75) sind analog zur HVS-Nomenklatur benannt und beinhalten Gene, die unter anderem für Proteine für Struktur, für die virale Replikation und Regulation der Genexpression kodieren (Russo et al., 1996b, Jarviluoma and Ojala, 2006).

Die KSHV-spezifischen ORFs, welche keine Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen zu HVS aufweisen, werden mit einem „K“ deklariert. Bis heute wurden 19 KSHV-spezifische Gene identifiziert (K1-K15, K4.1, K4.2, K8.1, K10.5), die für Proteine kodieren, die an der Regulation des Zellzyklus, dem Nukleotid-Metabolismus oder an verschiedenen zellulären Signalwegen beteiligt sind. Die Funktion vieler dieser Gene wurde basierend auf den bekannten Eigenschaften homologer zellulärer Gene näher charakterisiert. Dennoch ist bei über der Hälfte der Gene die Funktion unbekannt (Russo et al., 1996b, Longnecker and Neipel, 2007). Neben den ORFs konnten auch 12 nicht-kodierende Mikro-RNAs (miR-K1-12) und ein 1,1 kb großes polyadenyliertes Transkript (*polyadenylated nuclear RNA*, PAN) auf dem KSHV-Genom identifiziert werden. 10 miRNAs sind in einer nicht-kodierenden Region und zwei in der kodierenden Region von K12 lokalisiert (Lei et al., 2010) (Abb. 1).

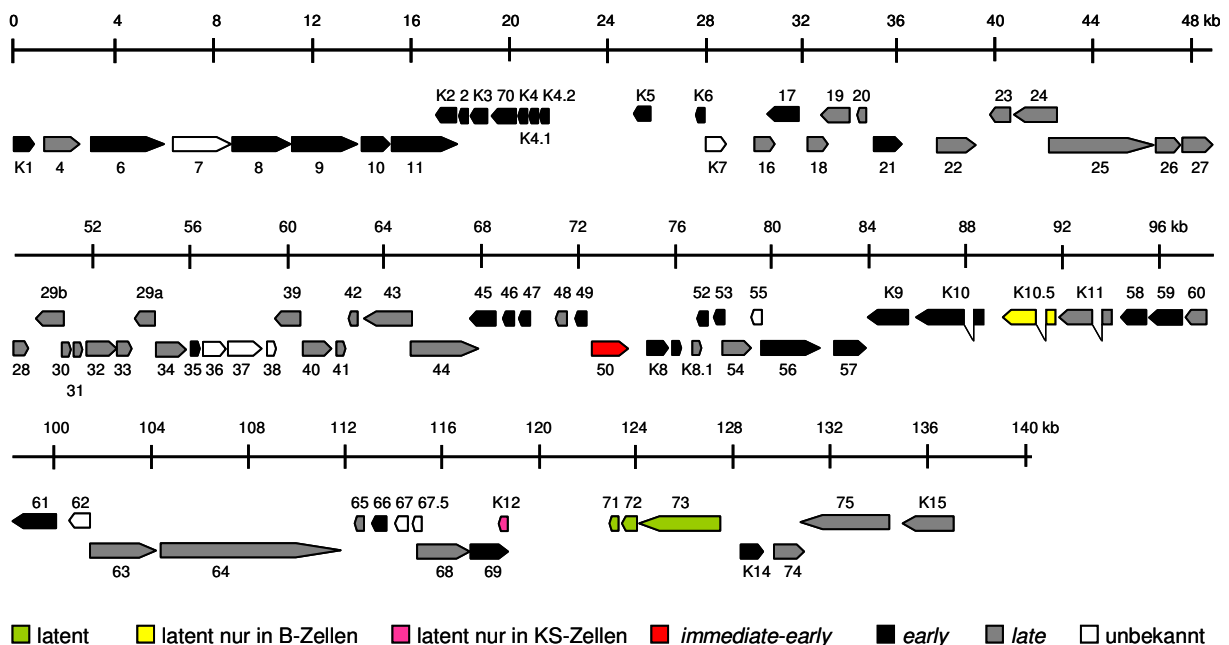


Abb. 1: Darstellung des KSHV-Genoms. Die kodierende Region des KSHV-Genoms umfasst über 85 offene Leseraster. Die latenten Gene sind gelb/orange, *immediate-early* Gene in rot, *early* Gene in schwarz, *late* Gene in grau und die Gene, deren Expressionszeitpunkt unbekannt ist, in weiß dargestellt (modifiziert nach Schulz and Chang, 2007).

Eine Besonderheit von KSHV zeigt sich in der großen Anzahl von Genen, die Homologien zu zellulären Genen aufweisen, die von anderen Herpesviren, z.B. EBV, induziert werden. Beispielsweise handelt es sich bei ORF72/vCyclin um ein Homolog zu dem zellulären Cyclin D2, welches durch das EBV-Protein LMP1 induziert wird. Bisher wurden für insgesamt 14 KSHV-Gene Homologien zu zellulären Genen gezeigt. Sowohl KSHV als auch EBV benutzen zelluläre Faktoren um Signalwege und regulatorische Prozesse zu modulieren und die zelluläre Immunantwort zu unterdrücken (Jenner and Boshoff, 2002, Jarviluoma and Ojala, 2006, Russo et al., 1996b, Neipel et al., 1998).

1.1.4 Die Phasen der KSHV-Infektion

Die Infektion durch KSHV erfolgt über die Bindung viraler Glykoproteine an Rezeptoren der Wirtszelle. Die Endozytose führt zur Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle. Das Viruskapsid wird aus dem Endozytosevesikel freigesetzt und wandert durch das Zytoplasma zum Zellkern, in dem das virale Genom zirkularisiert und ein doppelsträngiges Episom bildet. In den etablierten PEL-Zelllinien liegt die Anzahl an Viruskopien zwischen 25 und 100 Stück pro Zelle (Cesarman et al., 1995, Renne et al., 1996b, Cannon et al., 2000, Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, p. 2856-2857).

Die Bindung der KSHV-Glykoproteine an der Zelloberfläche variiert zwischen den verschiedenen Wirtszellen. Die ubiquitär auf den Zelloberflächen exprimierten Heparansulfat-Proteoglykane (HS) gehören zu den in der Literatur beschriebenen Rezeptoren für KSHV. Die Interaktion mit HS ermöglicht die Akkumulation von KSHV-Partikeln und die Bindung an weitere Moleküle auf der Zelloberfläche, die für die Aufnahme des Virus essentiell sind (Akula et al., 2001). Integrine und das xCT (*12-transmembran glutamate/cysteine exchange transporter protein*)-Molekül werden als weitere potentielle Rezeptoren für die Bindung von KSHV an seine Wirtszellen vorgeschlagen (Kaleeba and Berger, 2006, Chandran, 2010, Akula et al., 2002). Rappocciolo et al. beschreibt für die KSHV-Bindung an myeloide dendritische Zellen, Makrophagen und aktivierte B-Zellen einen essentiellen Beitrag des Oberflächenmoleküls DC-sign (*dendritic cell-specific, ICAM-3 grapping non-integrin, CD209*) (Rappocciolo et al., 2006). Für den Viruseintritt *in vivo* werden somit verschiedene mögliche Mechanismen abhängig von der Wirtszelle in Betracht gezogen.

Nach Bindung des Virus kommt es zur Modulation einer Reihe von Signalkaskaden in der Wirtszelle, wodurch das zelluläre Milieu so verändert wird, dass die folgenden Prozesse der viralen Infektion begünstigt werden (Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, S. 2856-2857).

1.1.5 Der Lebenszyklus von KSHV

Der Lebenszyklus von KSHV zeichnet sich durch eine latente und lytische Lebensphase aus, die durch die Expression spezifischer viraler und zellulärer Proteine reguliert wird. Die Etablierung einer KSHV-Infektion basiert auf dem Gleichgewicht verschiedener Kontrollmechanismen, die die zelluläre Immunabwehr und die latente oder lytische Phase modulieren.

1.1.5.1 Die latente Phase von KSHV

Während der **Latenz**, die als Ruhephase des viralen Lebenszyklus bezeichnet wird, liegt das Virusgenom als geschlossenes zirkuläres Episom im Zellkern vor. Die virale DNA wird durch die DNA-Replikationsmaschinerie der Wirtszelle während des Zellzyklus amplifiziert. In der latenten Phase wird nur eine begrenzte Anzahl von KSHV-Proteinen exprimiert, die zur Etablierung der latenten Infektion und zur Erhaltung des viralen Genoms erforderlich ist. Dabei handelt es sich um die KSHV-Gene ORF71/vFlip (*Fas-associated death domain interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein*), ORF72/vCyclin, ORF73/LANA (*latency-associated nuclear antigen*), K10.5/vIRF3 (*viral interferone regulatory factor 3*) und K12/Kaposin (Jenner and Boshoff, 2002).

Unter den latenten viralen Genen hat ORF73/LANA eine besonders wichtige Funktion. ORF73/LANA, das erste nach der KSHV-Infektion exprimierte Gen, ist ein DNA-interagierendes Protein, das durch die Bindung an den „*origin of plasmid replication*“ (oriP) die Interaktion des viralen Genoms mit den Chromosomen der Wirtszelle vermittelt und die Verteilung des episomalen KSHV-Genoms auf die Tochterzelle bei der Zellteilung ermöglicht. Dieser Prozess wird als latente Replikation bezeichnet (Ballestas et al., 1999, Ballestas and Kaye, 2001).

Durch die eingeschränkte Expression viraler Proteine in der Latenz wird die Zahl an präsentierten, viralen Epitopen auf der Zelloberfläche und deren Erkennung durch zytotoxische T-Zellen minimiert, die zelluläre Immunantwort unterdrückt und die Etablierung der latenten Infektion gefördert (Brander et al., 2002, Brander et al., 2000). Die Expression der KSHV-Proteine ORF71/vFLIP, ORF72/vCyclin und ORF73/LANA wurde in allen KSHV-infizierten Zellen in KS, PEL oder MCD nachgewiesen. Im PEL und der MCD konnten zusätzlich das Transkript von K10.5/vIRF3, in der MCD von K2/vIL6 und im KS von K12/Kaposin detektiert werden. Da der latente Zustand und die Expression dieser Gene in den transformierten PEL-Zellen dominiert, wird eine essentielle Rolle dieser Gene bei der Pathogenese der KSHV-assoziierten Erkrankung angenommen (Parravicini et al., 2000,

Jenner and Boshoff, 2002). In Abwesenheit der Gene ORF71/vFLIP und K10.5/vIRF3 war beispielsweise die Proliferation von PEL-Zellen stark eingeschränkt (Wies et al., 2008).

Nach primärer Infektion mit KSHV ist für die meisten etablierten Zelllinien der latente Lebenszyklus nachzuweisen. Bei den PEL-Zellen ist nur ein geringer Anteil von 1-4% der Zellen im latenten Zustand spontan lytisch reaktiviert (Bechtel et al., 2003, Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, S. 2854-2855).

1.1.5.2 Der lytische Zyklus von KSHV

Die lytische Lebensphase KSHV-infizierter Zellen ist durch die Expression des gesamten Repertoires an viralen Genen, die unter anderem für die virale Replikation, die Produktion infektiöser Viruspartikel und die Freisetzung der Partikel durch die Lyse der Zellen notwendig sind, charakterisiert. Durch die Behandlung der KSHV-positiven Zellen mit Phorbolester wie 12-O-tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA), mit dem Histondeacetylase-inhibitor Natriumbutyrat (NaB), mit Calciumionophoren oder Interferon Gamma wird der lytische Lebenszyklus induziert (Arvanitakis et al., 1996, Miller et al., 1997, Yu et al., 1999). Dabei werden in den KSHV-positiven PEL-Linien BCBL-1 und BC-3 und den KSHV-EBV-doppelt-positiven Linien BC-1, JSC-1 und HBL-6 nach chemischer Induktion 20-30% der Zellen lytisch reaktiviert (Schulz et al., 2002, Dourmishev et al., 2003, Antman and Chang, 2000, Chandran, 2010, Chandran and Hutt-Fletcher, 2007). Über die Reaktivierung von KSHV unter physiologischen Bedingungen ist wenig bekannt. Bisher konnten zwei Gruppen nach der Kultivierung von PEL-Zellen unter Hypoxie die Expression lytischer Gene nachweisen (Haque et al., 2003, Davis et al., 2001).

Basierend auf dem Expressionsmuster im Verlauf des viralen Lebenszyklus, werden die KSHV-Gene in vier Klassen eingeteilt: latente (LA), *immediate-early* (IE), *early* (E) und *late* (L) Gene. Die latenten Gene von KSHV sind für die Aufrechterhaltung der latenten Lebensphase erforderlich. Die *immediate-early* Gene werden früh nach primärer Infektion oder nach lytischer Reaktivierung exprimiert, benötigen keine *de novo* Proteinsynthese und werden somit auch in Anwesenheit von Proteinsynthese-Inhibitoren (z.B. Cycloheximid) transkribiert. Diese Gene, wie z.B. ORF50/Rta, kodieren vor allem für Proteine, die an der Expression von viralen oder zellulären Genen während des lytischen Zyklus beteiligt sind. Die Transkription von *early* Genen findet nach der Expression der IE-Gene, aber noch vor der viralen DNA-Replikation statt. Ihre Expression wird somit nicht durch Inhibitoren der viralen Replikation (z.B. Phosphoracetat-Säure oder Ganciclovir) beeinträchtigt. Die Expression von

late Genen benötigt die virale DNA-Replikation und findet erst ca. 30 Stunden nach der lytischen Reaktivierung statt (West and Wood, 2003).

1.1.6 KSHV-Wirtszellen

Für die KSHV-Infektion ist *in vivo* ein breites Spektrum an Wirtszellen beschrieben, wobei eine natürliche Infektion bisher ausschließlich für humane Zellen gezeigt werden konnte. Der Nachweis viraler DNA erfolgte sowohl in CD19-positiven B-Zellen aus peripherem Blut von KS-, PEL- oder MCD-Patienten als auch in vaskulären Endothel-, Spindel-, Epithelzellen, CD45/CD68-positiven Monozyten und Keratinozyten aus KS-Läsionen. Da in gesunden seropositiven Menschen die virale DNA kaum nachweisbar ist, ist bisher noch unklar, welcher Zelltyp das primäre Reservoir für die persistente Infektion darstellt (Chandran, 2010, Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, p. 2854-2855, Neipel und Fleckenstein, *Med. Virologie*, S.696-697).

Die *in vitro* Kultivierung von KSHV-positiven Zellen endothelialen Ursprungs aus KS-Läsionen ist aus noch ungeklärten Gründen nicht möglich, da schon nach wenigen Passagen der Verlust des viralen Genoms nachzuweisen ist. Im Gegensatz dazu konnten aus PEL stabile Zelllinien mit B-Zell-Charakter *in vitro* etabliert werden. Dabei handelt es sich unter anderem um die KSHV-positiven Linien BCBL-1 und BC-3 und den KSHV-EBV-doppelt-positiven Linien BC-1, JSC-1 und HBL-6 (Chandran, 2010).

CD19-positive B-Zellen werden in der Literatur als primäres Reservoir für die latente KSHV-Infektion vorgeschlagen. Neben dem Nachweis von KSHV-infizierten CD19-positiven B-Zellen in peripherem Blut aus KS-Läsionen, im PEL oder der MCD, ist bisher nur die *in vitro* Kultivierung von PEL-Zellen möglich (Ambroziak et al., 1995, Rappocciolo et al., 2008, Chandran, 2010). Zudem konnte mittlerweile von verschiedenen Gruppen die *in vitro* Infektion von CD19-positiven B-Zellen mit KSHV durchgeführt werden. 1998 wurde erstmalig die erfolgreiche Infektion von CD19-positiven B-Zellen aus peripherem Blut, die eine Koinfektion mit EBV aufwies, beschrieben (Kliche et al., 1998). Rappocciolo et al. gelang die Infektion von CD19-positiven B-Zellen aus peripherem Blut und Tonsillen, für die nach der Aktivierung durch den CD40-Liganden und Interleukin-4 eine erhöhte Expression von DC-SIGN nachzuweisen war (Rappocciolo et al., 2008). Erst kürzlich zeigte eine weitere Gruppe die *in vitro* Infektion mit KSHV von IgM λ - und CD19-positiven B-Zellen aus Tonsillen. 72 Stunden nach der Infektion konnte für die KSHV-positive B-Zellpopulation sogar eine erhöhte Expression eines Proliferationsmarkers nachgewiesen werden (Hassman et al., 2011). Eine weitere Gruppe zeigte, dass sowohl 4-5% der B-Zellen als auch 20-40% der

T-Zellen, isoliert aus Tonsillen, empfänglich für eine KSHV-Infektion waren. Es konnte aber weder für die B- noch für die T-Zellen eine Immortalisierung nachgewiesen werden (Myoung and Ganem, 2011a, Myoung and Ganem, 2011b).

Mit Virusüberständen lytisch reaktiverter PEL-Zellen war es möglich, *in vitro* humane B-, Endothel-, Epithel- und Fibroblastenzellen, CD34-positive hämatopoetische Stammzellvorfürer, unreife B-Zellen aus dem Knochenmark, dendritische Zellen und Monozyten mit KSHV zu infizieren (Henry et al., 1999, Luppi et al., 2000, Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, S. 2854-2855). Eine *in vitro* Infektion mit KSHV konnte auch mit Zellen anderer Spezies durchgeführt werden, die nicht der natürlichen KSHV-Wirtszelle entsprechen, wie z.B. den Vero-Zellen (Nierenepithelzellen von Grünen Meerkatzen), BHK-21-Zellen (*baby hamster kidney fibroblast*), CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) und Mausfibroblasten (Akula et al., 2001, Bechtel et al., 2003, Blackbourn et al., 2000, Ciuffo et al., 2001, Dezube et al., 2002, Lagunoff et al., 2002, Moses et al., 1999, Naranatt et al., 2003, Renne et al., 1998, Vieira et al., 2001, Cerimele et al., 2001). In den meisten Fällen konnte nach primärer Infektion die Expression von ORF73/LANA, dem Markerprotein der Latenz, nachgewiesen werden.

Mittlerweile wurde eine Reihe von verschiedenen KSHV-infizierten Zellsystemen generiert, die sowohl die Latenz aufweisen als auch durch Phorbolester oder ORF50/Rta-Überexpression lytisch reaktivierbar sind, und sich somit als Modell zur Untersuchung des KSHV-Lebenszyklus eignen. Dabei handelt es sich unter anderem um die Zelllinien HMVEC-d (*human microvascular dermal endothelial cells*), HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), HFF (*human foreskin fibroblast cells*), TIME (*human telomerase-immortalized dermal microvascular endothelial cells* (DMVECs), Vero, HELA (*cervical carcinoma cells*), SLK (Spindelzellen), HEK293 (*human embryonic kidney epithelial cells*) und murinen Fibroblasten (Chandran, 2010, Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, S. 2854-2855).

Trotz eindeutiger Hinweise eines Lymphtropismus von KSHV *in vivo*, zeigte sich die *in vitro* Etablierung von KSHV-infizierten Zelllinien mit B-Zell-Charakter als weniger erfolgreich (Bechtel et al., 2003, Renne et al., 1998, Blackbourn et al., 2000, Myoung and Ganem, 2011a). So beschreibt eine Gruppe die Infektion der Burkitt-Lymphom B-Zelllinie BJAB, auch nach Anwendung von Selektionsmitteln, als unmöglich (Chen and Lagunoff, 2005).

Im Gegensatz zu EBV führt die *in vitro* Infektion mit KSHV weder bei primären B-Zellen noch bei Endothelzellen zur Immortalisierung (Bechtel et al., 2003, Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, S. 2854-2855).

Nach primärer Infektion konnte für die meisten Zelllinien keine phänotypische Veränderung beobachtet werden. Die Ausnahme bildeten primäre Endothelzellen, für die nach der Infektion mit KSHV eine drastische Veränderung ihrer Morphologie, vergleichbar mit der Struktur von KSHV-positiven Spindelzellen aus KS-Läsionen, zu beobachten war (Übersicht: Ganem, *Fields Virology*, 2006, S. 2854-2855).

Die *de novo* Infektion von Endothelzellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und primären B-Zellen mit KSHV führte zur transienten Expression einer Reihe lytischer Gene, für die eine immunmodulierende oder anti-apoptotische Funktion beschrieben ist. Diese Ereignisse werden als abortiver lytischer Zyklus bezeichnet, da schon nach kurzer Zeit die Expression latenter Markergene und somit die Etablierung des latenten Lebenszyklus zu beobachten ist (Rappocciolo et al., 2008, Rappocciolo et al., 2006, Krishnan et al., 2004).

1.2 Regulationsmechanismen des lytischen Zyklus von KSHV

1.2.1 Die Rolle des lytischen Zyklus in KSHV-assoziiierter Pathogenese

Da die primäre KSHV-Infektion nicht zur Immortalisierung primärer B-Zellen führt, wurde der Einfluss der lytischen Replikation auf die Pathogenese und Tumorentstehung KSHV-assoziiierter Erkrankungen untersucht. Basierend auf klinischen Studien sind verschiedene Anhaltspunkte gegeben, die für den lytischen Zyklus eine entscheidende Rolle in der Progression KSHV-assoziiierter Erkrankungen vorschlagen.

Während des Übergangs von der asymptomatischen Phase zu KS zeigt sich eine direkt proportionale Zunahme der Viruslast im peripheren Blut (Ambroziak et al., 1995, Boneschi et al., 2001, Campbell et al., 2000, Engels et al., 2003, Quinlivan et al., 2002, Whitby et al., 1995). Zudem führte die Behandlung HIV/KSHV-doppelt-positiver Patienten mit dem Replikationsinhibitor Ganciclovir zur Verminderung der KS-Läsionen (Martin et al., 1999). Obwohl in KS-Tumorzellen der latente Zustand dominiert, ist immer ein geringer Anteil an spontan lytischen Zellen nachzuweisen, der durch die Neuinfektion weiterer Zellen die Aufrechterhaltung der latenten Infektion gewährleistet (Staskus et al., 1999).

Im Verlauf der lytischen Reaktivierung kommt es zur Expression viraler Gene, die Homologien zu zellulären Zytokinen oder Zytokinrezeptoren aufweisen und eine wichtige Rolle bei der KS-Tumorgenese durch parakrine Mechanismen spielen (Boshoff et al., 1997,

Bais et al., 1998, Whitby et al., 1995). Dabei handelt es sich um die KSHV-Gene vIL-6, vGPCR, vMIP-I und vMIPII (Moore et al., 1996a, Boshoff et al., 1997, Nicholas et al., 1997, Bais et al., 1998, West and Wood, 2003, Kirshner et al., 1999, Neipel et al., 1997, Russo et al., 1996a).

Sowohl der Nachweis replizierender Viren in KS-, PEL- und MCD-Erkrankungen als auch die Expression lytischer Proteine, die einen essentiellen Beitrag zur Manipulation zellulärer Signalwege leisten, verdeutlichen die wesentliche Rolle des lytischen Replikationsprozesses für die Pathogenese KSHV-assoziiierter Krankheiten. Das Verständnis für diese komplexen Zusammenhänge zwischen der viralen Genexpression und der Progression von KSHV-assoziierten Tumoren setzt eine Charakterisierung der Regulationsmechanismen dieser Gene voraus.

1.2.2 Die direkte und indirekte Aktivierung lytischer KSHV-Gene

Die Schlüsselrolle bei der Regulation des lytischen Reaktivierungsprozesses latent KSHV-infizierter Zellen spielt das KSHV-Gen ORF50/Rta (*replication and transcription activator*). ORF50/Rta wurde basierend auf Sequenzhomologien zu dem lytischen EBV-Gen BRLF1 und dem HVS-Gen ORF50 identifiziert (Sun et al., 1998). Da die Expression des ORF50-Gens keine *de novo* Proteinsynthese benötigt und das ORF50-Gen eines der ersten nachzuweisenden Gene nach Induktion des lytischen Zyklus ist, wurde ORF50/Rta als ein *immediate-early* Gen klassifiziert (Lukac et al., 1999, Sun et al., 1999, Zhu et al., 1999). In KSHV-infizierten PEL-Zellen führt die ektopische Expression von ORF50/Rta sowohl zur Induktion der lytischen Lebensphase als auch zur viralen Replikation und Produktion infektiöser Viruspartikel (Sun et al., 1998, Lukac et al., 1999, Lukac et al., 1998, Gradoville et al., 2000). Mit Hilfe eines rekombinanten KSHV, in welchem der ORF50/Rta-Locus im Genom deletiert war (BAC36delta50), konnte die absolut essentielle Funktion von ORF50/Rta bei dem lytischen Reaktivierungsprozess nachgewiesen werden. Der lytische Zyklus konnte auch nach TPA-Induktion in Abwesenheit von ORF50/Rta nicht aktiviert werden (Xu et al., 2005).

ORF50/Rta setzt sich aus 691 Aminosäuren zusammen, die in eine aminoternale DNA-Binde-, eine zentrale Dimerisierungs- und eine carboxyterminale Aktivierungsdomäne gegliedert sind. Die Aktivierungsdomäne beinhaltet vier Wiederholungselemente aus hydrophoben Aminosäuren, die Sequenzhomologien zu dem Herpes simplex Transaktivator-Protein VP19 aufweisen (Lukac et al., 1999). Für die ORF50/Rta-abhängige Aktivierung des lytischen Zyklus zeigte Bu et al. zudem die Notwendigkeit der Ausbildung eines Tetramers (Bu et al., 2007).

Für die meisten lytischen KSHV-Gene ist eine Aktivierung über ORF50/Rta beschrieben. Die transkriptionelle Regulation von ORF50/Rta-Zielgenen erfolgt über zwei Mechanismen: eine direkte sequenzspezifische Bindung oder die Rekrutierung von ORF50/Rta über zelluläre Transkriptionsfaktoren an die Promotorregionen der ORF50/Rta-Zielgene.

Die direkte Aktivierung über ORF50/Rta basiert auf der Bindung an die Zielpromotoren über spezifische Sequenzen, die als „*rta-responsive-elements*“ (RREs) bezeichnet werden. Die Regulation über RREs konnte erstmals für die KSHV-Gene PAN/nut-1, K12, K2, ORF57, ORF59 und K8 nachgewiesen werden (Chang et al., 2002, Deng et al., 2002, Lukac et al., 2001, Song et al., 2001). Dabei konnte für die Aktivierung der Promotoren von PAN/nut-1 und K12 die Notwendigkeit der direkten ORF50/Rta-DNA-Bindung unter Verwendung einer ORF50/Rta-Mutante, deren DNA-Bindedomäne deletiert wurde, gezeigt werden (Chang et al., 2005d). Die Sequenz des ORF50/Rta-DNA-Bindemotivs variiert stark zwischen den verschiedenen Promotoren. Mit Hilfe KSHV-genomweiter Studien konnten mittlerweile insgesamt 19 RREs im KSHV-Genom identifiziert werden (Matsumura et al., 2005, Wang et al., 2004b, Wang et al., 2006, Song et al., 2001, Lukac et al., 1999, Wang et al., 2003a, Song et al., 2003, Wong and Damania, 2006, Deng et al., 2002, Duan et al., 2001, Liang et al., 2002, Chen et al., 2009, Ziegelbauer et al., 2006). Durch den Vergleich der RREs aller bekannten ORF50/Rta-abhängig regulierten KSHV-Gene, definierte Chen et al. ein Rta-DNA-Bindemotiv mit der Basenabfolge „TTCCAGGAT(N)₀₋₁₆TTCCTGGGA“. Diese zwei unvollständig invertierten Wiederholungselemente des RRE sind in einigen Promotoren allerdings nur zur Hälfte vorhanden („TTCC“). Auch die Lücke zwischen den beiden Wiederholungselementen (N) variiert zwischen 0 und 16 verschiedenen Basen (Chen et al., 2009).

Für die indirekte Regulation viraler Gene durch ORF50/Rta über Protein-Protein-Wechselwirkungen ist eine Reihe von zellulären DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren beschrieben. Als erstes zeigte Wang et al. die Interaktion zwischen ORF50/Rta mit dem zellulären Protein MGC2663 (Wang et al., 2001). Mit Hilfe eines Hefe Two-Hybrid-Screens wurde das zelluläre sequenzspezifische DNA-Bindeprotein CSL/CBF1 (*C-promoting binding factor* (CBF1) im Menschen, *Suppressor of Hairless* in *Drosophila*, Lag-1 in *Caenorhabditis elegans*) als weiterer Interaktionspartner von ORF50/Rta identifiziert (Liang et al., 2002). Eine CBF1-abhängige ORF50/Rta-Aktivierung ist für mehrere KSHV-Gene in der Literatur beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.2). Auch für die zellulären Transkriptionsfaktoren Spi und Spi3 (*Specificity protein*), C/EBP- α (*CCAAT/enhancer binding protein*), SWI/SNF *chromatin*

remodeling complex (SWItch/*Sucrose non fermentable*), TRAP/mediator (*thyroid hormone receptor associated protein*), HDAC1 (*histone deacetylase*), CBP (*CREB binding protein*), Oct-1 (*Octamer binding protein-1*) und AP-1 (*activator protein-1*) wurde eine direkte Interaktion mit ORF50/Rta und die Rekrutierung an diverse Promotoren von ORF50/Rta-Zielgenen gezeigt (Chen et al., 2000, Ye et al., 2005, Zhang et al., 1998, Gwack et al., 2001, Gwack et al., 2003, Sakakibara et al., 2001, Pan et al., 2006, Wang et al., 2004a, Xie et al., 2008).

Für die Regulation der meisten viralen ORF50/Rta-Zielgene, wie z.B. K8 (Carroll et al., 2007), ist neben der Kombination aus dem direkten und indirekten Mechanismus auch die Kombination aus verschiedenen zellulären DNA-Bindeproteinen beschrieben, die erst die komplette Aktivierbarkeit der Promotoren ermöglicht.

1.3 Die Rolle von CBF1 während des Lebenszyklus von KSHV

1.3.1 CBF1, ein wichtiges Effektormolekül des Notch-Signalweges

Viele DNA-Tumroviren haben Strategien entwickelt, die Eingriffe in zelluläre Signalwege ermöglichen. KSHV kodiert für eine Vielzahl an Proteinen, die Homologien zu Zellzyklus-regulatorischen und Apoptose-modulierenden Proteinen oder zu zellulären Rezeptoren und ihren Liganden aufweisen und damit die Modulation der zellulären Signaltransduktion oder von Zellzyklus-Kontrollpunkten ermöglichen. Von besonderer Bedeutung ist der Notch-CBF1-Signalweg, der zur Regulation viraler und zellulärer Zielgene von KSHV benutzt wird. Dabei handelt es sich um einen Signalweg mit zahlreichen zellulären Funktionen, wie Proliferation, Apoptose, Adhäsion und Angiogenese (Jarviluoma and Ojala, 2006).

Bei Notch handelt es sich um einen Transmembranrezeptor, bestehend aus einer extra- und intrazellulären (Notch-IC) Domäne. Die intrazelluläre Domäne des Notch-Proteins setzt sich aus der RAM (*RBP-JKappa-associated molecule*)-Domäne, sieben konsekutiven Ankyrin-Wiederholungselementen, der carboxyterminalen Prolin-Glutamin-Serin-Threonin (PEST)-Domäne und zwei Kernlokalisierungssequenzen zusammen. Die extrazelluläre Domäne wird von Liganden, die ebenfalls als Transmembranproteine charakterisiert sind und zur Familie der Delta-, Serrate-, Lag-2 (DSL)-Proteinfamilie gehören, gebunden. Die Interaktion des Rezeptors mit einem Liganden führt zur proteolytischen Spaltung von Notch, woraufhin Notch-IC in den Zellkern wandert und über das DNA-Bindeprotein CBF1, das zur Familie der CSL-Transkriptionsfaktoren gehört, an die Promotoren seiner Zielgene rekrutiert wird (Kovall and Hendrickson, 2004, Schroeter et al., 1998, Parks et al., 2000).

CBF1, auch als RBP-Jkappa (*recombination signal-binding protein-j-kappa*) bekannt, stellt das wichtigste Effektormolekül des Notch-Signalweges dar (Nam et al., 2006, Chung et al., 1994). In Abwesenheit von Notch-IC rekrutiert CBF1 einen Korepressorkomplex, der sich aus den Proteinen SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid receptors*)/N-COR (*nuclear receptor corepressor*), CIR (*CBF1 interacting corepressor*) und SKIP (*ski interacting protein*) zusammensetzt. Die Verdrängung des Korepressorkomplexes von CBF1 erfolgt über die Bindung der RAM-Domäne von Notch-IC. Die Rekrutierung von Histondeacetyltransferasen (HATs) und des Koaktivatorproteins MAM (*mastermind*) führt zur Aktivierung und Expression der Zielgene des Notch-Signalweges (Pursglove and Mackay, 2005, Bray, 2006b, Kovall and Hendrickson, 2004).

Das CBF1-Protein setzt sich aus einer aminoterminalen RHR (*Rel homology region*)-Domäne (NTD), einer zentralen β -Trefoil-Domäne (BTD) und einer carboxyterminalen RHR-Domäne (CTD) zusammen. Die Bindung zwischen CBF1 und der DNA erfolgt über weite Bereiche von NTD und BTD an die Basenabfolge 5'-CGTGGGAA-3' auf der DNA (Tun et al., 1994). Der Kontakt bestimmter Aminosäurereste von CBF1 an das Phosphat-Ribose-Rückgrat der DNA ermöglicht die Positionierung spezifischer Aminosäuren von CBF1 an die DNA-Bindesequenz. Die β -Trefoil-Domäne von CBF1 bildet eine hydrophobe Tasche aus, welche als Bindungsstelle für die RAM-Domäne von Notch-IC benutzt wird. RAM bindet dabei in der BTD über die Aminosäuren Φ W Φ P (Φ Tryptophan Φ Prolin, Φ steht für eine hydrophobe Aminosäure), einem hoch konservierten Motiv, welches sowohl im murinen und humanen Notch als auch bei orthologen Proteinen diverser Spezies zu finden ist. Neben der RAM-CBF1-Bindung ist auch die Interaktion zwischen den Ankyrin-Elementen und CTD beschrieben, die durch die Assoziation mit dem Koaktivatorprotein MAM stabilisiert wird (Kovall and Hendrickson, 2004, Del Bianco et al., 2008, Nam et al., 2006, Nam et al., 2003).

Sowohl bei KSHV als auch bei EBV sind Proteine beschrieben, die eine direkte Interaktion mit dem zellulären Transkriptionsfaktor CBF1 aufweisen. In EBV ist die Bindung an CBF1 für die Proteine EBNA-2, -3A, -3B und -3C (*EBV nuclear antigene*), die eine essentielle Rolle bei der B-Zellimmortalisierung, Proliferation und Modulation zellulärer Signalwege infizierter B-Zellen einnehmen, gezeigt (Hayward et al., 2006). Bei KSHV wurde bisher für drei Proteine eine direkte CBF1-Interaktion nachgewiesen. Dabei handelt es sich um ORF50/Rta, ORF73/LANA und K10/vIRF4. Die Bindung des ORF50/Rta-CBF1-Komplexes an die DNA führt zur Aktivierung viraler Promotor-Reportergenkonstrukte viraler Gene (Liang et al., 2002). Die Interaktion zwischen CBF1 und dem latent exprimierten Protein ORF73/LANA auf dem ORF50/Rta-Promotor bewirkt eine aktive Repression (Lan et

al., 2005a). Das lytisch exprimierte KSHV-Protein K10/vIRF4 wurde von der Arbeitsgruppe von B. Kempkes als weiterer Interaktionspartner von CBF1 identifiziert (Heinzelmann et al., 2010). Die Auswirkungen dieser Interaktion auf die Regulation viraler Gene sind aber noch weitgehend unbekannt. Eine mögliche Rolle von K10/vIRF4 bei der Modulation zellulärer Gene zeichnete sich z.B. für das Gen EGR1 (*early growth response protein 1*) ab (Dissertation Katharina Heinzelmann, 2011).

Für die viralen Proteine EBNA2 und K10/vIRF4 ist, wie für das Notch-IC-Protein, die Bindung an CBF1 über das hoch konservierte $\Phi W\Phi P$ -Motiv in der BTD-Region von CBF1 beschrieben (Heinzelmann et al., 2010, Ling and Hayward, 1995, Kovall and Hendrickson, 2004). Die Bindung von ORF50/Rta an CBF1 erfolgt zwar über die hydrophobe Tasche, ein derartiges Motiv konnte aber nicht identifiziert werden (Liang et al., 2002). Die CBF1-ORF73/LANA-Interaktion wurde bisher nicht näher charakterisiert.

1.3.2 Die Rolle von CBF1 bei der Aktivierung von KSHV-Genen

Durch den Vergleich der CBF1-DNA-Bindemotive in den Promotorregionen der bekannten Notch-Zielgene, stellte Persson et al. eine Gruppe von 11 funktionellen Varianten möglicher CBF1-DNA-Bindesequenzen auf. Basierend auf diesen DNA-Sequenzen wurden für das KSHV-Genom des M-Typs insgesamt 263 und für das KSHV-Genom des P-Typs 259 mögliche CBF1-Bindungsstellen identifiziert, von denen über die Hälfte in der Nähe von Transkriptionsstartpunkten der ORFs lokalisiert waren (Persson and Wilson, 2010) (Tab. 1).

Der Vergleich aller bisher bekannten funktionellen CBF1-Bindungsstellen in den Promotorbereichen von KSHV-Genen zeigte, dass in den meisten Fällen ein Cytosin an Position 3 stromabwärts der CBF1-DNA-Bindesequenz vorliegt. Von allen potentiellen CBF1-Bindungsstellen im KSHV-Genom ist bei 47 Motiven des M-Typs und bei 44 Motiven des P-Typs ein Cytosin an dieser Position konserviert (Persson and Wilson, 2010).

| CBF1-Bindungsstelle | Sequenz | Anzahl im KSHV-Genom | |
|---------------------|---------|----------------------|-------|
| | | M-Typ | P-Typ |
| i | GTGGGAA | 45 | 43 |
| ii | GTGaGAA | 19 | 19 |
| iii | GcGGGAA | 26 | 26 |
| iv | cTGGGAA | 25 | 26 |
| v | cTGaGAA | 17 | 17 |
| vi | cTGaGAt | 13 | 13 |
| vii | cTGGGAg | 25 | 25 |
| viii | aTGGGAA | 17 | 16 |
| ix | aTGGGAg | 25 | 24 |
| x | tGGGAA | 26 | 25 |
| xi | tGGGAg | 25 | 25 |

Tab. 1: Vergleich der potentiellen CBF1-Bindungsstellen im KSHV-Genom des M- und P-Typs. Durch den Vergleich der CBF1-DNA-Bindemotive in den Promotorregionen der bekannten Notch-Zielgene, stellte Persson et al. eine Gruppe von 11 funktionellen Varianten (i-xi) möglicher CBF1-DNA-Bindesequenzen auf. Die Untersuchung des KSHV-Genoms auf diese DNA-Sequenzen ergab für den M-Typ insgesamt 263 und für den P-Typ insgesamt 259 mögliche CBF1-Bindungsstellen im KSHV-Genom (modifiziert nach Persson and Wilson, 2010).

Für eine Reihe dieser KSHV-Gene ist eine direkte CBF1-abhängige Regulation in der Literatur bereits beschrieben (Tab. 2). Bei den meisten ORFs handelt es sich um lytisch exprimierte Gene. Dabei sind unter ihnen neben dem Transkriptionsaktivator ORF50/Rta auch Strukturproteine oder Proteine vertreten, die eine essentielle Rolle sowohl bei der viralen Replikation als auch bei der Modulation zellulärer Signalwege einnehmen. Es konnte aber auch für das latente Transkript LTi (*latency transcript cluster*), das für die Gene ORF71, ORF72 und ORF73 kodiert, eine CBF1-abhängige ORF50/Rta-Regulation nachgewiesen werden. Für die meisten der hier aufgelisteten KSHV-Gene sind neben der CBF1-abhängigen Aktivierung über ORF50/Rta auch noch direkte oder weitere indirekte Regulationsmechanismen über zelluläre DNA-Bindeproteine bekannt.

| KSHV-Gene | Funktion | Literatur |
|--|--|--|
| Virale Replikation und Nukleotid Metabolismus | | |
| ORF6 | ssDNA-Bindeprotein | Liang and Ganem, 2004 |
| K8/K-bZIP | Ory-Lyt-Bindeprotein | Wang et al., 2006 |
| ORF57/Mta | Postranskriptioneller Regulator | Chang et al., 2005d, Liang et al., 2002 |
| ORF70 | Thymidylat-Synthase | Persson and Wilson, 2010 |
| ORF59 | DNA-Polymerase-Prozessivität-Faktor | Liu et al., 2008 |
| ORF61 | Ribonukleotid-Reduktase | Wang et al., 2010 |
| ORF21 ^b | Thymidin-Kinase | Carroll et al., 2006 |
| Strukturproteine | | |
| ORF8/gB | Glykoprotein B | Ziegelbauer et al., 2006 |
| ORF19 | Tegumentprotein | Persson and Wilson, 2010 |
| ORF47 | Glykoprotein L | Chang et al., 2010, Persson et al., 2010 |
| Immunmodulation | | |
| K5/vMIR2 ^b | <i>viral modulator of immune recognition</i> | Chang et al., 2005b |
| K6/vMIP-I | <i>viral makrophage inflammatory protein-II</i> | Chang et al., 2005d |
| K2/vIL-6 | <i>viral Interleukin-6</i> | Chang et al., 2005b |
| Zellteilung und Apoptose | | |
| LTi (<i>latency transcript cluster</i>) ^c | ORF71/ <i>Flice inhibitory protein</i> ORF72/ <i>Zyklin-D-Homolog</i> ORF73/ <i>Latency associated nuclear antigen</i> | Lan et al., 2005a, Staudt and Dittmer, 2006 |
| K14/ORF74 (bicistronischer Promotor) ^a | K14/ <i>OX-2-Glykoprotein Homolog</i> ORF74/ <i>viral G-protein coupled receptor</i> | Liang and Ganem, 2004 |
| Transaktivator des lytischen Zyklus | | |
| ORF50/Rta | <i>replication and transcription activator</i> | Liang and Ganem, 2003 |
| unbekannt | | |
| nut-1/PAN | - | Liang et al., 2002 |

Tab. 2: Für die hier aufgelisteten KSHV-Gene ist die CBF1-abhängige Regulation in der Literatur beschrieben. Die Unterteilung der CBF1-abhängig regulierten KSHV-Gene nach ihrer Funktion erfolgte wie beschrieben bei Jenner und Boshoff (Jenner and Boshoff, 2002).

a Das bicistronische K14/ORF74 Transkript kodiert für die Gene ORF74 und K14.

b Für diese Gene wurde eine CBF1-Bindung in den Promotorbereichen nachgewiesen. Die Aktivierung durch ORF50/Rta ist bisher noch nicht beschrieben.

c Das *latency transcript cluster* kodiert für die latenten Gene ORF71, ORF72 und ORF73.

In der Promotorregion des viralen Transkriptionsfaktors ORF50/Rta sind vier potentielle CBF1-Bindemotive lokalisiert. Die Auswirkungen von CBF1 auf die Aktivierung von ORF50/Rta sind nicht eindeutig geklärt. So war die Aktivierbarkeit eines ORF50/Rta-Promotor-Reportergenkonstruktes in CBF1-negativen murinen Fibroblasten im Vergleich zu den parental Wildtyp-Linien stark beeinträchtigt (Liang et al., 2002). In Studien einer anderen Arbeitsgruppe hatte die Deletion dieser vier CBF1-Bindemotive im ORF50/Rta-Promotor aber keinen Einfluss auf die Autoregulation. Nach transienter Überexpression des latenten Gens ORF73/LANA, für welches die direkte Interaktion mit CBF1 beschrieben ist, konnte eine aktive Repression des ORF50/Rta-Promotors in Abhängigkeit von CBF1 beobachtet werden (Lan et al., 2005a). Der Regulationsmechanismus des ORF50/Rta-Promotors stellt somit das erste und bisher einzige Beispiel für eine CBF1-vermittelte Repression dar. Diese Untersuchungen zeigen, dass abhängig vom Transkriptionsfaktor die CBF1-abhängige Regulation sowohl aktivierend als auch hemmend sein kann.

Der genaue Mechanismus, wie ORF50/Rta und CBF1 an die Zielpromotoren im KSHV-Genom binden, ist noch nicht im Detail untersucht. Carrol et al. zeigte, dass CBF1 nicht konstitutiv an den Promotor des KSHV-Gens ORF57 gebunden ist, sondern erst im Komplex mit ORF50/Rta an die DNA rekrutiert wird. Diese Beobachtung beschreibt einen neuen Mechanismus für den CBF1-abhängigen Aktivierungsprozess lytischer Gene. Bisher konnte dies aber nur für die ORF50/Rta-vermittelte Aktivierung des viralen ORF57-Promotors nachgewiesen werden (Carroll et al., 2006).

Die Identifizierung der hier beschriebenen CBF1-abhängig regulierten KSHV-Gene basiert ausschließlich auf transienten Promotor-Reporter- oder Gel-Retardationsstudien. Die Auswirkungen von CBF1 auf die transkriptionelle Regulation dieser Gene in KSHV-positiven latenten oder lytisch reaktivierten Zellen wurden bisher noch nicht untersucht.

1.3.3 Der Einfluss von CBF1 und Notch-IC auf den Lebenszyklus von KSHV

Für die herpesviralen Proteine EBNA2, ORF50/Rta und ORF73/LANA ist die Nachahmung des zellulären Notch-Signalweges durch die Bindung in den Promotorbereichen ihrer

Zielgene über CBF1 beschrieben. ORF50/Rta ist für die Expression lytischer Gene und die virale Replikation, ORF73/LANA für die Etablierung und Aufrechterhaltung der latenten Lebensphase KSHV-infizierter Zellen absolut essentiell. Für die Transformation und Proliferation primärer B-Zellen nach Infektion mit EBV ist das Protein EBNA2 notwendig. Bei der Regulation und Modulation dieser verschiedenen Prozesse innerhalb des viralen Lebenszyklus nimmt die CBF1-abhängige transkriptionelle Regulation zellulärer oder viraler Gene eine wichtige Rolle ein.

Eine CBF1-abhängige Aktivierung ist für eine Reihe von viralen ORF50/Rta-Zielgenen beschrieben. Da man für CBF1 in Abwesenheit von Notch-IC eine Funktion als Repressor nachweisen konnte, wurde anfänglich die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass der reprimierende Effekt von CBF1 durch die Bindung in den Promotorbereichen lytischer Gene die Etablierung und Aufrechterhaltung der latenten Lebensphase begünstigt. Nach Infektion von murinen CBF1-negativen Fibroblasten mit KSHV konnte jedoch nach vier Tagen durch die Expression des latenten Markerproteins ORF73/LANA die Etablierung der Latenz beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war in den KSHV-infizierten CBF1-negativen Fibroblasten weder die Replikation des viralen Genoms noch die Produktion infektiöser Partikel nach Überexpression von ORF50/Rta nachzuweisen. Die Anwesenheit von CBF1 ist somit für die ORF50/Rta-vermittelte Aktivierung lytischer Gene und die Progression des lytischen Zyklus von KSHV absolut essentiell (Liang and Ganem, 2003) (Abb. 2F).

Von einer weiteren Arbeitsgruppe wurde die aktive Repression des ORF50/Rta-Promotors nach Bindung des ORF73-CBF1-Komplexes gezeigt (Lan et al., 2004, Lan et al., 2005a). In darauffolgenden Studien wurde auch eine CBF1-abhängige Aktivierung des ORF73-Promotors durch ORF50/Rta beschrieben (Lan et al., 2005c). Nach der Infektion von Zellen, isoliert aus peripherem Blut mit einem rekombinanten KSHV, in welchem die CBF1-Bindestellen des ORF73/LANA-Promotors deletiert waren, konnte sowohl eine reduzierte Expression von ORF73/LANA als auch eine erhöhte ORF50/Rta-Expression und eine gesteigerte Produktion von Viruspartikeln beobachtet werden (Lu et al., 2011). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen zeigte sich nach der Infektion CBF1-negativer muriner Fibroblasten mit KSHV im Vergleich zu der parentalen CBF1-positiven Fibroblasten-Zelllinie eine verzögerte Etablierung der Latenz. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das lytische Protein ORF50/Rta und das latente Protein ORF73/LANA über die CBF1-vermittelte Bindung an dem jeweiligen Promotor in einem Rückkopplungsmechanismus eine Balance zwischen lytischer und latenter Phase bewirken (Lan et al., 2005c) (Abb. 2A und B).

EBNA2 und ORF50/Rta regulieren zelluläre Gene wie z.B. CD21, welche z.T. dem Repertoire der Notch-IC Zielgene angehören. Da sich das Repertoire an Zielgenen nicht komplett überschneidet, wird ein ähnlicher, aber nicht gleicher Notch-IC-vermittelter Modulationsmechanismus für die herpesviralen Proteine vorgeschlagen (Zimber-Strobl and Strobl, 2001, Strobl et al., 2000, Jochner et al., 1996, Kaiser et al., 1999, Gordadze et al., 2001, Chang et al., 2005b, Chang et al., 2005c).

Sowohl in KS-Endothelzellen als auch in den PEL-Zelllinien BCBL-1, BC-3 und JSC-1 ist ein konstitutiv aktiver Notch-Signalweg beschrieben (Curry et al., 2005, Chang, 2006, Lan et al., 2006). Die Behandlung von KS-Zellen mit einem Notch-Inhibitor erhöhte die Apoptoserate dieser Zellen (Curry et al., 2005). Diese Beobachtungen, die hohe Frequenz an potentiellen CBF1-Bindungsstellen in den Promotorbereichen und die CBF1-abhängige Aktivierung einiger KSHV-Gene veranlasste verschiedene Gruppen den Einfluss von Notch-IC auf die Regulation dieser viralen Gene zu untersuchen.

Chang et al. zeigte nach Überexpression von Notch-IC in der PEL-Zelllinie BCBL-1 die Induktion einer Reihe von KSHV-Genen, die eine Rolle bei Zellwachstum und Immunmodulation spielen. Beispielsweise führte die Aktivierung der KSHV-Gene K3 und K5 durch Notch-IC zur Repression der Oberflächenmoleküle MHC-I (*major histocompatibility complex class I*) und CD54 (Chang et al., 2005b, Chang, 2006). Die Modulation von MHC-I und CD54, die eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen und natürlichen T-Killerzellen einnehmen, schützt dabei die KSHV-infizierten Zellen vor der zellulären Immunantwort (Ishido et al., 2000, Tomescu et al., 2003). Damit konnte gezeigt werden, dass Notch-IC nicht die Aktivierung des kompletten Repertoires an lytischen Genen bewirkt, sondern ein einzigartiges Expressionsmuster von KSHV-Genen mit wachstumsfördernden und immunmodulierenden Fähigkeiten ermöglicht, welches die Anpassung der latenten oder lytischen Lebensphase von KSHV in den Wirtszellen begünstigt (Chang et al., 2005b, Chang, 2006) (Abb. 2C).

Lan et al. wies jedoch sowohl die direkte Bindung des Notch-IC-CBF1-Komplexes in dem Promotorbereich von ORF50/Rta als auch die Aktivierung eines ORF50/Rta-Promotor-Reportergenkonstruktes durch Notch-IC nach (Abb. 2D). Die transiente Überexpression von Notch-IC in der PEL-Zelllinie BCBL-1 führte zur Akkumulation des ORF50/Rta-Transkriptes und zur Produktion von infektiösen Viren. Sowohl die Notch-IC-regulierte Aktivierung von ORF50/Rta als auch die Virusproduktion wurde nach transienter Überexpression von ORF73/LANA unterdrückt. Basierend auf diesen Beobachtungen wird ein CBF1-vermittelter Antagonismus zwischen ORF73/LANA und Notch-IC um den ORF50/Rta-Promotor

vorgeschlagen, wodurch die Aufrechterhaltung der Latenz auch in Anwesenheit eines erhöhten Notch-IC Expressionslevels in den KSHV-infizierten Zellen ermöglicht wird (Lan et al., 2006) (Abb. 2B).

Bei Betrachtung der verschiedenen Möglichkeiten der CBF1-vermittelten Regulation viraler Gene, die einen wesentlichen Beitrag zu der Etablierung der latenten oder lytischen Lebensphase leisten, wird die Bedeutung dieses zellulären Transkriptionsfaktors offensichtlich (Abb. 2).

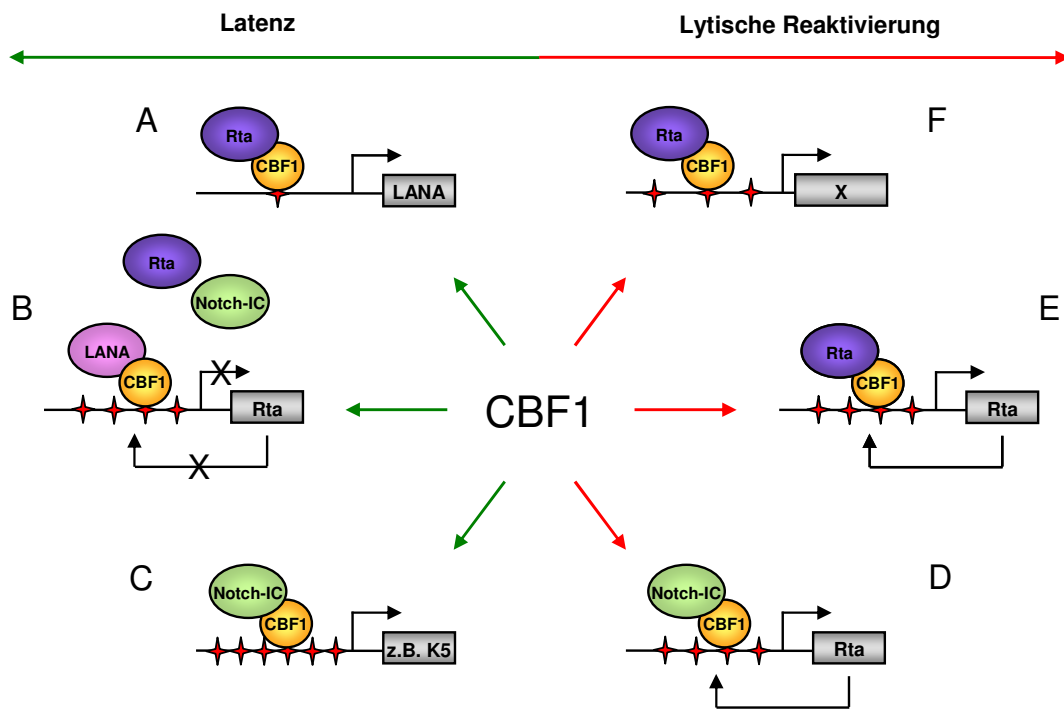


Abb. 2: Die Rolle von CBF1 im Verlauf des Lebenszyklus von KSHV. Die von (A) bis (C) dargestellten Regulationsmechanismen fördern die Etablierung des latenten Zustandes. In (D) bis (F) wird die CBF1-vermittelte Aktivierung viraler Gene, die für die Progression des lytischen Zyklus notwendig sind, repräsentiert. (A) Nach primärer Infektion mit KSHV kommt es zur Induktion von ORF73/LANA durch ORF50/Rta, das über CBF1 an den ORF73/LANA-Promotor bindet. (B) Das latente Markerprotein ORF73/LANA bindet über CBF1 an den ORF50/Rta-Promotor und bewirkt die aktive Repression des Promotors (Lan et al., 2004, Lan et al., 2005a). Dabei wird sowohl die ORF50/Rta-Autoregulation als auch die Notch-IC-regulierte Aktivierung von ORF50/Rta unterbunden. Die Aufrechterhaltung der Latenz wird somit auch in Anwesenheit eines erhöhten Notch-IC-Expressionslevels in den KSHV-infizierten PEL-Zellen ermöglicht (Lan et al., 2006). (C) Chang et al. zeigte nach Überexpression von Notch-IC in der PEL-Zelllinie BCBL-1 die Induktion der KSHV-Gene K5 und K3, die der Expression von MHC-I und CD54 entgegenwirken und dadurch die Stimulierung von cytotoxischen T-Zellen und natürlichen T-Killerzellen unterdrücken (Chang et al., 2005b, Chang, 2006). (D) Die Bindung des Notch-IC-CBF1-Komplexes an den ORF50/Rta-Promotor führt zur Aktivierung von ORF50/Rta. Die Überexpression von Notch-IC in der PEL-Zelllinie BCBL-1 fördert die Akkumulation des ORF50/Rta-Transkriptes und die Virusproduktion (Lan et al., 2006). (E) Die Stimulierung KSHV-positiver Zellen mit chemischen Substanzen, wie z.B. TPA oder NaB, führt zur Aktivierung von ORF50/Rta, wodurch der lytische Lebenszyklus induziert wird. (F) ORF50/Rta induziert die Expressionskaskade lytischer Gene, die unter anderem für die virale Replikation und Produktion infektiöser Viruspartikel notwendig sind. Der Buchstabe „x“ steht für ein beliebiges lytisches Gen. Die roten Sterne repräsentieren die CBF1-Bindungsstellen in den Promotorbereichen von ORF73/LANA, ORF50/Rta, K5, K3 oder ein beliebiges lytisches Gen.

1.4 Das rekombinante KSHV rKSHV.219-System

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von CBF1 bei der transkriptionellen Regulation von KSHV-Genen der lytischen Lebensphase in Zellen mit B-Zell-Charakter zu untersuchen. Für die Infektion von B-Zellen sollte ein rekombinantes KSHV-System eingesetzt werden, das die Untersuchung der Latenz und der lytischen Lebensphase von KSHV gewährleistet. Mit Hilfe von Selektionsmitteln sollte die Etablierung stabil KSHV-positiver Kulturen ermöglicht werden. Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion war zudem die Herstellung von Virusüberständen mit hohen Titern.

Für die Herstellung der Virusüberstände wurde die Affen-Nierenepithel-Zelllinie Vero verwendet, die stabil mit dem von J. Vieira und M. O'Hearn generierten rekombinanten KSHV-Stamm rKSHV.219 infiziert ist und hohe Virustiter produziert. Diese Linie wird im Folgenden als VK219-Zelllinie bezeichnet. Das rekombinante KSHV rKSHV.219, das auf dem KSHV-Genom der KSHV-positiven B-Zelllinie JSC-1 (Typ P) basiert, kodiert für eine GFP (*green fluorescence protein*)-RFP (*red fluorescence protein*) -Puro (Puromycin)-Kassette, die in dem nicht-kodierenden Bereich zwischen den KSHV-Genen K9 und ORF57 inseriert wurde. Die Expression von GFP, die über dem zellulären Promotor des humanen Elongationsfaktor-1 α (EF-1 α)-Gens kontrolliert wird, erlaubt die schnelle Beurteilung einer erfolgreichen KSHV-Infektion durch den Nachweis der GFP-Expression mit Hilfe von FACS-Analysen oder Fluoreszenzmikroskopie. Das RFP-Gen steht unter der Kontrolle des KSHV-PAN-Promotors. Die Transkription von PAN wird schon in der frühen Phase der lytischen Reaktivierung direkt durch ORF50/Rta reguliert. Der Nachweis der RFP-Expression nach Induktion des lytischen Zyklus mit chemischen Reagenzien eignet sich somit zur Quantifizierung des Anteils von lytisch reaktivierten GFP-RFP-doppelt-positiven Zellen in den etablierten Zelllinien. Die Puromycinresistenz wird durch das Puromycin N-acetyltransferase Gen (PAC) vermittelt, welches über den konstitutiv aktiven Rous-Sarkom-Virus (RSV)-Promotor reguliert wird, und ermöglicht die Selektion einer GFP-positiven, KSHV-positiven Zellpopulation (Vieira and O'Hearn, 2004).

Zur Produktion von Virusüberständen wurden die VK219-Zellen mit NaB und TPA induziert und die Kulturüberstände nach drei Tagen geerntet. Die Bestimmung der infektiösen Einheiten pro ml Virusüberstand (*infection units*, IU) erfolgte durch die Infektion von HEK293-Zellen mit dem VK219-Überstand. Nach drei Tagen wurde die Anzahl der GFP-positiven Zellen im Mikroskop ausgezählt. Die Titer der VK219-Virusüberstände lagen in der Regel bei 10^5 - 10^6 IU/ ml. Das rekombinante rKSHV.219-System ermöglichte es, Virusüber-

stände mit hohen Titern herzustellen und diese auch in definierten Mengen für die Infektion von B-Zellen einzusetzen (Abb. 3).

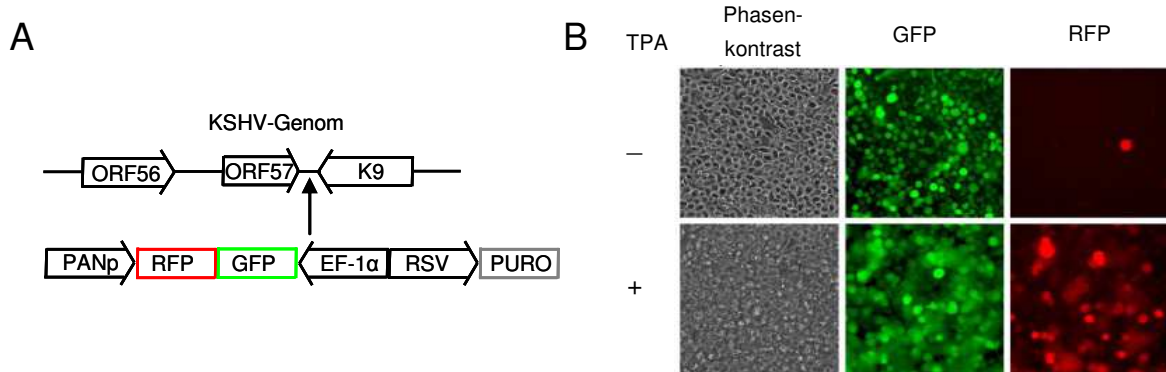


Abb. 3: Das rekombinante KSHV rKSHV.219-System von J. Vieira und M. O’Hearn. (A) Die GFP-RFP-Puromycin-Kassette wurde in dem nicht-kodierenden Bereich zwischen den Genen K9 und ORF57 des KSHV-Genoms der KSHV-positiven B-Zelllinie JSC-1 eingefügt. (B) Nach chemischer Reaktivierung mit TPA der rKSHV.219-positiven JSC-1-Zellen wurde der infektiöse Virusüberstand zur Infektion der Nierenepithel-Zelllinie Vero eingesetzt. Diese Linie eignet sich hervorragend zur Herstellung von Virusüberständen mit hohen Titern. Dargestellt ist die rKSHV.219-positive JSC-1-Zelllinie nach Induktion mit 20 ng/ ml TPA für 24 Stunden (Vieira and O’Hearn, 2004).

1.5 Zielsetzung

Der zelluläre Transkriptionsfaktor CBF1, ein wichtiges Effektormolekül des Notch-Signalweges, nimmt eine essentielle Rolle sowohl bei der Etablierung der latenten Lebensphase als auch bei der lytischen Replikation KSHV-infizierter Zellen ein. Diese Studien basierten bisher auf der Analyse des CBF1-Effektes in KSHV-infizierten CBF1-negativen murinen Fibroblasten-Zellen oder auf Promotor-Reporterexperimenten nach transienter Transfektion. Diese Zellen entsprechen jedoch nicht dem natürlichen Wirtsreservoir von KSHV und stellen somit keine biologisch relevante Situation dar. Zudem wurde die CBF1-abhängige Regulation viraler Gene bisher nicht im Kontext des viralen Genoms untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig der Beitrag von CBF1 zur Reaktivierung KSHV-infizierter humaner B-Zellen charakterisiert, da KSHV-infizierte B-Zellen ein wichtiges Reservoir im latent infizierten Wirt darstellen und die Zellen der KSHV-assoziierten Erkrankungen PEL und MCD einen B-Zell-Charakter aufweisen.

Ein wesentlicher Bestandteil meiner Arbeit war es, geeignete KSHV-positive Zellsysteme zu generieren, die es ermöglichten, den Phänotyp einer KSHV-infizierten CBF1-negativen B-Zelllinie im direkten Vergleich zu einer infizierten CBF1-positiven B-Zelllinie

zu untersuchen. Dafür wurde die Burkitt-Lymphom B-Zelllinie DG75-wt und die im Labor bereits etablierte parentale DG75-CBF1-ko-Linie SM224.9 verwendet. Mit Hilfe des rKSHV.219-Systems gelang es zum ersten Mal KSHV-infizierte CBF1-positive und -negative B-Zelllinien zu generieren. In diesen Linien wurde anschließend der Einfluss von CBF1 auf die Reaktivierung und die Produktion infektiöser Viren charakterisiert.

Für eine Reihe von KSHV-Genen ist die Regulation durch den viralen Transaktivator ORF50/Rta in Abhängigkeit von CBF1 beschrieben. Der Einfluss von CBF1 auf die transkriptionelle Regulation und endogene Expression dieser Gene in KSHV-positiven latenten oder lytisch reaktivierten Zellen wurde aber bislang nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines KSHV-Arrays die Genexpressionsprofile CBF1-negativer und -positiver KSHV-infizierter B-Zellen zu vergleichen und so weitere potentielle CBF1-abhängig regulierte KSHV-Gene zu identifizieren. Um den Beitrag von CBF1 an der Regulation ausgewählter KSHV-Gene zu charakterisieren, wurde anschließend in Promotor-Reportergen- und Gel-Retardationsexperimenten sowohl die direkte CBF1-Bindung an den Promotor als auch eine CBF1-vermittelte Aktivierung überprüft. Die Funktion der identifizierten Kandidaten sollte neue Erkenntnisse über die Auswirkung von CBF1 auf die verschiedenen Lebensphasen KSHV-infizierter B-Zellen und über dessen Beitrag zur viralen Pathogenese ermöglichen.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

| | |
|-------------------------------|---|
| <i>E. coli</i> DH5 α : | F ⁻ , <i>lacI</i> ⁻ , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>), U169, F80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> ; Invitrogen, UK; |
| <i>E. coli</i> DB3.1 | F ⁻ , <i>gyrA462</i> , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , Δ (<i>sr1-recA</i>), <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> (rB ⁻ , mB ⁻), <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> (SmR), <i>xyl5</i> , Δ <i>leu</i> , <i>mtl-1</i> ; Invitrogen, UK |

2.2 Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung |
|-----------|---|
| DG75 | humane EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Ben-Bassat et al., 1977) |
| HEK293 | humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, transformiert durch DNA-Fragmente des Adenovirus Typ 5 (Graham et al., 1977) |
| Raji | humane EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Pulvertaft, 1964) |
| BC-1 | KSHV-positive primäre Effusionslymphom-Zelllinie (Renne et al., 1996a) |
| BCBL-1 | KSHV-positive primäre Effusionslymphom-Zelllinie (Cesarman et al., 1995) |
| Vero | Nierenzellen von Grünen Meerkatzen (<i>African Green Monkey</i> , <i>Chlorocebus</i>) (Yasumura and Kawakita, 1969) |
| VK219 | Vero-stabil infiziert mit rekombinantem KSHV rKSHV.219 (Vieira and O'Hearn, 2004) |

Tab. 3: Allgemeine Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung |
|-----------|---|
| SM224.9 | Humane EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie DG75 mit vollständiger Deletion von CBF1 (Maier et al., 2005) |
| SM295 | DG75-stabil transfiziert mit ER/EBNA2 |
| UH39.3 | HEK293-stabil transfiziert mit EBVwt (p2089) |

Tab. 4: In der AG Kempkes hergestellte Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung |
|-----------|-------------------------------------|
| BS532.2a | DG75-stabil infiziert mit rKSHV.219 |
| BS648.2d | |
| BS854.2a | |
| BS854.2b | |
| BS854.2c | |
| BS854.2d | |
| BS854.2e | |
| BS1175.2a | |
| BS1175.2b | |
| BS1175.2c | |
| BS1193.2b | |
| BS1193.2c | |

| | |
|-----------|--|
| BS1193.2d | SM224.9-stabil infiziert mit rKSHV.219 |
| BS1193.2e | |
| BS532.1a | |
| BS648.1e | |
| BS648.1d | |
| BS854.1c | |
| BS854.1d | |
| BS854.1e | |
| BS1175.1a | |
| BS1175.1b | |
| BS1175.1c | |
| BS1193.1c | |
| BS1193.1d | |
| BS1193.1e | |
| BS1193.1f | |

Tab. 5: In dieser Arbeit hergestellte Zelllinien

2.3 Oligonukleotide/ Primer

Alle hier aufgeführten Oligonukleotide wurden bei Metabion GmbH, Deutschland synthetisiert. Die Primer wurden mit Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) ausgewählt.

| Gen | Primer | Sequenz (5'-3') | Annealing-temp. [°C] | Produktgröße [bp] |
|----------------|------------|----------------------------------|----------------------|-------------------|
| beta-Aktin | BS1269for | TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA | 63 | 295 |
| | BS1269rev | CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG | | |
| GAPDH | BS688for | GAAGGTGAAGGTCGGAGTC | 63 | 225 |
| | BS688rev | GAAGATGGTGATGGGATTTC | | |
| 18S | GS43.1 for | CGGCTACCACATCCAAGGAA | 63 | 187 |
| | GS43.1 rev | GCTGGAATTACCGCGGCT | | |
| ORF50/Rta | BS554for | CTGACGTCATGTCACCCTTG | 63 | 266 |
| | BS554rev | TCTCTACACGGCACACCTTG | | |
| ORF50-Promotor | BS729for | GAATGCCACAATCTGTGCCCTCCAGCTCTCAC | 63 | 285 |
| | BS729rev | GTGGCTGCCTGGACAGTATTCTCACAACAGAC | | |
| ORF57/Mta | BS551for | AAGCGTACTGGGTGAGTTGC | 63 | 287 |
| | BS551rev | TACTAAGCGGTTTCCCATCG | | |
| K10/vIRF4 | BS556for | TGTGTATGGGAACCTTCGTG | 63 | 267 |
| | BS556rev | TTACCAAACCACCAGCCTTC | | |
| K14 | BS613for | ACGCCTCTTCTACCCAGGAG | 63 | 230 |
| | BS613rev | TAGGCCACCAGAGTAATGG | | |
| ORF74 | BS617for | GCATGTCAGAACCGTGTGTCAG | 63 | 212 |
| | BS617rev | GTCGCCTTAGCAGAGTGTCC | | |

| | | | | |
|-----------------|-------------|-------------------------|----|-----|
| ORF59 | BS623for | ACAGTCACCGTTTGGTCCTC | 63 | 273 |
| | BS623rev | TGTA CT CGACGCTGGCATAG | | |
| K1 | BS1002for | TGATTTCAACGCCTTACACG | 63 | 316 |
| | BS1002rev | GTTTCATTTTCGTCCTTGG | | |
| ORF4 | BS1003for | AAATCCTGGACGTTTGCATC | 63 | 360 |
| | BS1003rev | AAGGCGTAGCATCATCTTGG | | |
| K10.5/ vIRF3 | BS687for | TCCTCAGATTCCGCGCC | 63 | 268 |
| | BS687rev | TCACCTACACAGTGGGTCATCAC | | |
| ORF6 | BS1004for | AGGACGTTAGCACGGTCATC | 63 | 293 |
| | BS1004rev | TGCGTGCCAACTTCTAGTG | | |
| ORF8 | BS1005for | CGCCATCACCAACAAGTATG | 63 | 338 |
| | BS1005rev | CACCCAGTGACGTGACAAAG | | |
| ORF9 | BS1006for | TTCCACCCACCTACTTCCAG | 63 | 267 |
| | BS1006rev | AAACGTTACGCAGACACTG | | |
| ORF62 | BS1007for | CCTTTATCATGGCCACAACC | 63 | 296 |
| | BS1007rev | AGGTCCAATGGTCCAGAGTG | | |
| ORF65 | BS1008for | CGTGGATGAGAGGGTTGTG | 63 | 347 |
| | BS1008rev | ATATGTCGCAGGCCGAATAC | | |
| ORF29a | BS1009for | GGGTGCGGTGTAGATTATGG | 63 | 210 |
| | BS1009rev | CCAAGGAGACACGGAAAGAC | | |
| K5 | BS1011for | GTTATCTTCGTTTCGCGGTTG | 63 | 338 |
| | BS1011rev | AGTGGCGTAGTCGCCTTAAC | | |
| nut-1/ PAN | BS1012for | CGGGTTATTGCATTGGATTC | 63 | 373 |
| | BS1012rev | CAAAGTGGCCCGATTTACAC | | |
| K8 | BS1013for | ATTTGCAACAGCTTCCAAC | 63 | 366 |
| | BS1013rev | TACCTGCTGCAGCTGTCTTG | | |
| ORF73/ LANA | BS1035for | TTGGATCTCGTCTTCCATCC | 63 | 242 |
| | BS1035.1rev | ACCAGACGATGACCCACAAC | | |
| K2/vIL6 | BS1034for | TCGTTGATGGCTGGTAGTTTC | 63 | 201 |
| | BS1034rev | CGGTTCACTGCTGGTATCTG | | |
| ORF37/ SOX | BS1033for | CTTCAAAGCCAACCTCTTCG | 63 | 319 |
| | BS1033rev | GTCCTTCGCACTTCTTGACC | | |

Tab. 6: Primer zur Quantifizierung von Transkripten mittels *real-time* PCR

| Gen | Primer | Sequenz (5'-3') |
|-------------|-----------|----------------------------|
| ORF65-1-hp | BS1221for | CAGTCGGGCGTCCCAAGGCAAGGCA |
| | BS1221rev | TGCCTTGCCTTGGGACGCCCGACTG |
| ORF65-2-hp | BS1222for | AACACGTTGGTGGGAGGAAAATTGA |
| | BS1222rev | TCAATTTTCCTCCCAACACGTGTT |
| ORF65-3-hp | BS1223for | CTTGCAGAGTTGGGCACAGGCCTTG |
| | BS1223rev | CAAGGCCTGTGCCCAACTCTGCAAG |
| ORF65-4-hp | BS1224for | CAGGTATTTTGCCCATACGTGGCGCG |
| | BS1224rev | CGCGCCACGTATGGGCAAAATACCTG |
| ORF65-5-hp | BS1225for | TCGGCGGCTGGGCACGGGACAGCG |
| | BS1225rev | CGCTGTCCCGTGCCAGGCCGCCGA |
| ORF29a-1-hp | BS1227for | ACATGTACGCTCCCAAACGGGATCT |
| | BS1227rev | AGATCCCGTTTGGGAGCGTACATGT |

| | | |
|----------------|-------------|---------------------------|
| ORF29a-2-hp | BS1228for | CACTTACATTTCCCACACCTGCCTC |
| | BS1228rev | GAGGCAGGTGTGGGAAATGTAAGTG |
| ORF29a-3-hp | BS1229for | TATCTAATCATCCCATCGTATGACA |
| | BS1229rev | TGTCATACGATGGGATGATTAGATA |
| K10/vIRF-1-hp | BS1253for | GTCAAGAGGATGGGGATTTTATAGC |
| | BS1253rev | GCTATAAAATCCCCATCCTCTTGAC |
| K10/vIRF-2-hp | BS1254for | CTAGTCCCCTTGGGAGAGAGGACAG |
| | BS1254rev | CTGTCTCTCTCCCAAGGGGACTAG |
| K10/vIRF-3-hp | BS1255for | TTGGGTGGTGGGAAAATTCGCAGGC |
| | BS1255rev | GCCTGCGAATTTTCCCACCACCCAA |
| EBV-C-Promotor | AGN589.1for | GTAAACACGCCGTGGGAAAAAATTT |
| | AGN589.2rev | AAATTTTTTCCCACGGCGTGTTTAC |

Tab. 7: Oligonukleotide für die Gel-Retardationsstudien

| Gen | Primer | Sequenz (5'-3') | Annealing-temp. [°C] | Produktgröße [bp] |
|-----------|-------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------|
| ORF59-p | BS947for-XhoI | GATCTCGAGGATTGCGGCCGTAGACGC | 60 | 1000 |
| | BS947rev-HindIII | ATCAAGCTTTTGGCGCTAACGCGGAG | | |
| ORF4-hp | BS995for-HindIII | CGTAAGCTTTTCGAGGACTATTAAGCCTTT | 58 | 1000 |
| | BS995rev-XhoI | CAGACTCGAGGCTGTAAGTAGCACGGTTAT | | |
| ORF9-hp | BS998for-HindIII | CGTAAGCTTGGTGACGTTTAAGTTTTTGAAC | 60 | 1000 |
| | BS998rev-XhoI | CAGACTCGAGGATCTGCGGACGGTAATTTG | | |
| ORF29a-hp | BS948for-XhoI | GATCTCGAGGTTTGCTTTGAGCTCGCTC | 58 | 1000 |
| | BS948rev-HindIII | ATCAAGCTTGACTTAATAAACTCTCTTTTAGA | | |
| ORF62-hp | BS1002for-XhoI | GATCTCGAGATCCACGCCGGAATGGA | 60 | 1000 |
| | BS1002rev-BamHI | CAGGGATCCGCTAGTAGCGGTATCTAGGT | | |
| ORF65-hp | BS1001for-XhoI | GATCTCGAGCTTCCACACAGGCGGGC | 58 | 1000 |
| | BS1001rev-HindIII | ATCAAGCTTGTGCCAGGCCGCGCA | | |
| K5-hp | BS950for-SALI | GATGTCGACCTCTGCAGCTGGGGTGGGA | 58 | 1000 |
| | BS950rev-HindIII | ATCAAGCTTAGAAACCCCAAATAGCCTTTA | | |

Tab. 8: Primer zur Herstellung der Promotorfragmente ausgewählter KSHV-Gene

Die Primer wurden mit passenden Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende ausgestattet, die die Ligation in den entsprechenden Zielvektor ermöglichte. Die unterstrichenen Basen repräsentieren die Enzymschnittstellen.

| Gen | Primer | Sequenz (5'-3') | Annealing-temp. [°C] | Produktgröße [bp] |
|---------------|--------|---|----------------------|-------------------|
| ORF50/ Rta | BS224 | <u>AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCGCAAGATGA</u> CAAGGTAAA | 60 | 1000 |
| | BS227 | <u>AGAAAGCTGGGTTTCAGTCTCGGAAGTAATTA</u> CGC | | |

Tab. 9: Primer zur Herstellung der Expressionskonstrukte mittels Gateway-Klonierung

2.4 Plasmide

| Bezeichnung | Beschreibung | Herkunft |
|------------------|--|---|
| pMYCCR3 | Säuger-Destination-Vektor zur Expression von N-MYC-Fusionsproteinen; Ursprungsvektor pCR3 | AG Jürgen Haas, Pettenkofer Institut, München |
| pHACR3 | Säuger-Destination-Vektor zur Expression von N-HA-Fusionsproteinen; Ursprungsvektor pCR3 | |
| pDonor207 | Donor-Vektor | Invitrogen, UK |
| pMYCSS1 | Säugervektor zur Expression von N-MYC-Fusionsproteinen; Ursprungsvektor pcDNA3 | AG Kempkes |
| pHACS1 | Säugervektor zur Expression von N-HA-Fusionsproteinen; Ursprungsvektor pcDNA3 | |
| KHe140 | vIRF4 Aa 911 im Entry-Vektor pDonor207 | |
| AJ247 | Expressionsplasmid; humanes CBF1 in pHACS1 | |
| GA50-7 | von pBLuc5 abstammender Vektor mit Luziferase-Reportergen, SV40-Poly(A)-site zur Stabilisierung des Luc-Transkripts und β -Globin-Rumpfpromotor, welcher essentielle Promotorelemente, unter anderem eine TATA-Box, zur Verfügung stellt | |
| GA 981-6 | CBF1-abhängiger Luziferase-Reporter unter der Kontrolle eines β -Globinpromotors; (12 CBF1-Bindestellen) | |
| CMV β -Gal | Vektor mit β -Galaktosidase-Gen unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV-Promotors und eines konstitutiv aktiven LTR-Enhancers | |

Tab. 10: In der Arbeitsgruppe Kempkes bereits vorhandene Plasmide

| Bezeichnung | Beschreibung | Herstellung |
|-------------|-----------------------------------|--|
| BS236.1 | ORF50/ Rta Entry-Vektor pDonor207 | Gateway-BP-Reaktion mit Primer BS224for/ BS227 rev |
| BS268 | ORF50/ Rta in pHACR3 | Gateway-LR-Reaktion mit 236.1 |
| BS269 | ORF50/ Rta in pMyCCR3 | Gateway-LR-Reaktion mit 236.1 |

Tab. 11: In dieser Arbeit hergestellte Entry- oder Säugerzelleexpressionsvektoren

| Bezeichnung | Beschreibung | Primer |
|-------------|--------------|----------------------------------|
| CK6 | ORF59-p | BS947for-XhoI / BS947rev-HindIII |
| ME2.1 | ORF4-hp | BS995for-HindIII/ BS995rev-XhoI |
| ME2.4 | ORF9-hp | BS998for-HindIII/ BS998rev-XhoI |
| CK7 | ORF29a-hp | BS948for-XhoI/ BS948rev-HindIII |

| | | |
|-------|----------|-----------------------------------|
| ME2.8 | ORF62-hp | BS1002for-XhoI/ BS1002rev-BamHI |
| ME2.7 | ORF65-hp | BS1001for-XhoI/ BS1001rev-HindIII |
| CK9 | K5-hp | BS950for-SALI/ BS950rev-HindIII |

Tab. 12: In dieser Arbeit hergestellte Promotor-Reporterkonstrukte

Mit spezifischen Primern, die mit Restriktionsschnittstellen ausgestattet waren, wurden die Promotorfragmente mit genomischer DNA der KSHV-positiven BC-1-Zelllinie als Template mittels PCR hergestellt. Die PCR-Produkte und der Zielvektor GA50-7 wurden mit den entsprechenden Enzymen verdaut und anschließend ligiert.

2.5 Antikörper

| Nomenklatur | Spezies | Anwendung | Bezugsquelle |
|-----------------------------|--------------|-----------|--|
| α -c-myc DE 9E10 | Maus, IgG1 | WB | E. Kremmer, Helmholtz-Zentrum München, Deutschland |
| α -HA „R1“ 3F10 | Ratte, IgG1 | WB | Roche Diagnostic GmbH, Deutschland |
| α -GAPDH | Maus, IgG1 | WB | Millipore (Chemicon), USA |
| α -CBF1 (RBP-J 7A11) | Ratte, IgG2b | WB | E. Kremmer, Helmholtz-Zentrum München, Deutschland |
| α -CBF1 (RBJ-1F1) | Ratte, IgG2b | EMSA | E. Kremmer, Helmholtz-Zentrum München, Deutschland |

Tab. 13: Primäre Antikörper

| Nomenklatur | Spezies | Anwendung | Bezugsquelle |
|-------------------------|---------|-----------|-------------------------------|
| α -Ratte-IgG-HRP | Ziege | WB | Santa Cruz Biotechnology, USA |
| α -Maus-Ig-HRP | Schaf | WB | Amersham Biosciences |

Tab. 14: Sekundäre Antikörper

WB = Western-Blot, EMSA= *Electro Mobility Shift Assays*

2.6 Material für Bakterienstämme

| | |
|-------------|--------------------|
| Ampicillin | Sigma-Aldrich, USA |
| Bacto-Agar | Becton, Dickinson |
| Gentamicin | Sigma-Aldrich, USA |
| Kanamycin | Sigma-Aldrich, USA |
| Select-Agar | Invitrogen, UK |

2.7 Material für Zellkultur

| | |
|-------------------------|---------------------------------|
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Deutschland |
| DMEM | GIBCO, UK |
| Doxycyclin | Sigma-Aldrich, USA |
| Fötale Kälberserum | PAA Laboratories, Österreich |
| Hygromycin B | Invitrogen, UK |
| L-Glutamin | GIBCO, UK |
| OptiMEM Medium | GIBCO, UK |
| Penicillin/Streptomycin | GIBCO, UK |
| Puromycin | Merck (Calbiochem), Deutschland |

| | |
|------------------|-----------|
| RPMI 1640-Medium | GIBCO, UK |
| Trypsin | GIBCO, UK |

2.8 DNA- und Protein-Standards

| | |
|--|----------------------------|
| 1 kb DNA ladder | Invitrogen, UK |
| 100 bp DNA ladder plus | MBI Fermentas, Deutschland |
| 2 log Marker | New England Biolabs, USA |
| Prestained Protein Ladder | MBI Fermentas, Deutschland |
| λ DNA/ <i>Hind</i> III Fragments | GIBCO, UK |

2.9 Enzyme und Reagenziensysteme

| | |
|--|--|
| Alkaline Phosphatase, shrimp | Roche Diagnostics GmbH, Deutschland |
| BP Clonase II Enzyme Mix | Invitrogen, UK |
| Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets | Roche Diagnostics, Deutschland |
| ECL TM Reaktionssystem | GE Healthcare (Amersham), UK |
| Enzymmix BP-Klonase | Invitrogen, UK |
| Enzymmix LR-Klonase | Invitrogen, UK |
| High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Applied Biosystems, Deutschland |
| JETSTAR 2.0 | Genomed, Deutschland |
| Klenow Enzym | Roche Diagnostics GmbH, Deutschland |
| LightCycler 480 SYBR Green I Master | Roche Diagnostics, Deutschland |
| LR Clonase II Enzyme Mix | Invitrogen, UK |
| NucleoSpin Extract II | Macherey-Nagel, Deutschland |
| NucleoSpin Plasmid | Macherey-Nagel, Deutschland |
| Oligotex mRNA purification System | Quiagen, Deutschland |
| peqGold TriFast | PEQLAB, Deutschland |
| PrimeSTAR TM HS | MoBiTec, Deutschland |
| Proteinase K (PCR grade) | Roche Diagnostics, Deutschland |
| Pwo-DNA Polymerase | Roche Diagnostics, Deutschland |
| Restriktionsenzyme und Puffer | New England Biolabs, USA; MBI Fermentas, Deutschland |
| RNAseH | Invitrogen, UK |
| RNAseH | Sigma-Aldrich, USA |
| RNasin | Promega, USA |
| RQ1 RNase-Free DNase | Promega, USA |
| T4 DNA Ligase | New England Biolabs, USA |
| T4-Polynukleotid Kinase (PNK) | MBI Fermentas, Deutschland |

2.10 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Acetyl-Coenzym A | Roche Diagnostics GmbH, Deutschland |
| Acrylamid 30 % | Roth, Deutschland |
| Agarose | Invitrogen, UK |
| APS | MP Biomedicals, Deutschland |
| BSA (<i>bovine serum albumin</i>) | MP Biomedicals, Deutschland |
| Chloroform | Merck, Deutschland |

| | |
|--|-------------------------------------|
| dNTPs | Roche Diagnostics GmbH, Deutschland |
| Ethidiumbromid | Merck, Deutschland |
| Formaldehyd, 37% | Merck, Deutschland |
| Formamid, deionisiert | Roth, Deutschland |
| Galacton-Plus | Applied Biosystems, Deutschland |
| GlycoBlue tracer | Applied Biosystems, Deutschland |
| Isoamylalkohol | Roth, Deutschland |
| Luciferin | Roche Diagnostics GmbH, Deutschland |
| Milchpulver | AppliChem, Deutschland |
| MS2 RNA | Roche Diagnostics, Deutschland |
| Natriumbutyrat | Sigma-Aldrich, USA |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) | Roth, Deutschland |
| Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt (Poly-dI-dC) | Sigma-Aldrich, USA |
| Polyethylenimin | Sigma-Aldrich, USA |
| Protein G-Sepharose | GE Healthcare, UK |
| Restore Western Blot Stripping Buffer | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Salmon Testis Carrier DNA | Sigma-Aldrich, USA |
| Streptavidin-Agarose | Invitrogen, UK |
| TEMED | GE Healthcare, UK |
| TPA/PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) | Sigma-Aldrich, USA |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, USA |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich, Deutschland |
| Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitanmonol-aureat) | AppliChem, Darmstadt |
| X-Gal | Peqlab, Deutschland |

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

2.11 Verbrauchsmaterial

| | |
|--|-----------------------------------|
| ART Aerosol Resistant Tips | Molecular BioProducts, USA |
| Elektroporationsküvette, Gene Pulser 0,4 cm | Bio-Rad Laboratories, USA |
| FACS-Röhrchen | BD Biosciences, USA |
| Gel-Blotting-Papier 3MM | Schleicher & Schüll, Deutschland |
| Hyperfilm ECL | Amersham Bioscience, Schweden |
| Immobilion PVDF Membran | Millipore, USA |
| LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white, with sealing foil | Roche Diagnostics, Deutschland |
| Membranfilter | Schleicher & Schuell, Deutschland |
| Minisart Einwegspritzenfilter, steril 0,2/ 0,4/ 0,8/ 1,2 µm | Sartorius, Deutschland |
| Ultrazentrifugenröhrchen | Beckmann Coulter, USA |

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

2.12 Laborausstattung

| | |
|--|---|
| 3.2RS Varifuge | Heraeus Instruments, Deutschland |
| 6K10 Zentrifuge | SIGMA Centrifuges GmbH, Deutschland |
| Bakterien-Inkubator | Heraeus Instruments, Deutschland |
| Bakterienschüttler | New Brunswick Scientific, USA |
| BioScan Model QC-4000 XER radioisotope counter | American Instrument Exchange, Inc., USA |
| CP1000 Entwicklermaschine | AGFA, Köln |
| Elektroporationsgerät Gene Pulser II | Biorad, Deutschland |
| FACS Calibur | BD Biosciences, USA |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M, | Zeiss, Göttingen |
| Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40C | |
| Geldokumentationssystem | Ltf Labortechnik, Deutschland |
| Gelelektrophoresekammer (DNA) | PeqLab, Deutschland |
| Gelelektrophoresekammer (Protein) | Amersham Bioscience, Schweden |
| GeneAmp PCR System 9600 | PerkinElmer, USA |
| LightCycler 480 II | Roche Diagnostics, Deutschland |
| Mikroskop Axiovert 25 | Carl Zeiss AG, Deutschland |
| MoFlo™ (XDP High-Speed Cell Sorter) | Beckmann Coulter, USA |
| Neubauer Zählkammer | Menzel-Gläser, Deutschland |
| Orion Microplate Luminometer | Berthold Detection Systems, USA |
| PCR-System 9600 | Perkin Elmer, Deutschland |
| Phosphoimager FLA 5100, Verstärkerfolie, Filmkassetten | FujiFilm, Kleve |
| Quarzküvette | Biometra GmbH, Deutschland |
| RC5C Zentrifuge | DuPont, USA |
| Rotanta 460 R Zentrifuge | Hettich, Deutschland |
| Schüttel-Inkubator | New Brunswick Scientific, USA |
| Sonifier II W-250 D | Branson Ultrasonics Corporation, USA |
| Spannungsquellen | Biorad, USA |
| Spektralphotometer Gene Ray (Protein) | Biometra GmbH, Deutschland |
| Spektralphotometer Ultrospec 1100 pro (DNA, RNA) | GE Healthcare (Amersham), UK |
| Sterilbank | Heraeus Instruments, Deutschland |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf, Deutschland |
| Ultrazentrifuge (SW28 Rotor) | Beckmann Coulter, USA |
| UV-Transiluminator | PeqLab, Deutschland |
| Zell-Inkubator | Heraeus Instruments, Deutschland |
| Zentrifuge 5415 | Eppendorf, Deutschland |
| Zentrifuge 5417 R | Eppendorf, Deutschland |

2.13 Datenbanken, Internet-Programme und Computer-Software

| | |
|-------------------------------|---|
| CellQuestPro | BD Biosciences, USA |
| Chromas Lite, Version 2.01 | http://www.technelysium.com.au |
| Clone Manager 8, Version 8.03 | Scientific & Educational Software, USA |
| ClustaIW | http://www.ebi.ac.uk/clustalw/ |
| Ensembl Genome Browser | http://www.ensembl.org |

| | |
|---------------------------------------|---|
| Genesis | http://genome.tugraz.at |
| Genomatix | http://www.genomatix.de |
| LightCycler 480 Software, Version 1.5 | Roche Diagnostics GmbH, Deutschland |
| MultAlin (Alignments) | http://bioinfo.genopoletoulouse.prd.fr/multalin |
| NCBI Homepage | http://www.ncbi.nlm.nih.gov |
| Primer3 | http://frodo.wi.mit.edu |
| Simplicity 4.02 (Luminometer) | Berthold Detection Systems, USA |
| UCSC Genome Browser | UCSC Genome Browser |
| WinMDI 2.8 | http://facs.scripps.edu/software.html |
| AIDA Alias Software | Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt |
| EndNote X2 | Thomson Reuters, New York (USA) |

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterienkulturen

3.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

E. coli Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten oder in flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37°C expandiert. Zur Kultivierung einzelner Bakterienkolonien wurden die Zellen auf LB-Platten ausplattiert. Einzelne Klone wurden nach einer Inkubationszeit von 24 h in LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht geschüttelt. Die Selektion von transformierten Bakterien erfolgte auf Agar-Platten oder in Flüssigkulturen mit entsprechenden Antibiotika. Zur Langzeitaufbewahrung wurden 900 µl Bakterienkultur mit 100 µl DMSO versehen und bei -80°C eingefroren.

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

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar

Antibiotika: 50 µg/ ml Ampicillin; 50 µg/ ml Kanamycin; 15 µg/ ml Gentamicin

3.1.2 Herstellung CaCl₂- kompetenter Bakterien

5 ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C inkubiert, nach 24 h in 500 ml Medium überführt und bis zu einer OD₅₉₀ von 0,375 expandiert. Nach einer Inkubation von 5-10 min auf Eis wurden die Zellen bei 16000 g bei 4°C für 7 min abzentrifugiert, das Pellet in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis gestellt. Die Kulturen wurden bei 1100 g bei 4°C abzentrifugiert, in eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und wieder für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen, je 300 µl in eisgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und sofort in einen Eis-Ethanol-Gemisch schockgefroren. Die CaCl₂-kompetenten Zellen wurden bei -80°C aufbewahrt.

CaCl₂-Lösung: 60 mM CaCl₂; 10 mM PIPES (pH 7,0); 15% Glycerol

3.1.3 Bestimmung der Transformationseffizienz chemisch kompetenter Bakterien

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 100 µl CaCl₂-kompetente Bakterien mit 100 ng pUC19-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42°C für

50 sec wurden die Bakterien in 900 µl LB-Medium aufgenommen, je 100 µl Zellen in 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} Verdünnungen auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden nach 24 h ausgezählt. Eine optimale Transformations-effizienz lag zwischen 10^5 - 10^7 cfu (*colony forming units*)/ µg DNA.

cfu/ µg DNA= Kolonien x Volumen der Resuspension in µl/ Ausplattiertes Volumen in µl x DNA in µg x Verdünnungsfaktor

3.1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zur Transformation wurden 50-100 µl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit entweder 10 µl Ligationsansatz, 10 µl LR-Reaktionsansatz oder 0,1-1 µg Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 50 sec, wurden die Bakterien in 300 µl LB-Medium resuspendiert, für 1 h bei 37°C geschüttelt und anschließend auf den entsprechenden Antibiotika-Selektionsplatten ausplattiert.

3.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

3.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Suspensionszellen und adhären Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 6% CO₂ in gesättigter Luftfeuchte in Medium (RPMI 1640 oder DMEM) mit 100 U/ ml Penicillin, 100 µg/ ml Streptomycin, 4 mM L-Glutamin und 10 oder 20% fötales Kälberserum (FCS) kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage in einer Dichte von $1-4 \times 10^5$ Zellen/ ml gesplittet.

Die Suspensionszelllinien DG75-wt und DG75-CBF1-ko (SM224.9) wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS und die BC-1 und BCBL-1-Linien in RPMI 1640-Medium mit 20% FCS in Zellkulturflächen kultiviert. Die KSHV-infizierten DG75-wt oder CBF1-ko-Linien wurden in RPMI 1640-Medium mit 20% FCS und 4 µg/ ml Puromycin selektioniert.

Die adhären HEK293-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS in Kulturschalen gehalten. Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA von der Kulturschale gelöst und im frischen Medium verdünnt.

Die adhären KSHV-positive Vero-Linie (VK219), die stabil mit dem rekombinanten KSHV Stamm rKSHV.219 infiziert ist, wurde in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Um das rKSHV.219-Genom in diesen Zellen zu erhalten, wurde das Medium zusätzlich mit 5 µg/ ml Puromycin versetzt. Die Zellen wurden zum Splitten mit Trypsin-EDTA gewaschen, für 5-10

min mit Trypsin-EDTA im Brutschrank inkubiert und anschließend in frischem Medium verdünnt.

Zur Konservierung der Zelllinien wurden 1×10^7 Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei -80°C eingefroren und nach 2 Tagen in flüssigen Stickstoff zur Langzeitaufbewahrung überführt. Eingefrorene Zellen wurden zügig mit warmem Medium aufgetaut und anschließend zweimal mit Medium gewaschen. Die Selektionsmittel wurden erst am darauffolgenden Tag dem Medium hinzugefügt.

Einfriermedium: 40% Kulturmedium; 50% FCS; 10% DMSO

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden Neubauer-Zählkammern verwendet. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau gefärbt, wodurch optisch eine Unterscheidung von lebenden und blaugefärbten toten Zellen möglich war. Unter dem Mikroskop wurden die lebenden Zellen in den Quadraten der Zählkammer ausgezählt und die absolute Zellzahl nach folgender Formel bestimmt:

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

| | |
|---------|---|
| c_z | Anzahl der Zellen/ ml |
| μ_z | Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat |
| v_z | Verdünnungsfaktor |

3.2.3 Induktion des lytischen Zyklus KSHV-positiver Zellen

Die chemische Reaktivierung des lytischen Zyklus KSHV-positiver Zellen wurde mit den Substanzen 12-O-tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA, Invitrogen) und Natriumbutyrat (NaB) durchgeführt.

Die KSHV-positiven BCBL-1-, BC-1- und K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Zellen wurden auf eine Zelldichte von 4×10^5 Zellen/ ml eingestellt und durch die Zugabe von 3 mM NaB oder 20 ng/ ml TPA oder der Kombination beider Substanzen in das Kulturmedium ohne Selektionsmittel lytisch induziert.

3×10^6 Zellen der adhärennten VK219-Zelllinie wurden einen Tag vor der Induktion in 20 ml auf einer großen Zellkulturschale ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium mit 20 ml Medium ohne Puromycin und mit 3 mM NaB und 20 ng/ ml TPA ersetzt.

3.2.4 Präparation von VK219-Virusüberständen und Bestimmung der infektiösen Einheiten pro ml Virusüberstand

Zur Herstellung von Virusüberständen mit hohen Virustitern wurde die VK219-Linie wie beschrieben (Abschnitt 3.2.3) chemisch reaktiviert und für 3 Tage kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde bei 300 g für 10 min abzentrifugiert und über einen Filter (Porengröße 0,45 µm) steril filtriert. Um die Konzentration des Virusüberstandes zu erhöhen, wurde der zellfreie Überstand für 3 h bei 25000 rpm und 4°C in einem Beckmann SW28-Rotor ultrazentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Viruspellet in RPMI-Medium ohne Zusätze gewaschen und erneut für 3 h bei 25000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets im Verhältnis 1:100 zum eingesetzten Volumen in RPMI-Medium mit 10% FCS über Nacht bei 4°C gelöst.

Die Virusüberstände der K-DG75-Linien wurden 4 Tage nach der lytischen Induktion mit 3 mM NaB wie oben beschrieben präpariert.

Die infektiösen Einheiten pro ml Virusüberstand (IU/ ml), wurden durch die Infektion von HEK293-Zellen bestimmt. Je 3×10^4 HEK293-Zellen wurden in 100 µl pro Loch einer 96-Lochplatte ausgesät und nach 24 h mit unverdünnten oder verdünnten (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4}) Virusüberständen infiziert. Nach 48 h wurden die IU/ ml für jede Verdünnung durch das Auszählen der GFP-positiven Zellen im Fluoreszenzmikroskop nach folgender Formel berechnet:

$$\text{IU/ ml} = \text{Anzahl GFP-positiver Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} / \text{Ansatzvolumen in ml}$$

Parallel wurde der prozentuale Anteil an GFP-positiven Zellen in FACS-Analysen bestimmt. Nach Infektion der HEK-293-Zellen mit den unverdünnten Virusüberständen der VK219-Linie waren 95% der Zellen GFP-positiv. Die IU/ ml für die VK219-Virusüberstände lagen in der Regel bei 10^5 - 10^6 .

3.2.5 Infektion der wt- und CBF1-ko-DG75-Zelllinien mit VK219-Virusüberstand

Für die Infektion der DG75-wt- oder CBF1-ko-Zelllinie wurden je 2×10^5 in 100 µl pro Loch einer 96-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit VK219-Virusüberständen einer Multiplizität der Infektion von Faktor 5 (*Multiplicity of Infection*, MOI), welche das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Partikeln zu den Zielzellen beschreibt, infiziert und bei 32°C und bei 300 g für 40 min zentrifugiert. Der Virusüberstand wurde nach weiteren

24 h gegen RPMI-Medium mit 20% FKS ersetzt. Einmal pro Woche wurde maximal 50% des Mediums durch frisches Medium ausgetauscht. Nach einer Woche wurde die Puromycinselektion mit einer Konzentration von 1 µg/ ml gestartet und in 1 µg/ ml Schritten bis zu einer Endkonzentration von 4 µg/ ml erhöht. Die Anzahl an GFP-positiven Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop und in FACS-Analysen nach 1, 2, 4, 6 und nach 12 Wochen ermittelt.

3.2.6 Transiente Transfektion von adhärennten Zellen mit Polyethylenimin (PEI)

Die HEK293-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ ml auf eine 10 cm² Zellkulturschale oder auf eine 6-Loch-Platte ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde eine Zelldichte von ca. 70% angestrebt. Die Zellen wurden vor der Transfektion für 30-60 min in 1 ml Minimalmedium (OptiMEM) pro Loch oder 3 ml pro Kulturschale inkubiert. Die entsprechende Plasmid-DNA wurde in einen Eppendorfgefäß in 100 µl (6-Loch-Platte) oder 300 µl (Kulturschale) OptiMEM vorgelegt. Parallel wurden 4 µl PEI (1 µg/ µl) in 100 µl OptiMEM pro Loch oder 12 µl PEI in 300 µl OptiMEM pro Kulturschale angesetzt. Anschließend wurden die Ansätze vereinigt, bei RT für maximal 30 min inkubiert und zu den Zellen gegeben. Nach vier Stunden wurde das Minimalmedium mit dem Transfektionsmix vorsichtig abgenommen und durch normales RPMI-Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet.

3.2.7 Transiente Transfektion von Suspensionszelllinien durch Elektroporation

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Suspensionszellen im Verhältnis 1:2 gesplittet. Pro Transfektionsansatz wurden $0,5-1 \times 10^7$ Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, zweimal mit RPMI-Medium gewaschen und in 250 µl Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit der entsprechenden Plasmid-DNA gemischt und in eine „GenePulser“-Küvette (Biorad) mit einem Elektrodenabstand von 4 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 220 V und 950 µF. Im Anschluss wurden die Zellen auf kleine Kulturschalen mit 5 ml RPMI-Vollmedium überführt und für 48 h inkubiert.

3.2.8 Promotor-Reportergenstudie

Alle Promotorstudien basierten auf Reportergenkonstrukten, die für das Luziferasegen kodierten. Um mögliche Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den verschiedenen Ansätzen auszugleichen, wurde zu jedem Transfektionsansatz ein lacZ (β-

Galaktosidase)-Expressionsplasmid, welches unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors steht, kotransfiziert. Die Konzentration der eingesetzten Plasmid-DNA-Konstrukte war für jedes Experiment spezifisch. Jede Transfektion wurde in Triplikaten, wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, durchgeführt.

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 100 µl Luc-Extraktionspuffer lysiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (16000 g, 4°C, 15 min) wurde der Proteinüberstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden je 10 µl der Proteinlysate im Duplikat auf eine Mikrotiterplatte vorgelegt und im Luminometer (Orion Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems Berthold) nach automatischer Zugabe von 50 µl Luc-Messpuffer gemessen. Zur Messung der β-Galaktosidase-Aktivität wurden parallel 10 µl der Lysate im Duplikat auf eine weitere Mikrotiterplatte überführt und mit 100 µl β-Gal-Reaktionspuffer für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der Biolumineszenz unter automatischer Zugabe von 50 µl β-Gal-Messpuffer im Luminometer. Zur Normalisierung der Luziferase-Werte wurde der Quotient aus der relativen Luziferase-Aktivität und der realtiven β-Galaktosidase-Aktivität berechnet.

| | |
|-----------------------------------|---|
| 5 x Luc-Extraktionspuffer: | 50% (w/v) Glycerin; 5% (w/v) Triton X-100; 10 mM EDTA (pH 8,0); 125 mM Tris/HCl (pH 7,8); im 1 x Puffer 2 mM DTT |
| Luc-Messpuffer: | 20 mM Tricin; 1,07 mM (MgCO ₃)·Mg(OH) ₂ ·5(H ₂ O); 2,67 mM MgSO ₄ ; 0,1 mM EDTA (pH 8,0); 33,3 mM DTT; 270 µM Acetyl-Coenzym A; 470 µM Luziferin; 530 µM ATP; Lagerung im Dunkeln bei -20 °C |
| β-Gal-Reaktionspuffer: | 100 mM NaP (pH 8,0); 1 mM MgCl ₂ ; 1% Galacton-Plus |
| β-Gal-Messpuffer: | 0,2 M NaOH; 10% Emerald-Enhancer |

3.2.9 "Fluorescence activated cell sorting" (FACS)

3.2.9.1 Nachweis der GFP-Expression

Mit Hilfe von Durchflusszytometrie erfolgte der Nachweis für die Expression des Fluoreszenzproteins GFP in den Zellen. Die FACS-Analysen wurden mit dem Gerät FACSCalibur der Firma BD Biosciences durchgeführt und mit Hilfe der Software CellQuestPro ausgewertet. Für die FACS-Analysen wurden 0,5-1 x 10⁶ Zellen zweimal mit PBS/5% FCS gewaschen und bei 500 g für 5 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS/1% Paraformaldehyd fixiert.

3.2.9.2 Quantifizierung und Sortierung GFP-RFP-doppelt-positiver Zellen im Durchflusszytometer

Die Quantifizierung der GFP-RFP-doppelt-positiven K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen und die Sortierung in GFP-positive und GFP-RFP-doppelt-positive Zellen erfolgte in Kooperation mit Dr. Joachim W. Ellwart (Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München) im Durchflusszytometer MoFlo™ (XDP High-Speed Cell Sorter, Beckman Coulter).

Die Quantifizierung wurde mit 1×10^6 chemisch induzierten K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen durchgeführt. Für die Sortierung in GFP-positive oder GFP-RFP-doppelt-positive Zellen wurden die Zellen auf eine Dichte von 3×10^7 Zellen/ml in PBS/0,5% FCS eingestellt. Von insgesamt 1×10^8 eingesetzten Zellen wurden je 2×10^6 GFP- oder GFP-RFP-doppelt-positive Zellen sortiert. Diese geringe Ausbeute beruhte auf den niedrigen prozentualen Anteil an induzierten GFP-RFP-doppelt-positiven Zellen. Die Zellen wurden nach der Sortierung im warmen Medium resuspendiert, zweimal mit Medium gewaschen und anschließend für die Präparation von RNA eingesetzt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Arbeiten mit DNA

3.3.1.1 Schnelle Plasmidisolierung

Von einer 5 ml Übernachtskultur wurden 3 ml bei 11000 g für 3 min abzentrifugiert, das Bakterien-Pellet in 300 µl TENS-Puffer lysiert, nach 5 min Inkubation bei RT mit 150 µl 3 M NaAc (pH 5,2) gemischt und für weitere 5 min auf Eis gestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 16000 g für 10 min wurden 400 µl des klaren Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit 900 µl 100% Ethanol gefällt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, wieder abzentrifugiert, luftgetrocknet und in 30 µl TER-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert. Alternativ wurde die Isolierung der Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Überprüfung der Plasmid-DNA wurden 2 µl DNA mit Restriktionsenzymen gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt.

TENS: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA (pH 8); 0,1 M NaOH; 0,5% SDS

TER: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA (pH 8); 100 µg/ml RNase A

3.3.1.2 Präparative Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus einer 400 ml Bakterienkultur wurde mit den Plasmid-Maxipräparationskit Jetstar Genomed 2.0 nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Je nach DNA-Konzentration wurde das Pellet nach der Fällung in 100-300 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA (pH 8)

3.3.1.3 Isolierung genomischer DNA

1-5 x 10⁶ Zellen wurden bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend in 250 µl Lösung A resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit Lösung B, die zuvor mit 90 µg RNase A (30 µg/µl) und 60 µg Proteinase K (20 µg/µl) versetzt wurde, vermischt und für 30 min bei 37°C und anschließend für 60 min bei 50°C inkubiert. Die abgekühlten Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit PCI vermengt, kräftig geschüttelt und abzentrifugiert (15000 g, 5 min, RT). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen CIA gemischt, kräftig geschüttelt und abzentrifugiert (15000 g, 5 min, RT). Anschließend wurde erneut die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen 100% Ethanol versetzt. Die DNA wurde für 1 h bei -80°C (oder über Nacht bei -20°C) gefällt. Die Ansätze wurden bei 15000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-30 µl TE gelöst.

Lösung A: 100 mM KCl; 10 mM Tris/ HCl (pH 8,3); 2,5 mM MgCl₂

Lösung B: 10 mM Tris/ HCl (pH 8,3); 2,5 mM MgCl₂; 1% Tween 20; 1% NP-40

PCI: Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1)

CIA: Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1)

3.3.1.4 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption einer Verdünnung in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Qualität der DNA wurde auf Verunreinigungen durch Proteine (280 nm) und organische Verbindungen (230 nm) überprüft, wobei das Verhältnis $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ etwa 1,8 betragen sollte. Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

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

c Konzentration der DNA-Probe

A₂₆₀ Absorptionswert bei 260 nm

3.3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Fragmentes *in vitro* wurden Oligonukleotid-Primerpaare verwendet, die sequenzspezifisch an komplementäre denaturierte Template-DNA hybridisierten, und den zu amplifizierenden Bereich gegenläufig orientiert flankierten. Als Template wurden sowohl genomische DNA als auch Plasmid-DNA eingesetzt. Für die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde die PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase der Firma Mobitec (TaKaRa) eingesetzt. Für einen 50 µl Reaktionsansatz wurde 50-100 ng genomische DNA oder Plasmid-DNA als Template, je 300 nM *forward* und *reverse* Primer, 200 µM dNTP-Mix, 1 x PrimeSTAR-Puffer und 1,25 U/ 50 µl PrimeSTAR-DNA-Polymerase eingesetzt. Die PCR wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

| Zyklen | Programm | Temperatur [°C] | Zeit |
|--------|----------------------|-----------------|-----------------------------------|
| 1 | Denaturierung | 96 | 5 min |
| 25 | Denaturierung | 98 | 30 sec |
| | Primerhybridisierung | 55-60 | 5 (TM ≥ 55°C)-15- sec (TM < 55°C) |
| | Elongation | 72 | 1 min/ kb |
| 1 | Elongation | 72 | 7 min |

Tab. 15: PCR-Programm für die PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

3.3.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die direkte Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit dem Nucleo Spin® Extract II Kit nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurden überschüssige Primer und Nukleotide aus dem Ansatz entfernt. Das PCR-Produkt wurde in 50 µl H₂O gelöst.

Nach einem Restriktionsverdau wurde der gesamte Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen, die spezifischen DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und nach Herstellerprotokoll des Nucleo Spin® Extract II Kit präpariert. Die Fragmente wurden in 50 µl H₂O aufgenommen.

3.3.1.7 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente einer Größe von 2-10 kb wurden über ein 0,8%-iges und einer Größe unter 2 kb über ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetrennt. Die Agarose wurden in 1 x TAE-Laufpuffer gelöst und mit 10 mg/ ml Etidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1 x DNA-Ladepuffer gemischt und mit einem geeigneten Größen- oder Mengenstandard elektrophoretisch bei 5-8 V/ cm aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden im UV-Licht bei 254 nm auf einen UV-Transluminator kontrolliert.

TAE-Laufpuffer : 40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA (pH 8,0)

DNA-Ladepuffer: 10% Bromphenolblau; 30% Glycerin

3.3.1.8 Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen wurde in den Reaktionspuffern des Herstellers durchgeführt. Die Restriktionsenzyme (1 U/ 1 µg DNA pro h) wurden so eingesetzt, dass sie maximal 1/10 des Reaktionsvolumens entsprachen. Die eingesetzte DNA sollte eine Konzentration von 200 ng/ µl nicht überschreiten. Die Reaktion wurde anschließend bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur gestoppt. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

3.3.1.9 Ligation von DNA

Um ein DNA-Fragment (Insert) mit passenden Schnittstellen in ein Plasmid-DNA-Rückgrat zu klonieren wurde die T4 DNA-Ligase verwendet. 1 U ist definiert als die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 50% verdauter DNA-Fragmente in einem totalen Volumen von 20 µl in 30 min bei 16°C zu ligieren. Für die Ligation wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 eingesetzt. 50 ng Vektor, die entsprechende Menge an Insert und 1 x T4 DNA-Ligase Puffer mit H₂O auf einen 20 µl Ansatz gebracht. Von diesem Ansatz wurden je 10 µl auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt. Ein Ansatz wurde mit 1 µl T4 DNA-Ligase (400 U/ µl) versetzt, während der andere als Negativkontrolle verwendet wurde. Nach einer Inkubation von 2-3 h bei RT oder über Nacht bei 16°C wurden Bakterien mit den Ligationsansätzen transformiert.

3.3.1.10 Klonierung von Plasmidvektoren

3.3.1.10.1 Konventionelle Klonierung von Plasmidvektoren

Für die Klonierung von Säugerzellexpressionsvektoren oder Promotor-Reporter-genkonstrukten, wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus genomischer DNA mittels PCR mit sequenzspezifischen Primerpaaren, die am 5'-Ende mit zwei unterschiedlichen überhängenden Restriktionsschnittstellen ausgestattet waren, hergestellt. Die PCR-Fragmente, die mit dem Nucleo Spin[®] Extract II Kit aufgereinigt wurden, und die Zielvektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Die DNA-Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, über das Nucleo Spin[®] Extract II Kit aufgereinigt und in 25 µl H₂O eluiert. 10% des Eluats wurde parallel mit einem Mengenstandard, *Hind*III verdauter λ-DNA, auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend die DNA-Konzentration mittels der Bandenintensität im Vergleich zum Standard abgeschätzt. Die Ligation erfolgte im molaren Verhältnis 1:3 von Vektor zu Insert. *E. coli* DH5α-Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und auf Selektionsplatten kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde aus einzelnen Klonen präpariert und mit Hilfe von Restriktionsverdau und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

3.3.1.10.2 Das Gateway[®]-System

Das Gateway-Klonierungssystem von Invitrogen ermöglicht die schnelle Klonierung von Expressionsvektoren, bei der die Restriktion durch Endonukleasen und die anschließende Ligation durch eine spezifische Rekombination ersetzt ist. Diese Reaktion stützt sich auf die spezifische Rekombination des Bakteriophagen Lambda (λ) in *E. coli*, die von Proteinen sowohl aus den λ als auch vom bakteriellen Genom gesteuert wird. Die Erkennungsstellen werden *attL*, *attR*, *attB* und *attP* (*attachment-sites*, kurz: *att-sites*) genannt und dienen als Rekombinationsstellen des Bakteriophagen lambda (λ) in *E. coli*. Die Selektion von positiven Klonen wird durch das für Bakterien toxische im Vektor kodierte *ccdB*-Gen ermöglicht, welches von *att*-Sites flankiert ist und durch die Rekombination durch das gewünschte Genfragment ausgetauscht wird. Es werden zwei Reaktionen unterschieden: die BP- und LR-Reaktion. Bei der LR-Reaktion handelt es sich um eine Rekombination, bei der Gene flankiert mit *attL*-Sequenzen aus dem Entry-Klon in einen Destination-Vektor zwischen *attR*-sites durch den Gateway[®] LR Klonase[™] II-Enzym-Mix aus rekombinanten Proteinen transferiert werden. Dabei entsteht ein Expressions-Klon mit gewünschtem Gen, eingefasst in *attB*-sites und einen Nebenprodukt, welches das toxische *ccdB*-Gen des Destination-Klons mit *attP*-

sites beinhaltet. Die BP-Reaktion überführt DNA-Fragmente aus Expressionsvektoren oder mit *attB*-sites flankierte PCR-Produkte in einen Donor-Vektor mit *attP*-sites. Dabei werden Entry-Klone und Nebenprodukte mit dem *ccdB*-Gen gebildet. Diese Reaktion wird von dem Gateway® BP Klonase™ II-Enzym-Mix katalysiert.

Die Herstellung eines Donor-Vektors erfolgte durch die Klonierung von Genfragmenten in zwei PCR-Schritten. Zuerst wurde die PCR mit genspezifischen Primern, die am 5'-Ende einen Teil der *attB1*- bzw. *attB2*-Site enthielten, durchgeführt. Die *attB*-Sites wurden in der zweiten PCR mittels Primer, die nur die *attB*-Sites enthielten, vervollständigt. Die BP- und die LR-Reaktion wurde mit dem Gateway® BP bzw. LR Clonase™ II Enzym-Mix nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit den Reaktionsansätzen wurden *ccdB*-resistente *E. coli* DB3.1 transformiert. Die Plasmid-DNA wurde aus einzelnen Klonen präpariert und mit Hilfe von Restriktionsverdau und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

3.3.1.11 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung der Expressionsvektoren oder Promotor-Reportergenkonstrukte wurde bei der Firma MWG, Ebersberg, durchgeführt und mit Hilfe der Software ClustaIW ausgewertet.

3.3.1.12 *real-time* PCR

Die Analyse und relative Quantifizierung von viralen Transkripten in latenten und reaktivierten KSHV-infizierten Zellen erfolgte mit Hilfe der *real-time* PCR im LightCycler 480 II Gerät der Firma Roche Diagnostic. Die Methode basiert auf dem SYBR-Green I System, einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert.

Die Messung der emittierten Fluoreszenz des eingelagerten Farbstoffes, am Ende jedes Zyklus nach der Elongationsphase, ermöglichte die Detektion der akkumulierenden PCR-Produkte. Der *cycle-threshold* (Ct)-Wert, der Kreuzungspunkt, der die Anzahl der Zyklen beschreibt, an welchen das Fluoreszenzsignal des Amplifikats erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde für die Berechnung der relativen Transkriptmenge verwendet. Umso höher die Anreicherungen eines Templates in der Ausgangsprobe ist, desto niedriger ist die Zyklenzahl des Ct-Wertes. Die Berechnung von Ct erfolgt durch die Software nach der „Second Derivative Maximum“-Methode, die das Maximum der zweiten Ableitung einer Kurve bestimmt, an dem sich die Probenfluoreszenz am deutlichsten von der Hintergrund-Fluoreszenz absetzt.

Die ideale Amplifikationseffizienz entspricht einer Verdoppelung der eingesetzten cDNA pro Zyklus. Abhängig von Fragmentlänge, Qualität des Templates oder der zu amplifizierenden DNA-Sequenz kann die Amplifikationseffizienz variieren. Um die Amplifikationseffizienz der verschiedenen Primerpaarkombinationen in der Berechnung der relativen Transkriptmenge zu berücksichtigen, wurde für jedes Transkript eine Standardkurve erstellt. Die Standardkurve der entsprechenden Gene setzte sich aus einer Verdünnungsreihe (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} und 10^{-10}) eines PCR-Produktes in $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ MS2-RNA zusammen. Die Phagen-RNA diente zur Stabilisierung des PCR-Templates und ermöglichte das wiederholte Einfrieren und Auftauen der Proben. Die Ct-Werte der Amplifikate der Standardkurve wurden gegen den dekadischen Logarithmus der relativen Konzentration aufgetragen und die Amplifikationseffizienz aus der Steigung der Geraden nach folgender Formel berechnet:

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

N_n Anzahl der Moleküle im PCR-Zyklus n

N_0 Anzahl der Moleküle zu Beginn der Reaktion

E Amplifikationseffizienz

C_t Kreuzungspunkt

Die relative Quantifizierung wurde im Verhältnis zu der Standardprobe der 10^{-6} -Verdünnung, die im Folgenden als Kalibratorprobe bezeichnet wird, bestimmt.

Um mögliche Unterschiede zwischen den eingesetzten cDNA-Proben auszugleichen, wurde parallel für jede Probe die Transkriptmenge eines Referenzgens ermittelt. Es handelte sich dabei um typische Haushaltsgene, die unabhängig von Zelltyp und äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert werden. Für die hier durchgeführten Studien wurde GAPDH und beta-Aktin als Referenzgen ausgewählt.

Bei der relativen Quantifizierung wurde das Verhältnis des zu quantifizierenden Transkriptes zu dem Referenzgen verglichen. Die relative Transkriptmenge, d.h. die Menge des Zielgens nach interner Normalisierung auf die Menge des Referenzgens, wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Transkriptmenge} = (M_{ZSP} / M_{RSP}) / (M_{ZSC} / M_{RSC}) \times 10^6$$

M_{ZSP} Menge des Zielgens in der Probe

M_{RSP} Menge des Referenzgens in der Probe

M_{ZSC} Menge des Zielgens im Kalibrator

M_{RSC} Menge des Referenzgens im Kalibrator

MF Multiplikationsfaktor

Die PCR-Reaktionsansätze setzten sich nach Angaben des Herstellers aus je 1 µl *forward* und *reverse* Primer in einer Endkonzentration von 0,5 µM, 2 µl cDNA-Template und 5 µl des SYBR Green I Master-Mix zusammen. Je nach Abundanz des zu quantifizierenden Transkriptes wurde die cDNA unverdünnt oder in einer angemessenen Verdünnung eingesetzt. Die PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl pro Loch der LightCycler 480 Multiwell-Platte. Neben einem Ansatz mit H₂O anstelle von cDNA, wurde die genspezifische Kalibratorprobe in allen *real-time* PCR-Analysen im Duplikat mitgeführt. Das Standardprogramm für die *real-time* PCR-Analysen ist in Tab. 16 dargestellt.

| Analysis Mode | Zyklen | Segment | Temp. ¹ [°C] | Zeit ² | Acquisition Mode |
|----------------|--------|----------------|-------------------------------|-------------------|------------------|
| none | 1 | Pre-Incubation | 95 | 10 min | none |
| Quantification | 45 | Denaturation | 95 | 2 sec | none |
| | | Annealing | 63 | 10 sec | none |
| | | Extension | 72 | 20 sec | single |
| Melting curves | 1 | Denaturation | 95 | 5 sec | none |
| | | Annealing | 65 | 1 min | none |
| | | Melting | 97 (Ramp Rate = 0,11 °C/ sec) | 0 sec | continuous |
| none | 1 | Cooling | 40 | 30 sec | none |

Tab. 16: Das *real-time* PCR-Programm

¹ Temperaturanstieg/ -abfall (Ramp Rate) von 20°C/ sec, falls nicht anders angegeben

Im Anschluss jeder PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, die über die Qualität der PCR-Produkte und die Spezifität der Reaktion Auskunft gab.

3.3.2 Arbeiten mit RNA

3.3.2.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden 0,5-1 x 10⁷ Zellen abzentrifugiert und die RNA mittels peqGOLD TriFast (PEQLAB) nach Angaben des Herstellers präpariert. Die RNA-Pellets wurden in 10-50 µl sterilem H₂O für 10 min bei 56°C unter Schütteln gelöst. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.3.2.2 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Absorption einer geeigneten Verdünnung in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Qualität der RNA wurde auf Verunreinigungen durch Proteine (280 nm) und

organische Verbindungen (230 nm) überprüft, wobei das Verhältnis $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ etwa 1,8-2 betragen sollte. Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

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

c Konzentration der DNA-Probe

A_{260} Absorptionswert bei 260 nm

3.3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Die Qualität der RNA wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen kontrolliert. Für 1,2%-ige Agarosegele wurde Agarose mit autoklaviertem H_2O geschmolzen, auf 60°C abgekühlt, mit 2,2 M Formaldehyd (37%) versetzt und mit 1 x MOPS auf das entsprechende Gelvolumen aufgefüllt. 5 μg RNA wurden auf Eis mit 2 μl 5 x MOPS, 3,5 μl Formaldehyd (37%), 10 μl Formamid (100%) und 0,08 μl Ethidiumbromid (10 $\mu\text{g/}\mu\text{l}$) versetzt, für 15 min bei 56°C denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2 μl RNA-Ladepuffer wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei 1-2 V/cm in 1 x MOPS-Laufpuffer aufgetrennt. Die RNA-Banden für die 18S und 28S rRNA wurden im UV-Licht bei 254 nm auf einem UV-Transluminator kontrolliert. Bei intakter RNA wurden deutlich abgegrenzte Banden detektiert.

10 x MOPS: 0,4 M MOPS (pH 7,0); 0,1 M Na-Acetat; 0,01 M EDTA (pH 8,0)

RNA-Ladepuffer: 50% Ficoll; 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,4% Bromphenolblau

3.3.2.4 DNase-Verdau von RNA

Um die Kontamination von genomischer DNA in den RNA-Proben zu vermeiden, wurde ein DNase-Verdau mit 10 μg RNA und 1 U RQ1 RNase-Free DNase (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch die Zugabe von 2 U RNasin pro Reaktionsansatz wurde die Degradation von RNA vorgebeugt.

3.3.2.5 Reverse Transkription in cDNA

Die DNase verdaute RNA wurde mittels den High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems in cDNA umgeschrieben. Für eine Reaktion wurde 1 μg RNA, 1 x dNTP-Mix, 1 x RT-Puffer, 1 x RT-Random-Primer und 1 μl MultiScribeTM Reverse Transkriptase nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Ansätze

wurden zusätzlich mit 10 U RNasin versetzt und mit Nuklease-freien H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurde ein paralleler Ansatz mit H₂O anstelle der reversen Transkriptase mitgeführt. Das Programm für die cDNA-Synthese ist in Tab. 17 dargestellt. Die cDNA wurde unverdünnt oder in einer angemessenen Verdünnung anschließend für *real-time* PCR-Analysen eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

| Zyklen | Temperatur [°C] | Zeit |
|--------|-----------------|--------|
| 1 | 30 | 15 min |
| 1 | 42 | 15 min |
| 1 | 52 | 15 min |
| 1 | 70 | 10 min |

Tab. 17: Das Programm für die cDNA-Synthese

3.3.2.6 Herstellung von cDNA-Proben für den *real-time* PCR KSHV-Array

3.3.2.6.1 Durchführung einer NaB-Induktionskinetik der K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Zelllinie

Um die Expressionsprofile viraler Gene nach lytischer Induktion in wt- und CBF1-ko-K-DG75-Zellen zu überprüfen, wurde eine Reaktivierungskinetik mit 3 mM NaB für 2, 4, 8, 16 und 32 h durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in einer Dichte von 4×10^5 Zellen/ml ausgesät und mittels 3 mM NaB für die entsprechende Zeit in Medium ohne Puromycinselektion kultiviert.

3.3.2.6.2 Isolierung von RNA und Anreicherung von mRNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden 1×10^6 Zellen abzentrifugiert, mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml peqGOLD TriFast (PEQLAB) resuspendiert, für 30 sec kräftig geschüttelt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben kräftig geschüttelt und bei 16000 g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase (ca. 350 µl) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl PCI versetzt und für 1 min kräftig geschüttelt. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform wurden die Proben 2-5 mal invertiert, für 5 min auf Eis inkubiert bei 16000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. 200 µl der oberen wässrigen Phase wurden in ein neues Eppendorfgefäß, mit 1 µl GlycoBlue tracer (Ambion) und dem gleichem Volumen an Isopropanol (200µl) versetzt und über Nacht bei -80°C gelagert. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und bei 16000 g für 20 min bei 4°C abzentrifugiert. Die RNA-Pellets wurden bei RT für 10 min luftgetrocknet

und in 50 µl DEPC/ 0,1 x Tris-EDTA (pH 7,5)-H₂O bei 65°C für 10 min gelöst. Die Qualität der RNA wurde auf einem Agarosegel und im Spektralphotometer überprüft.

Die Anreicherung von polyadenylierter (polyA) mRNA erfolgte aus dem kompletten RNA-Ansatz mittels des Oligotex mRNA purification System (Quiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Methode basiert auf der Bindung von polyA-mRNA an eine Matrix-gekoppelte dT-Oligomere. Während die übrige RNA in einem Waschschrift entfernt wird, wird die polyA-mRNA in zwei Schritten mit je 30 µl auf 65°C erhitzten DEPC/ 0,1 x Tris-EDTA (pH 7,5)-H₂O eluiert.

PCI: Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) (pH 5.1)

3.3.2.6.3 Reverse Transkription und Testen der cDNA-Proben

Die 50 µl polyA-mRNA-Proben wurden mittels den High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems in einem 100 µl Reaktionsansatz, wie in 3.3.2.5 beschrieben, in cDNA umgeschrieben. Als Negativkontrolle wurde pro Zelllinie je 1/10 jeder mRNA-Probe zu jedem Zeitpunkt der Kinetik vereinigt und in einem Ansatz ohne reverse Transkriptase mitgeführt. Im Anschluss wurden die 100 µl cDNA-Proben mit 1U RNaseH (Invitrogen) bei 37°C für 30 min inkubiert, um nicht transkribierte mRNA zu beseitigen. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 95°C für 5 min. Die cDNA wurde bei -80°C gelagert.

Die Qualität der cDNA-Proben wurde in *real-time* PCR-Analysen mit spezifischen Primern gegen GAPDH kontrolliert. Als Positivkontrolle wurde eine GAPDH-Kalibratorprobe mitgeführt. Die *real-time* PCR-Analysen wurde wie in Abschnitt 3.3.1.12 durchgeführt. Die GAPDH-Transkripte wurden anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert.

3.3.2.6.4 Durchführung des KSHV-Arrays

Die Analyse der Genexpressionsprofile viraler Transkripte im Verlauf des lytischen Zyklus in den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen wurde in Kooperation mit Prof. Dirk Dittmer (Universität North Carolina, USA) mit Hilfe eines *real-time* PCR-KSHV-Arrays durchgeführt (Fakhari and Dittmer, 2002).

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

Zur Extraktion von Proteinen wurden $0,5-1 \times 10^7$ Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen und in 100-300 μ l RIPA-Puffer lysiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4°C wurden die Zellen im Branson Digital Sonifier W-250 D unter Verwendung einer 3 mm konischen Mikrospritze sonifiziert (3 x 10 sec, Amplitude von 10%). Die Zelltrümmer wurden bei 15000 g für 15 min abzentrifugiert und das klare Proteinlysate in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Extrakte wurden bei -80°C gelagert.

PBS: 137 M NaCl; 2,7 M KCl; 7,3 M Na₂HPO₄; 1,5 M KH₂PO₄ (pH 7,4)

RIPA-Puffer: 50 mM Tris/ HCL (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1% Igepal; 0,5% DOC; 0,1% SDS; H₂O;
1x Complete Proteinase-Inhibitor (Roche) frisch hinzufügen

3.4.2 Expression und Präparation des rekombinanten CBF1-Proteins

Der His-CBF1-Expressionsvektor (Maier et al., 2005) wurde in BL21 (DE3) pLysS-*E.coli* Bakterien (Promega) transformiert und bei 37°C auf Ampicillin-Selektionsplatten ausgestrichen. Nach 24 h wurde mit einem Klon eine Flüssigkultur angeimpft. Nach Kultivierung der Bakterien bei 37°C bis zu einer Dichte von OD₅₉₅ 0,6 wurde die Kultur mit 0,5 mM IPTG für 2 h bei 30°C induziert. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, einmal mit eiskalten PBS gewaschen und in Lysepuffer resuspendiert. Die Bakterienlysate wurden im Branson Digital Sonifier W-250 D unter Verwendung einer 3 mm konischen Mikrospritze bei 4°C sonifiziert (3-mal 20 sec, Amplitude von 10%). Nach einem Zentrifugationsschritt von 20000 g für 20 min wurde das klare Bakterienlysate mit äquilibrierten Ni-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid*)-Agarose für 2 h inkubiert und anschließend auf eine Chromatographie-Säule (BioRad) aufgetragen. Die Säule wurde mit den 10- bis 20-fachen Volumen gewaschen, bevor das Protein mit 250 mM Imidazol eluiert wurde. Das Eluat wurde ÜN im Dialysepuffer dialysiert.

Lysepuffer: 50 mM Tris (pH 8); 150 mM NaCl; 1M Urea; 1x Complete Protease-Inhibitor (Roche) frisch hinzufügen

Dialysepuffer: 50 mM Tris (pH 8); 150 mM NaCl; 2 mM DTT; 10 mM EDTA (pH 8)

3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen wurde spektrometrisch mittels des Bradford-Reagenz im direkten Vergleich zu einer BSA-Protein-Standardkurve bestimmt. Die Proteinextrakte wurden 1:1000 und BSA in den Konzentrationen von 1 bis 10 µg mit Bradford-Reagenz verdünnt. Die Absorption bei 595 nm wurde im Spektralphotometer gemessen. Anhand der ermittelten Werte der BSA-Standardkurve konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

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

3.4.4 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE nach ihren Molekulargewicht und ihrer elektrischen Ladung elektrophoretisch aufgetrennt. Die SDS-Gele setzten sich aus 8 oder 10%-igen Trenngelen und 5%-igen Sammelgelen aus einer 30% (w/v) Acrylamidlösung zusammen und wurden wie bei Sambrook et al. (1989) hergestellt. Es wurden zwischen 30-60 µg Proteinextrakt, je nach experimenteller Anforderung, mit 2 x oder 5 x Laemmli-Puffer versetzt, 10 min bei 95°C aufgeköcht und neben einem Molekulargewichtsstandard auf das Gel geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 25 mA pro Gel für ca. 1 h in 1x SDS-Laufpuffer bei RT.

2 x Laemmli-Puffer: 4% SDS; 20% Glycerol; 120 mM Tris/HCL (pH 6,8); 5% Mercaptoethanol; 2,8 ml H₂O; Spatelspitze Bromphenol-Blau

5 x Laemmli-Puffer: 10% SDS; 50% Glycerin; 12,5% β-Mercaptoethanol; 300 mM Tris/ HCl (pH 6,8); 1 Spatelspitze Bromphenolblau

10 x SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris Base; 200 mM Glycin; 0,1% SDS

3.4.5 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden nach der SDS-PAGE auf eine spezielle PVDF-Membran transferiert. Dafür wurde das SDS-Gel auf eine PVDF-Membran, die zuvor mit 100%-igem Methanol aktiviert wurde, gelegt und zwischen je 3MM Whatman-Filter, getränkt mit Transferpuffer, in eine Blotting-Apparatur geschichtet. Der Transfer wurde bei 400 mA für 1 h durchgeführt. Die Membran wurde anschließend in Blockpuffer für 30 min und ÜN bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Antikörperüberstände wurden im Verhältnis 1:5 in Blockpuffer verdünnt. Nach Waschen der Membran für mindestens dreimal 10 min mit PBS/ Tween, folgte die Inkubation mit den HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Die Membran wurde erneut mindestens dreimal 10 min mit PBS/ Tween und 10 min mit PBS

gewaschen. Der Nachweis von Proteinen erfolgte durch die Detektion des Sekundärantikörpers mit den *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)TM Reaktionssystem nach Angaben des Herstellers. Das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert die Umsetzung von Luminol mit Wasserstoffperoxid zu seiner oxidierten Form, unter Freisetzung von Stickstoff und Licht, welches auf ECLTM Hyperfilme detektiert werden kann.

Transferpuffer: 25 mM Tris Base; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol

Blockpuffer: 5% Milchpulver; 50 mM Tris/ HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl

PBS: 137 M NaCl; 2,7 M KCl; 7,3 M Na₂HPO₄; 1,5 M KH₂PO₄ (pH 7,4)

PBS/Tween: 0,05% Tween 20 in PBS

3.4.6 Gel-Retardationsanalysen

Zum Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen wurden Gel-Retardationsanalysen, die auch als EMSAs (*Electro Mobility Shift Assays*) bezeichnet werden, durchgeführt. Die Methode basiert auf der Beobachtung eines veränderten Migrationsverhalten von Protein-DNA-Komplexen in nativen Polyacrylamidgelen im Vergleich zu freier, ungebundener DNA (Fried and Crothers, 1981). Die radioaktive Markierung der eingesetzten DNA-Fragmente ermöglicht dabei die Detektion der freien oder gebundenen DNA.

In dieser Arbeit wurden potentielle Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors CBF1 in dem Promotorbereich von KSHV-Genen auf eine direkte CBF1-Bindung untersucht. Die Herstellung radioaktiv markierter doppelsträngiger DNA-Fragmente erfolgte mit äquimolaren Mengen an zwei einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotiden einer Länge von 25 bp, die für die potentiellen CBF1-Bindungsstellen in den Promotorbereichen kodierten, in einer T4-Polynukleotid-Kinasereaktion (T4-PNK, Fermentas) durch die Übertragung von [γ -³²P] ATP auf das 5'-OH-Ende der Oligonukleotide. Die Reaktionsansätze wurden wie in Tab. 18 angesetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 μ l 0,5 M EDTA (pH 8,0) und eine Inkubation bei 75°C für 10 min abgestoppt.

| Komponente | Volumen/Menge |
|-----------------------------------|----------------|
| DNA | je 10 pmol |
| 10 x PNK-Puffer | 2 μ l |
| T4-PNK | 30 U |
| [γ - ³² P] ATP | 50 μ Ci |
| mit H ₂ O | auf 20 μ l |

Tab. 18: Der T4-Polynukleotid-Kinase (PNK)-Reaktionsansatz

Die markierten Oligonukleotide wurden im Anschluss über G50-Sephadex-Säulen (GE Healthcare) aufgereinigt. Die 20 µl Ansätze wurden mit 30 µl 1 x TE verdünnt und auf die Sephadex-Säulen aufgetragen. Die Elution der Oligonukleotide erfolgte mit 1 ml 1 x TE, wobei in 100 µl Schritten Fraktionen in separaten Eppendorfreaktionsgefäßen gesammelt wurden. Die Höhe der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde in der Maßeinheit *counts per minute* (cpm), welche als Anzahl der Zerfälle der Atome pro Minute definiert ist, im Szintillationszähler bestimmt. Für die 6.-8. Fraktion konnte in der Regel der höchste cpm-Wert ermittelt werden. Parallel wurden äquimolare Mengen der einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotide in einem 30 µl Ansatz mit Annealing-Puffer vermischt, bei 90°C für 10 min erhitzt und im Heizblock stehend auf RT abgekühlt. Diese Oligonukleotide wurden für Wettbewerbsstudien zur Spezifizierung der DNA-Protein-Komplexe eingesetzt.

Für die Reaktionsansätze der Gelelektrophorese wurde der Bindemix, Poly-dI-dC, BSA, H₂O und rekombinantes CBF1-Protein auf Eis vorgelegt. Bei einem Shift-Ansatz wurden die Proben mit der [γ -³²P] ATP-markierter DNA versetzt, für 30 min bei RT inkubiert und auf das Gel geladen. Im Falle eines Supershift-Ansatzes wurden die Proben mit dem Antikörper für 30 min auf Eis und anschließend mit der [γ -³²P] ATP-markierter DNA für 30 min bei RT inkubiert. Für die Wettbewerbsanalyse wurden die Proben mit unmarkierter DNA in 100-fachen Überschuss für 5 min bei RT und anschließend mit der [γ -³²P] ATP-markierter DNA für 30 min bei RT inkubiert. Die Zugabe eines spezifischen Antikörpers gegen CBF1 oder des unmarkierten Oligonukleotides diente zur Spezifizierung des DNA-CBF1-Komplexes. Die Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze ist in Tab. 19 aufgeführt.

| Komponente | Shift | Super-shift | Wettbewerbsanalyse |
|---|-----------|-------------|--------------------|
| rekombinantes CBF1(2,5-20 pmol) | 1-5 µl | 1-5 µl | 1-5 µl |
| 4x Bindepuffer | 5 µl | 5 µl | 5 µl |
| Poly-dI-dC (1µg/ µl) | 2 µl | 2 µl | 2 µl |
| BSA (1µg/ µl) | 2 µl | 2 µl | 2 µl |
| CBF1-Antikörper (RBJ-1F1) | - | 2 µl | - |
| unmarkierte DNA (100-facher Überschuss) | - | - | 2 µl |
| [γ - ³² P] ATP-markierte DNA | 8000 cpm | 8000 cpm | 8000 cpm |
| mit H ₂ O | auf 20 µl | auf 20 µl | auf 20 µl |

Tab. 19: Zusammensetzung der Gelelektrophorese-Proben

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe erfolgte über 6%-ige native Polyacrylamidgele in 1 x TBE-Puffer bei 6,5 V/cm für 3-4 h oder 1V/ cm über Nacht. Die Zusammensetzung der nativen Gele ist in Tab. 20 aufgeführt.

| Komponente | Volumen/Menge |
|------------------|---------------|
| H ₂ O | 27,77 µl |
| 10 x TBE pH 8,3 | 4 ml |
| 30% PAA | 8 ml |
| 10% APS | 200 µl |
| TEMED | 30 µl |

Tab. 20: Zusammensetzung eines 6%-igen Polyacrylamidgeles

Die Gele wurden bei 80°C für 2 h unter Vakuum getrocknet, mit Hilfe eines Röntgenfilmes autoradiographiert oder zur densitometrischen Quantifizierung der Protein-DNA-Komplexe mit einer Verstärkerfolie exponiert. Die Folie wurde im Phosphoimager ausgelesen und die radioaktive Emission mit Hilfe des Programms AIDA quantifiziert.

Annealing-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl

Tris/EDTA (TE): 10 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA (pH 8); 100 mM NaCl

4 x Bindepuffer: 40 mM HEPES (pH 7,9); 4 mM EDTA (pH 8); 800 mM KCl; 16% Ficoll

10 x TBE: 89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA (pH8,3)

3.5 Bioinformatische Methoden

3.5.1 Clusteranalyse der KSHV-Array-Daten

Das *unsupervised hierarchical clustering* der im KSHV-Array erhaltenen Δ Ct-Daten der KSHV-Gene im Verlauf der Reaktivierungskinetik in den K-DG75-Zelllinien, erfolgte mit Hilfe des Programms Genesis (<http://genome.tugraz.at>) (Sturn et al., 2002). Die Excell-Tabellen der Δ Ct-Werte wurden im „Text (Tabstopp-getrennt)“-Format gespeichert und im Genesis-Programm bearbeitet. Die Δ Ct-Werte wurden auf einer Skala von -2 bis +2 normalisiert. Für die Standardisierung wurde für jedes Gen der Mittelwert der Expressionswerte berechnet, dieser von den einzelnen Expressionswerten subtrahiert und das Ergebnis durch die Standardabweichung geteilt. Die graphische Darstellung der normalisierten Expressionswerte erfolgte durch eine Farbskala. Niedrige Δ Ct-Werte (+2), also hohe Expressionswerte, wurden in rot, mittlere (0) in schwarz und hohe (-2), also niedrige Expressionswerte, in grün repräsentiert. Die Clusteranalyse wurde anschließend unter Verwendung der Pearson Korrelation und des *average linkage* Algorithmus durchgeführt.

3.5.2 Promotoranalyse ausgewählter KSHV-Gene

Mit Hilfe des *MatInspector*, der Software der Firma Genomatix (<http://www.genomatix.de>), wurden die Promotorbereiche der KSHV-Gene auf potentielle CBF1-Bindungsstellen

überprüft. Die Suche nach CBF1-Bindungsstellen wurde mit der Matrixfamilie V\$RBPF, bestehend aus den Matrices V\$RBPJK.01 und V\$RBPJK.02 durchgeführt. Die Qualität der potentiellen CBF1-Bindungsstellen wurde durch die *Core* und *Matrix similarity* bewertet.

4 Ergebnisse

Im Rahmen meiner Dissertation sollte erstmals die Rolle von CBF1 auf die transkriptionelle Regulation viraler Gene nach Reaktivierung des lytischen Zyklus in KSHV-infizierten B-Zellen untersucht werden. Das Kapitel Ergebnisse gliedert sich in drei Teile.

Im **ersten Teil** meiner Arbeit wurden zelluläre Systeme etabliert, die es ermöglichten den Einfluss von CBF1 auf die Reaktivierung des lytischen Zyklus in einer Lymphomzelllinie mit B-Zell-Charakter zu analysieren.

Der **zweite Teil** befasst sich mit der Analyse und dem Vergleich der Expressionsprofile viraler Transkripte in KSHV-infizierten CBF1-positiven und -negativen B-Zelllinien mit Hilfe eines KSHV-Arrays.

Im **dritten Teil** dieser Arbeit wurden die neu identifizierten CBF1-abhängig exprimierten KSHV-Gene auf eine direkte oder indirekte Regulation durch CBF1 in Promotor-Reporterstudien und Gel-Retardationsanalysen charakterisiert.

4.1 Etablierung von KSHV-infizierten CBF1-positiven und -negativen B-Zelllinien

4.1.1 Experimentelle Durchführung der Infektion der CBF1-positiven oder -negativen B-Zelllinie DG75

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Kempkes stand die Burkitt-Lymphom B-Zelllinie DG75 (SM224.9) zur Verfügung, deren CBF1-Gene durch homologe Rekombination inaktiviert waren (Maier et al., 2005). Um den Phänotyp einer KSHV-infizierten CBF1-negativen (CBF1-ko) B-Zelllinie im direkten Vergleich zu einer infizierten CBF1-positiven, d.h. Wildtyp (wt)-B-Zelllinie, zu untersuchen, wurde die Burkitt-Lymphom B-Zelllinie DG75-wt und die im Labor bereits etablierte DG75-CBF1-ko-Linie SM224.9 ausgewählt.

Zur Infektion der DG75-wt oder CBF1-ko-Zellen wurden Virusüberstände der VK219-Zelllinie mit einer Multiplizität der Infektion von Faktor 5 (*Multiplicity of Infection*, MOI), welche das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Partikeln zu den Zielzellen beschreibt, eingesetzt. 24 Stunden nach der Inkubation wurde der Virusüberstand abgenommen und durch Medium mit 20% FKS ersetzt. Die Puromycinselektion wurde eine Woche nach Infektion mit einer Konzentration von 1 µg/ ml gestartet und im Verlauf der folgenden Wochen in 1 µg/ ml-Schritten bis zu der Endkonzentration von 4 µg/ ml, welche eine starke Toxizität bei nicht-infizierten Zellen auslöste, erhöht. Der Anteil an GFP-positiven, KSHV-infizierten Zellen wurde nach 1, 2, 4, 6 und nach 12 Wochen im Fluoreszenzmikroskop und in FACS-Analysen überprüft. Die Übersicht über die experimentelle Vorgehensweise ist in Abb. 4 schematisch dargestellt.

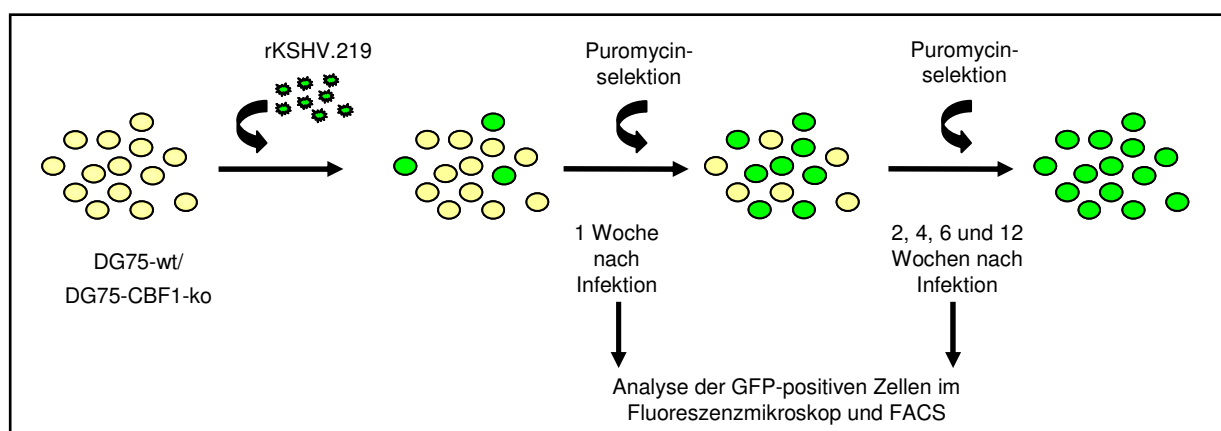


Abb. 4: Schematische Darstellung der Infektion von DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen mit rekombinantischem rKSHV.219-Virusüberstand. Je 2×10^5 DG75-wt oder CBF1-ko-Zellen wurden in 100 µl pro Loch einer 96-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit VK219-Virusüberständen mit einer MOI von

Faktor 5 infiziert und bei 32°C, für 40 min bei 300 g zentrifugiert. Der Virusüberstand wurde nach weiteren 24 Stunden gegen Medium mit 20% FKS ersetzt. Nach einer Woche wurde die Puromycinselektion mit einer Konzentration von 1 µg/ ml gestartet. Die Puromycinkonzentration wurde in 1 µg/ ml-Schritten bis zu einer Endkonzentration von 4 µg/ ml erhöht. Die Anzahl an GFP-positiven Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop und in FACS-Analysen nach 1, 2, 4, 6 und 12 Wochen ermittelt.

4.1.2 Nach Infektion und Selektion mit dem rekombinanten KSHV rKSHV.219 können B-Zellen etabliert werden, die stabil das GFP-Markergen exprimieren und das KSHV-Genom tragen

Obwohl eine Reihe von latent KSHV-infizierten B-Zellkulturen (z.B. BC-1- und BCBL-1-Zellen) aus primären Effusionslymphomen generiert werden konnte, ist im Gegensatz zu EBV die Etablierung einer latenten Langzeitkultur aus primären B-Zellen nach der Infektion mit KSHV *in vitro* bisher nicht beschrieben. Auch die stabile Infektion primärer B-Zellen oder etablierter Kulturzelllinien mit B-Zell-Charakter konnte bisher nicht gezeigt werden (Chen and Lagunoff, 2005).

Es war also nicht vorhersagbar, wie sich die KSHV-Infektion in der Burkitt-Lymphom B-Zelllinie DG75-wt oder CBF1-ko entwickeln würde, d.h. wie hoch der prozentuale Anteil an KSHV-positiven Zellen nach Infektion sein würde, wie lange es dauern würde, eine latent KSHV-infizierte Kultur durch Selektion zu etablieren, und wie lange das KSHV-Genom in diesen hochproliferierenden Zellen ohne Puromycinselektionsdruck erhalten bleiben würde.

Um die Infektion der DG75-wt und CBF1-ko-Zellen zu verfolgen, wurde über 6 Wochen und nach 12 Wochen der Anteil an GFP-positiven Zellen im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 5A) und in FACS-Analysen (Abb. 5B und C) überprüft.

Eine Woche nach der Infektion konnten sowohl in den DG75-wt- als auch in den CBF1-ko-Linien im Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszierende Zellen beobachtet werden. Es war jedoch nicht möglich zu unterscheiden, ob es sich dabei um eine schwache GFP-Expression in den DG75-Zellen oder um den Nachweis des GFP-Markers aus dem Virusüberstand der VK219-Zellen handelte, der in die Empfängerzellen über Membranvesikel passiv transferiert wurde oder sich auf der Zelloberfläche abgesetzt hatte. Diese Beobachtung wurde aber nicht weiter verfolgt. In der zweiten Woche, nach Start der Puromycinselektion, konnten einzelne GFP-exprimierende Zellen in den wt- und CBF1-negativen-Zellkulturen detektiert werden. Im Verlauf der folgenden Wochen zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme bzw. Proliferation an puromycinresistenten, GFP-positiven B-Zellen im Mikroskop. Nach 6 Wochen waren mit dem Auge nur noch einzelne GFP-negative Zellen zu beobachten (Abb. 5A).

Um den prozentualen Anteil an GFP-positiven wt- und CBF1-ko-DG75 zu bestimmen, wurden parallel zu den Mikroskopieaufnahmen FACS-Analysen durchgeführt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, um mögliche Anhaftungen von GFP-Partikeln zu beseitigen. Zur Aufnahme der Zellen im FACS wurde die Einstellung der Fluoreszenzintensität so gewählt, dass nicht-infizierte DG75-wt- oder CBF1-ko-Zellen, die im *Forward* und *Sideward Scatter*-Dot-Plot der lebenden Population entsprachen, im GFP-negativen Bereich der x-Achse (M1) lagen. Maximal 1% dieser Zellen war im GFP-positiven Bereich (M2) des Histogramms lokalisiert.

Wie aus dem Histogramm und Säulendiagramm ersichtlich, zeigte sich in der ersten Woche nach der Infektion sowohl in den DG75-wt- als auch in den CBF1-ko-Zellen eine deutliche Verschiebung der Zellpopulation auf der x-Achse in den M2-Bereich (wt 19% (\pm 9%), ko 32% (\pm 10%)). In der zweiten Woche, in welcher die Puromycinselektion gestartet wurde, kam es in beiden DG75-Linien zu einem leichten Abfall GFP-positiver Zellen (wt 10% (\pm 6%), ko 26% (\pm 8%)). Nach der vierten (wt 66% (\pm 34%), ko 77% (\pm 30%)) und sechsten (wt 82% (\pm 23%), ko 91% (\pm 11%)) Woche der Infektion, zeigte sich für beide Zelllinien eine deutliche Zunahme der GFP-positiven Zellpopulation. Nach der Kultivierung dieser Linien für 12 Wochen waren in der wt-Linie 99,1% (\pm 0,5%) und in der CBF1-negativen Linie 99,4% (\pm 0,1%) der Zellen GFP-positiv (Abb. 5B und C).

Mit Hilfe des geometrischen Mittelwertes, der als logarithmischer Durchschnitt der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) GFP-positiver Zellen definiert ist, wurde die MFI im Verlauf der KSHV-Infektion betrachtet. Durch den Student'schen t-Test (zweiseitig, gepaart) wurde der signifikante Unterschied (p) zwischen den nicht-infizierten und infizierten Zellen ermittelt. Für die Negativkontrollen, nicht-infizierte DG75-wt- oder CBF1-ko-Linien, wurde eine MFI im GFP-positiven M2-Bereich des Histogramms von maximal 6,4 (\pm 6,2) detektiert, wobei der Durchschnitt der M1- und M2-Region bei einem Wert von 1,7 (\pm 0,3) lag.

Die MFI des GFP-positiven M2-Bereiches der infizierten DG75-wt-Zellen betrug in der ersten Woche 23,1 (\pm 6,0) (p= 0,000005), in der zweiten Woche 24,9 (\pm 2,8) (p= 0,003) und nach vier Wochen 27,4 (\pm 12,0) (p= 0,02). Ab der sechsten Woche konnte eine deutliche Zunahme der MFI auf 92,3 (\pm 55,0) (p= 0,02) in den wt-Zellen beobachtet werden. In der etablierten Langzeitkultur stabilisierte sich der Wert der MFI auf 135,2 (\pm 42,6) (p= 0,0003). Die MFI der gesamten infizierten DG75-wt-Zellpopulation, also der Durchschnitt der M1- und M2-Region, zeigte ab der ersten Woche einen signifikanten Unterschied zu den nicht-infizierten Zellen (4,17 (\pm 0,58), p= 0,0003). Nach 6 Wochen wurde für den M1- und M2-

Bereich eine MFI von 50,9 (\pm 37,6) ($p= 0,007$) ermittelt. Für die KSHV-infizierte DG75-wt-Langzeitkultur von 12 Wochen zeigte sich ein Wert von 110,7 (\pm 37,9) ($p= 0,0004$).

Für die KSHV-infizierten CBF1-negativen DG75-Zellen zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. Die MFI des GFP-positiven M2-Bereiches nahm im Verlauf der Wochen kontinuierlich zu (Woche 1: 21,7 (\pm 4,0), $p= 0,0001$, Woche 2: 39,6 (\pm 22,2), $p= 0,03$, Woche 4: 66,4 (\pm 20,0), $p= 0,04$). Nach 6 Wochen befand sich die MFI in den CBF1-ko-Zellen bei 101,9 (\pm 75,1) ($p= 0,009$) und pendelte sich in der Langzeitkultur nach 12 Wochen auf einen Wert von 271,7 (\pm 63,5) ($p= 0,002$) ein. Für die MFI der gesamten DG75-CBF1-ko-Population aus M1 und M2 konnte nach der ersten Woche ein Wert von 6,1 (\pm 2,1) ermittelt werden, der einen signifikanten Unterschied zu den nicht-infizierten Zellen aufwies ($p= 0,004$). Die MFI nahm nach 4 Wochen (59,8 (\pm 40,0), $p= 0,04$) und erneut nach 12 Wochen (192,4 (\pm 83,2), $p= 0,001$) deutlich zu (Abb. 5B).

Innerhalb von 6 Wochen konnten aus einer niedrigen Frequenz GFP-positiver Zellen durch die Puromycinselektion sowohl mit den DG75-wt- als auch mit den CBF1-ko-Zellen, GFP-positive B-Zelllinien etabliert werden, die im Folgenden als K-DG75-wt- oder K-DG75-CBF1-ko-Zellen bezeichnet werden. Insgesamt konnten 14 KSHV-infizierte Linien der DG75-wt-Zellen und 13 der CBF1-negativen Variante in unabhängig durchgeführten Experimenten nach Infektion mit unabhängig präparierten VK219-Virusüberständen etabliert werden.

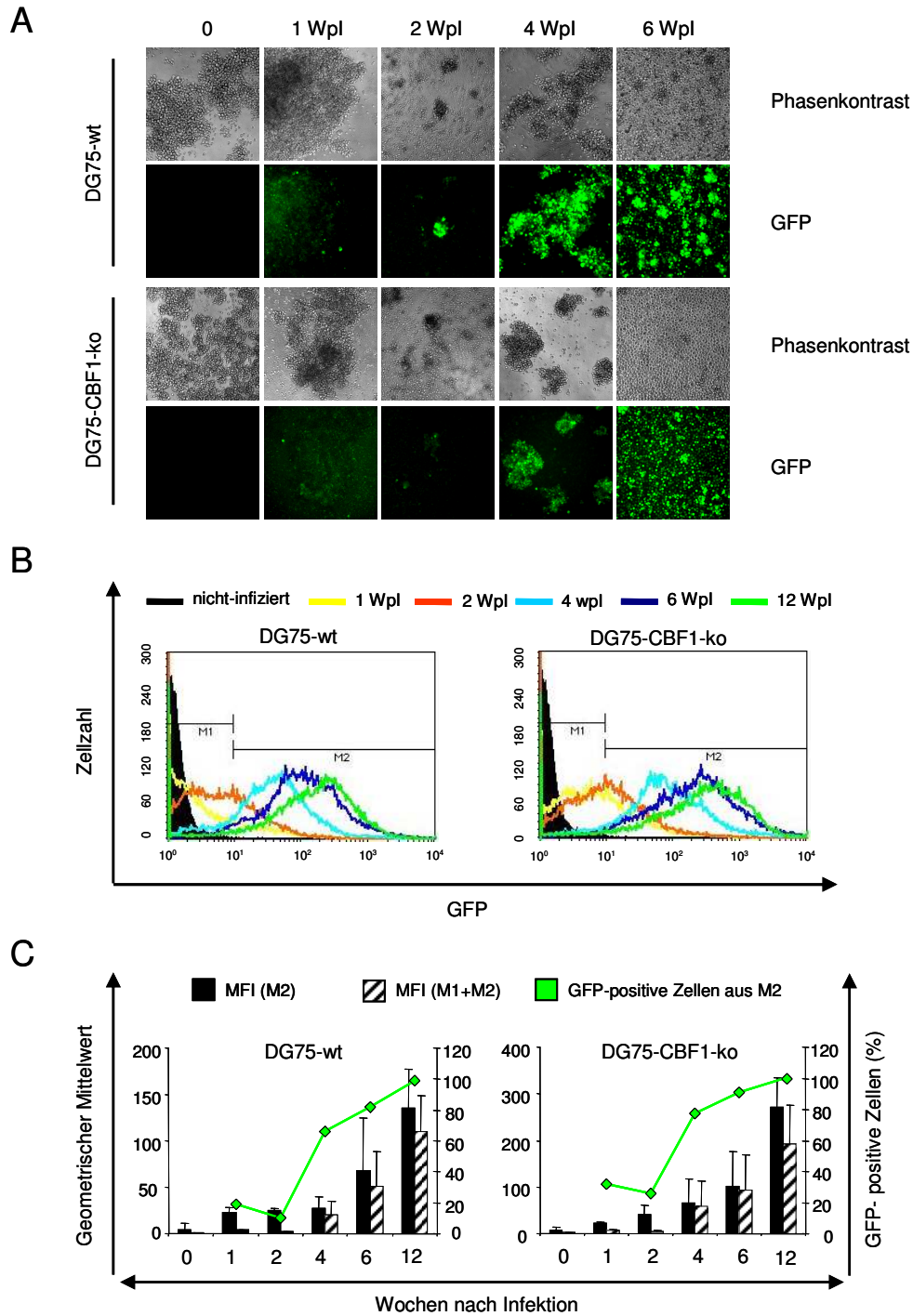


Abb. 5: Die Infektion von DG75-wt- und CBF1-ko-Zelllinien mit dem rekombinanten Virus rKSHV.219 und die Selektion GFP-positiver KSHV-infizierter Zellen. (A) Die Infektion der DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen konnte durch die GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop nach 1, 2, 4 und 6 Wochen (Wpl) beobachtet werden. Die Bilder zeigen eine repräsentative Infektion. (B) und (C) Der prozentuale Anteil an GFP-positiven Zellen und der geometrische Mittelwert, der die Zunahme der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der GFP-positiven Zellen angibt, wurde in FACS-Analysen nach 1, 2, 4, 6 und nach 12 Wochen ermittelt. (B) Im Histogramm ist die Zunahme an GFP-positiven Zellen eines repräsentativen Experimentes dargestellt. (C) Gezeigt sind der geometrische Mittelwert und der entsprechende prozentuale Anteil an GFP-positiven Zellen der infizierten DG75-wt- und CBF1-ko-Linien über den Zeitraum von 6 Wochen und nach 12 Wochen. Das Liniendiagramm (rechte y-Achse) zeigt den Anteil an GFP-positiven DG75-wt- oder CBF1-ko-Zellen. Die Säulen (linke y-Achse) repräsentieren den geometrischen Mittelwert der M1- oder des Durchschnitts der M1- und M2-Population der infizierten DG75-wt- und CBF1-ko-Linien zu den verschiedenen Zeitpunkten. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus Ansätzen im Triplikate zweier unabhängiger Experimente.

Liang et al. konnte sowohl in den CBF1-positiven als auch in den -negativen murinen Fibroblasten die Etablierung der latenten Lebensphase nach der Infektion mit KSHV durch die Expression des latenten KSHV-Proteins LANA nachweisen (Liang and Ganem, 2003).

Um in den etablierten K-DG75-Linien den latenten, nicht-induzierten Zustand zu überprüfen und zwischen den CBF1-positiven und -negativen Zellen zu vergleichen, wurde die RNA dieser Zellen isoliert, mit DNase verdaut, mittels reverser Transkription zu cDNA umgeschrieben und anschließend in *real-time* PCR-Analysen mit spezifischen Primern für das latente Marker-Gen ORF73/LANA eingesetzt. Zur Auswertung der *real-time* PCR-Daten wurde die relative Transkriptmenge des ausgewählten KSHV-Gens unter Berücksichtigung der Amplifikationseffizienz des verwendeten Primerpaares, relativ zu einer genspezifischen Kalibratorprobe, bestimmt und auf das Referenzgen beta-Aktin normalisiert. Im nicht-induzierten Zustand der Zellen konnte die Expression von ORF73/LANA nachgewiesen werden, wobei sich keine signifikanten Unterschiede im Transkriptniveau zwischen den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Linien zeigten (Abb. 6).

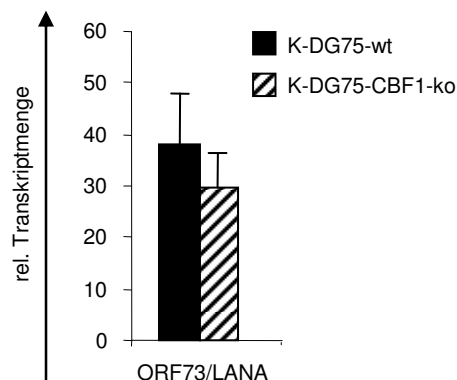


Abb. 6: Das Transkriptniveau des latenten Gens ORF73/LANA weist zwischen den nicht-induzierten wt- und CBF1-negativen Zellen keine Unterschiede auf. Aus je 5×10^6 K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Zellen wurde die RNA isoliert, mit DNase verdaut und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde für *real-time* PCR-Analysen mit spezifischen Primern eingesetzt. Die relative Transkriptmenge von ORF73/LANA wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Amplifikationseffizienz relativ zu einer genspezifischen Kalibratorprobe, nach interner Normalisierung auf beta-Aktin, berechnet. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente.

Nach 12 Wochen Kultivierung der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen unter Puromycinselektion konnte für beide Linien ein konstant hoher Anteil an GFP-positiven Zellen von ca. 100% nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der MFI zeigten sich jedoch Abweichungen zwischen den wt- und CBF1-negativen Zellen. So war in den CBF1-negativen Zellen der Wert für die MFI ($271,7 (\pm 63,5)$) beinahe 2-fach höher als in den wt-Zellen ($135,2 (\pm 42,6)$). Die stärkere Fluoreszenzintensität basiert auf einer erhöhten GFP-Expression in den CBF1-

negativen Zellen und könnte auf eine erhöhte Anzahl an viralen Genomen in der CBF1-ko-Linie zurückzuführen sein.

Um die Anzahl der KSHV-Genome zwischen der wt- und CBF1-ko-Linie zu vergleichen, wurde die genomische DNA der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Linie isoliert. Als Kontrolle wurde parallel die genomische DNA der KSHV-positiven Zelllinie BCBL-1 präpariert. Die DNA wurde in *real-time* PCR-Analysen mit spezifischen Primern gegen das zweite Exon und gegen ein Fragment im Promotorbereich des ORF50/Rta-Gens eingesetzt. Die relative Menge an viraler DNA wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Amplifikationseffizienz der verwendeten Primerpaare, relativ zu einer genspezifischen Kalibratorprobe, bestimmt und auf das zelluläre Referenzgen GAPDH normalisiert.

Als erstes fiel der massive Unterschied des viralen DNA-Gehalts zwischen den BCBL-1-Zellen und den K-DG75-Linien auf. So war die Menge an Virus-DNA in den BCBL-1-Zellen 6,8 ($\pm 1,5$)-fach höher als in den K-DG75-Zellen. Die Analyse beider Genorte zeigte aber, dass die K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen in etwa die gleiche Anzahl an Viruskopien aufwiesen (Abb. 7).

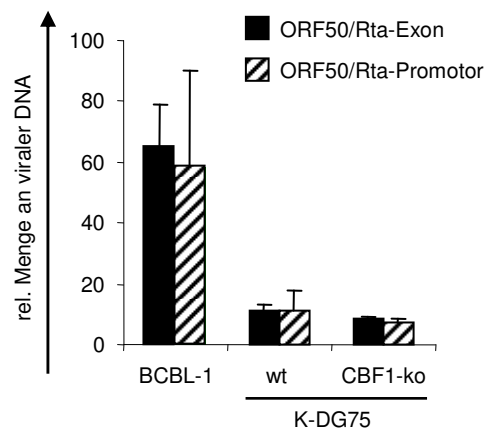


Abb. 7: Vergleich der Anzahl viraler Genome zwischen den wt- und CBF1-negativen Zellen. Aus je 5×10^6 wt- oder CBF1-ko-K-DG75-Zellen wurde die genomische DNA isoliert. Als Kontrolle wurde parallel die genomische DNA der KSHV-positiven Zelllinie BCBL-1 präpariert. Die genomische DNA wurde mittels *real-time* PCR mit spezifischen Primern gegen das zweite Exon und gegen ein Fragment im Promotorbereich des ORF50/Rta-Gens analysiert. Die relative Menge an viraler DNA, gemessen an dem relativen Gehalt der Amplifikate des ORF50/Rta-Gen-Fragments oder des ORF50/Rta-Promotor-Fragments, wurde nach interner Normalisierung auf GAPDH, relativ zu einer primerspezifischen Kalibratorprobe, bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente.

Da eine ungleiche Verteilung an KSHV-Genomen zwischen den wt- und CBF1-ko-K-DG75-Zellen ausgeschlossen werden konnte, wäre eine weitere mögliche Erklärung für die erhöhte MFI in den CBF1-negativen Zellen eine stärkere Induktion des EF-1 α -Promotors, über welchen die GFP-Expression kontrolliert wird. Da diese Beobachtungen aber bisher nur auf

der Analyse von zwei K-DG75-Linien basieren, ist es nicht möglich, eine endgültige Aussage zu treffen. Es ist daher notwendig, die MFI weiterer K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Linien zu überprüfen.

4.1.3 Die Kultivierung der wt- und CBF1-ko-K-DG75-Zellen ohne Puromycin führt kontinuierlich zum Verlust der GFP-Expression

Um die Stabilität der KSHV-Infektion in den K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen im Verlauf einer Langzeitkultivierung unter Puromycinselektionsdruck zu überprüfen, wurden die wt- und CBF1-ko-K-DG75-Zellen zweimal in der Woche auf 2×10^5 Zellen pro ml eingestellt und der prozentuale Anteil an GFP-positiven Zellen sowie die MFI über 6 Wochen in FACS-Analysen bestimmt. Die eingesetzten Zelllinien waren zu Beginn des Experimentes bereits 5 Monate in Kultur.

Bei Betrachtung der Anzahl an GFP-positiven Zellen konnte im Verlauf der 6 Wochen weder in den wt- noch in den CBF1-negativen DG75-Zellen eine Veränderung detektiert werden. Auch der Vergleich der 5 Monate alten Langzeitkultur unter Puromycinselektion mit den 12 Wochen alten Infektionen zeigte keinen Unterschied hinsichtlich der Anzahl an GFP-positiven Zellen. Die MFI der GFP-positiven Zellpopulation hingegen war in der Langzeitkultur im Vergleich zu den 12 Wochen alten Linien deutlich erhöht. So konnte für die wt-Linie nach 12 Wochen Puromycinselektion ein Wert von 135,2 und nach mindestens 5 Monaten Kultivierung von 332,7 detektiert werden. Für die CBF1-negativen Zellen, ließ sich nach 12 Wochen eine MFI von 271,7 und nach mindestens 5 Monaten Kultivierung eine MFI von 571,4 ermitteln. Der Mittelwert der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität über die 6 Wochen lag bei den K-DG75-wt-Zellen bei 302,7 ($\pm 143,9$) und bei den K-DG75-CBF1-ko-Zellen bei 542,7 ($\pm 209,2$). Die hohen Standardabweichungen verdeutlichen, dass die GFP-Expression kein konstantes Niveau im Verlauf der Kultivierung der KSHV-infizierten B-Zellen einnimmt (Abb. 8).

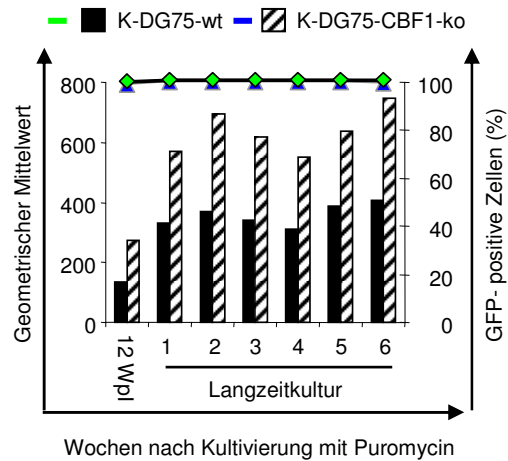


Abb. 8: Die KSHV-Infektion der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen bleibt im Verlauf einer Langzeitkultivierung unter Puromycins Selektion stabil. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (geometrischer Mittelwert) der wt- und CBF1-ko-K-DG75-Linien, die über 5 Monate unter Puromycins Selektionsdruck kultiviert wurden, wurde über 6 Wochen (W) in FACS-Analysen überprüft und im Vergleich zu Linien, die vor 12 Wochen infiziert worden waren (12 WpI), betrachtet. Dargestellt sind der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen (rechte y-Achse, Liniendiagramm) und der geometrische Mittelwert (linke y-Achse, Säulendiagramm), als Maß für die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der GFP-positiven Zellen, über den Zeitraum von 6 Wochen.

Um zu überprüfen, wie lange eine GFP-positive Population in der schnell proliferierenden Burkitt-Lymphom B-Zelllinie K-DG75-wt oder CBF1-ko ohne Puromycins Selektion erhalten bleibt, wurden die K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen zweimal in der Woche auf 2×10^5 Zellen pro ml eingestellt und in Medium ohne Puromycin kultiviert. Über 10 Wochen wurde in FACS-Analysen der prozentuale Anteil an GFP-positiven Zellen bestimmt.

Im Verlauf der 10 Wochen zeigte sich sowohl in der KSHV-wt- als auch in der CBF1-ko-Linie eine kontinuierliche Abnahme von ca. 10% GFP-positiver Zellen pro Woche. Am Ende des Experimentes konnte für die wt-Linie ein Rückgang auf 32% und für die ko-Linie auf 22% GFP-positiver Zellen ermittelt werden (Abb. 9A und B). Nach Langzeitkultivierung (mindestens 5 Monate) unter Puromycins Selektionsdruck betrug die MFI bei den K-DG75-wt-Zellen 302,7 und bei den CBF1-ko-Zellen 542,7. Ohne Puromycin ließ sich im Zeitraum von 8 Wochen eine allmähliche Abnahme der MFI für die GFP-positive Zellpopulation (M2-Bereich) beobachten. Nach 10 Wochen kam es sowohl bei der wt- als auch bei der CBF1-ko-K-DG75-Linie zum deutlichen Abfall der MFI (MFI: wt 86,4, MFI: ko 149,1). Die Abnahme der MFI in der GFP-positiven Population der K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Zelllinie nach Kultivierung ohne Puromycin könnte auf den Rückgang der Anzahl von Viruskopien pro Zelle durch den fehlenden Puromycins Selektionsdruck hinweisen (Abb. 9B).

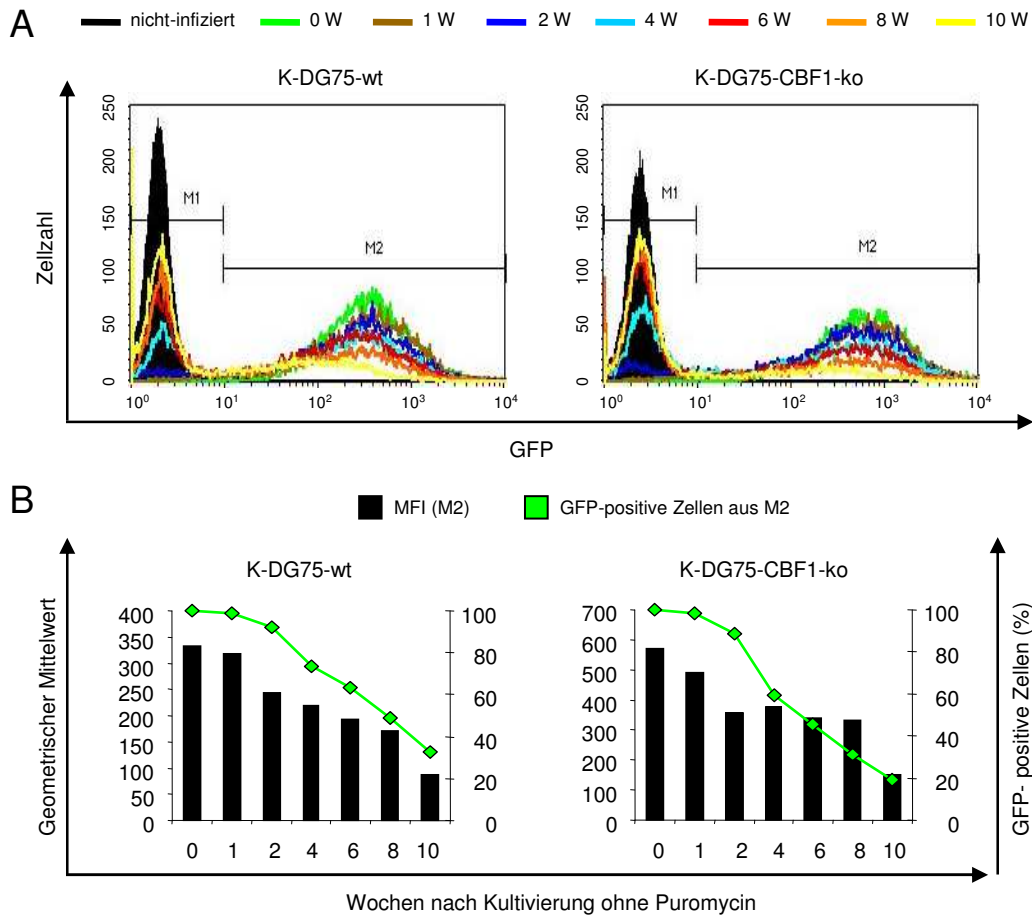


Abb. 9: Nach Absetzen der Puromycinselktion kommt es zur Abnahme der GFP-positiven K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen. Um die Stabilität der KSHV-Infektion in den DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen über 10 Wochen in Medium ohne Puromycin kultiviert. Mittels FACS-Analysen wurde der Anteil an GFP-positiven Zellen nach 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Wochen (W) bestimmt. (A) Das Histogramm zeigt die Abnahme der GFP-positiven Zellen nach Absetzen des Selektionsmittels Puromycin im Verlauf von 10 Wochen. Die Zellzahl ist gegen die GFP-Fluoreszenzintensität (x-Achse) aufgetragen. (B) Dargestellt sind der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen (rechte y-Achse, Liniendiagramm) und der geometrische Mittelwert (linke y-Achse, Säulendiagramm), als Maß für die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der GFP-positiven Zellen, über den Zeitraum von 10 Wochen.

4.1.4 Reaktivierung des lytischen Zyklus der KSHV-infizierten B-Zellen

4.1.4.1 Die Behandlung mit NaB induziert die Expression der frühen lytischen Gene in 2% der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen

Die Arbeitsgruppe von D. Ganem konnte nach Überexpression von ORF50/Rta in den KSHV-infizierten CBF1-negativen murinen Fibroblasten die Reaktivierung des lytischen Zyklus und die Expression früher lytischer Gene nicht beobachten. Die Experimente basierten auf dem Nachweis bestimmter KSHV-Proteine in Immunfluoreszenzstudien mit spezifischen Antikörpern gegen ORF73/LANA oder den lytischen Markerproteinen ORF50/Rta, ORF59 und K8 (Liang and Ganem, 2003).

Es war nun von großem Interesse, die Reaktivierung des lytischen Zyklus in den KSHV-infizierten B-Zellen zu überprüfen und zwischen den CBF1-ko- und den wt-K-DG75-Zellen zu vergleichen. Der Vorteil des hier etablierten Zellsystems war, mit Hilfe der RFP-Expression, die über das *immediate-early* Gen ORF50/Rta reguliert wird, die lytische Reaktivierung direkt nach chemischer Induktion nachweisen zu können. Nachdem im Fluoreszenzmikroskop die Expression von RFP überprüft wurde, wurde in FACS-Analysen der Anteil an reaktivierten GFP-RFP-doppelt-positiven Zellen quantitativ bestimmt.

Die K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen wurden mit 3 mM Natriumbutyrat (NaB) induziert und in Medium ohne Puromycin kultiviert. Nach 48 Stunden konnte im Fluoreszenzmikroskop sowohl in der wt- als auch in der CBF1-ko-Zelllinie GFP-RFP-doppelt-positiv Zellen beobachtet werden (Abb. 10A).

Um den Anteil an lytisch reaktivierten GFP-RFP-doppelt-positiven Zellen nach chemischer Induktion zu quantifizieren und zwischen der wt- und CBF1-ko-Zelllinie zu vergleichen, wurde der prozentuale Anteil an GFP-RFP-exprimierenden Zellen in der latenten Phase sowie 48 Stunden nach der NaB-Induktion im Durchflusszytometer (MoFlo) von je 6 Linien der etablierten K-DG75-wt- oder CBF-ko-Zellen analysiert. Als Positivkontrolle wurde die KSHV-positive Vero-Zelllinie VK219, welche unter den gleichen Bedingungen induziert wurde, mitgeführt. Für die Voreinstellungen des Durchflusszytometers wurde die im Labor bereits etablierte GFP-positive Zelllinie UH39.3, die RFP-positive Zelllinie SM295 und nicht-infizierte, GFP-RFP-negative DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen verwendet.

In Abb. 10B ist ein repräsentatives Beispiel für die analysierten Zelllinien vor und nach der NaB-Induktion dargestellt. Nach der NaB-Induktion waren 27% der VK219-Kontrollzellen GFP-RFP-doppelt-positiv. Für die K-DG75-wt-Linie konnten nur 2% und für die CBF1-ko-Linie 4% der Gesamtpopulation als GFP-RFP-doppelt-positiv ermittelt werden. Im Punktdiagramm ist der prozentuale Anteil an GFP-RFP-doppelt-positiven Zellen der verschiedenen getesteten K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Zelllinien dargestellt. Für die wt-Linien zeigte sich eine durchschnittliche Reaktivierbarkeit von 1,83% ($\pm 1,1\%$) der Gesamtpopulation. Bei den K-DG75-CBF1-ko-Linien wurde ein vergleichbarer Anteil an GFP-RFP-doppelt-positiven Zellen von 2,02% ($\pm 1,4\%$) ermittelt (Abb. 10B).

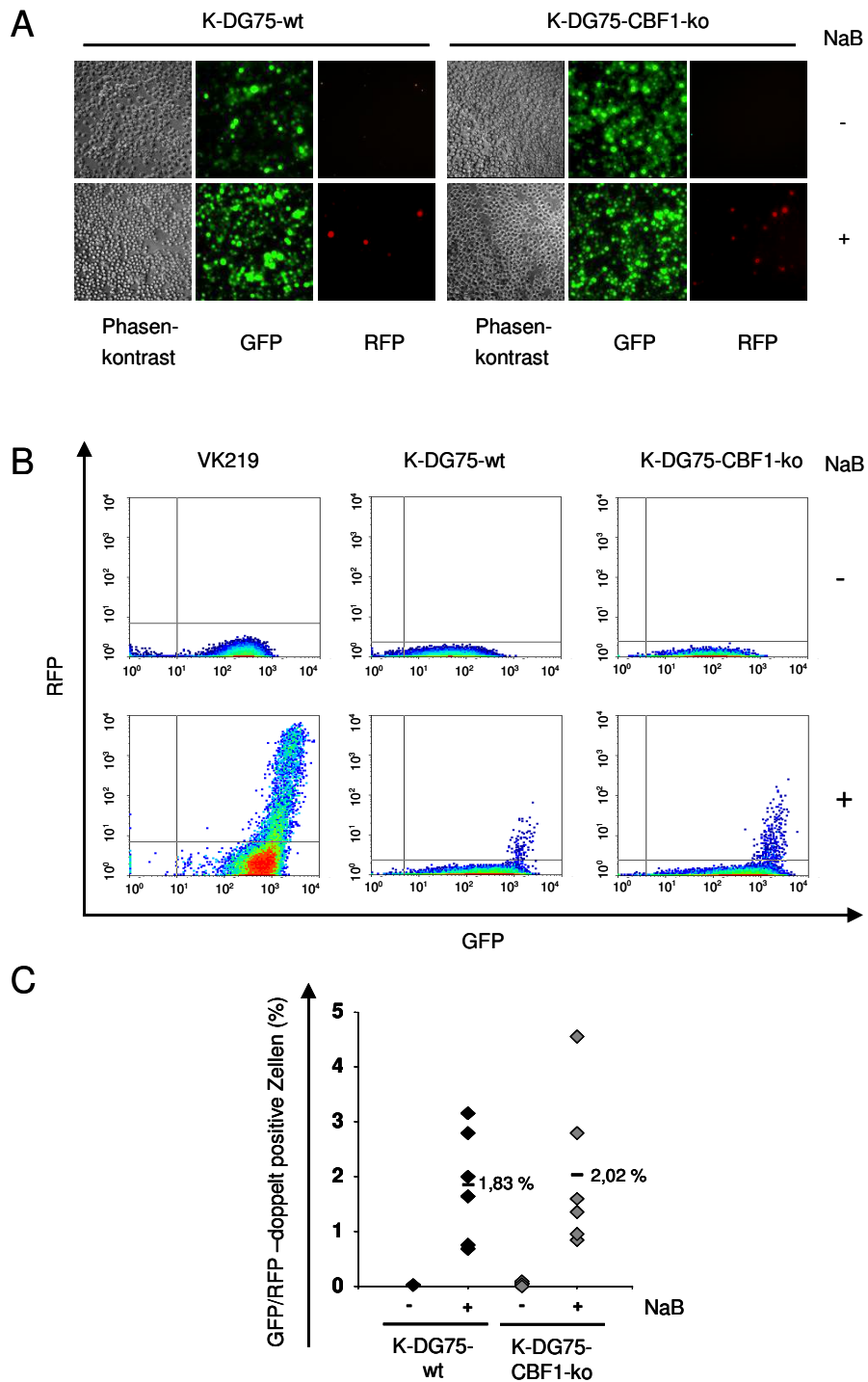


Abb. 10: 48 Stunden nach der NaB-Induktion sind durchschnittlich 2% der KSHV-infizierten DG75-wt- und CBF1-ko-Zelllinien GFP-RFP-doppelt-positiv. Je 6 K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Zelllinien wurden in einer Zelldichte von 4×10^5 Zellen/ml ausgesät und mit 3 mM NaB für 48 Stunden induziert. Als Kontrolle wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml der KSHV-positiven VK219-Linie einen Tag zuvor ausgesät und parallel unter den gleichen Konditionen induziert. Die im rKSHV.219-Genom inserierte RFP-Kassette steht unter der Kontrolle des PAN-Promoters, welcher durch das *immediate-early* Gen ORF50/Rta reguliert wird. Die initiale Phase der lytischen Reaktivierung wurde mittels der RFP-Expression des PAN-RFP-Reportergens nachgewiesen. (A) Die K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Zellen wurden in einer 6-Lochplatte im Mikroskop vor und 48 Stunden nach der NaB-Induktion im Phasenkontrast, GFP- oder RFP-Fluoreszenzkanal aufgenommen. (B) Der prozentuale Anteil an lytischen GFP-RFP-doppelt-positiven Zellen der K-DG75-Zelllinien wurde im FACS (MoFlo) bestimmt. Als Positivkontrolle diente die VK219-Zelllinie. Dargestellt ist der Dot-Plot eines repräsentativen Beispiels (GFP auf der x-Achse gegen RFP auf der y-Achse aufgetragen). (C) Im Punktdiagramm sind die Mittelwerte aus dem prozentualen Anteil lebender GFP-RFP-doppelt-positiver Zellen zweier unabhängiger Experimente dargestellt.

Nach chemischer Induktion der latenten K-DG75-Linien mit 3 mM NaB waren sowohl in der wt- als auch in der CBF1-ko-Linie durchschnittlich 2% der Zellen GFP-RFP-doppelt-positiv. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in den CBF1-negativen murinen Fibroblasten konnte in den K-DG75-CBF1-ko-Linien die Expression früher lytischer Gene detektiert werden.

4.1.4.2 Nach Induktion des lytischen Zyklus produzieren nur die CBF1-positiven K-DG75-Zellen infektiöse Viruspartikel

In KSHV-infizierten CBF1-negativen murinen Fibroblasten konnte auch nach ektopischer Überexpression des lytischen Transaktivators ORF50/Rta weder die Expression lytischer Gene noch die Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln nachgewiesen werden (Liang and Ganem, 2003). Die chemische Induktion der KSHV-infizierten DG75-Zellen hingegen führte sowohl in den CBF1-ko- als auch in den wt-Linien zur lytischen Reaktivierung und Expression der frühen lytischen Gene ORF50/Rta und PAN.

Um zu überprüfen, ob nach Reaktivierung des lytischen Zyklus in den K-DG75-Zellen die Produktion von infektiösen Viruspartikeln stattfindet, wurden die CBF1-ko- und wt-Zellen für vier Tage mit NaB induziert. Die Zellkulturüberstände wurden sterilfiltriert und im Verhältnis 1:100 aufkonzentriert. Die Infektionseffizienz des CBF1-ko- und wt-Überstandes wurde in Infektionsstudien mit HEK293-Zellen getestet. Die HEK293-Zellen wurden in einer 96-Lochplatte ausgesät und mit aufkonzentriertem CBF1-ko- oder wt-Virusüberstand infiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen in normalem Medium mitgeführt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen auf eine 12-Lochplatte überführt und im Verhältnis 1:10 mit Medium ohne oder mit Puromycin in einer Endkonzentration von 2 µg/ml kultiviert. Durch die Puromycins Selektion sollte das Auswachsen von infizierten Zellen und das Absterben von nicht-infizierten Zellen gefördert werden. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Infektionsrate der jeweiligen Virusüberstände in FACS-Analysen und im Fluoreszenzmikroskop durch den Anteil an lebenden GFP-positiven Zellen überprüft. Der Versuchsablauf ist in Abb. 11 schematisch dargestellt. Es wurden die Überstände von je zwei verschiedenen K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Linien getestet.

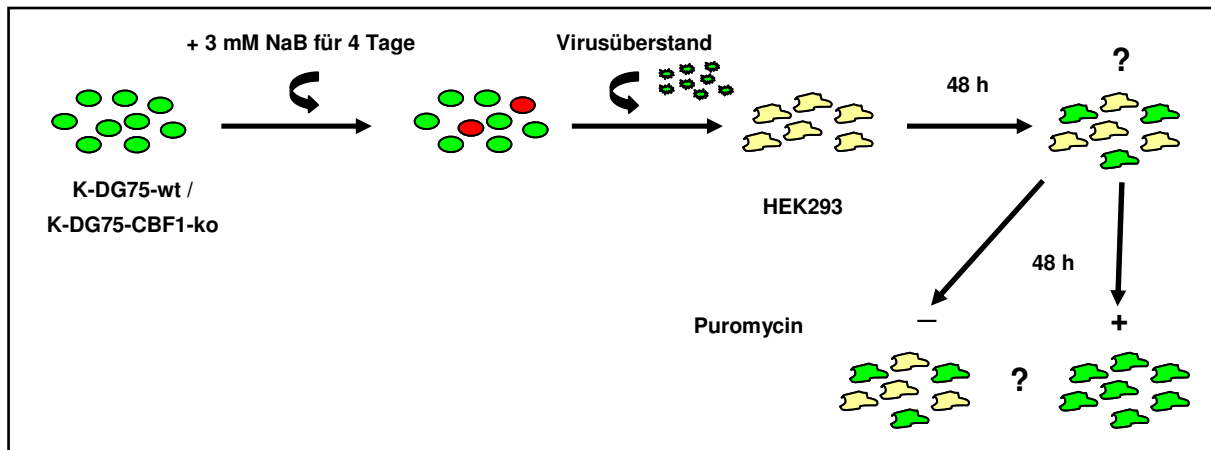


Abb. 11: Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung der HEK293-Infektionsstudien mit K-DG75-wt- und CBF1-ko-Virusüberständen. Die KSHV-infizierten DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen wurden in einer Zelldichte von 4×10^5 Zellen/ ml in Medium ohne Puromycin ausgesät und mit 3 mM NaB induziert. Nach 4 Tagen wurden die Zellkulturüberstände sterilfiltriert und mittels Ultrazentrifugation im Verhältnis 1:100 aufkonzentriert. Zur Untersuchung der Virusproduktion wurden mit diesen Virusüberständen Infektionsstudien mit HEK293-Zellen durchgeführt. Je 3×10^4 HEK293-Zellen wurden in 100 μ l pro Loch einer 96-Lochplatte ausgesät, nach 24 Stunden mit aufkonzentrierten Virusüberständen der K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Linien infiziert und bei 32°C und 300 g für 40 min zentrifugiert. Als Negativkontrolle wurden parallel nicht-infizierte HEK293-Zellen mitgeführt. Nach 48 Stunden (h) wurden die Zellen auf eine 12-Lochplatte überführt und im Verhältnis 1:10 mit Medium ohne oder mit Puromycin in einer Endkonzentration von 2 μ g/ ml ausverdünnt. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Infektionsrate der jeweiligen Virusüberstände durch FACS-Analysen und Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

Die Inkubation der HEK293-Zellen mit den Virusüberständen der K-DG75-wt oder CBF1-ko-Linie führte nach 48 Stunden nur bei den Zellen, die mit wt-Überstand behandelt waren, zum Nachweis einer GFP-positiven Zellpopulation. Dabei ließ sich im Vergleich zu den Virusüberständen der VK219-Linie, die sich besonders gut zur Virusproduktion eignet, eine Infektiosität von nur ca. 2×10^3 infektiöse Einheiten pro ml wt-Überstand ermitteln. Für die VK219-Virusüberstände wurde in der Regel eine Infektiosität von 10^5 - 10^6 IU/ ml Überstand berechnet.

Nach weiteren 48 Stunden Kultivierung der nicht-infizierten HEK293-Kontrollzellen mit Puromycin konnte, im Vergleich zu den Zellen in Medium ohne Selektionsmittel, im Fluoreszenzmikroskop ein stark toxischer Effekt beobachtet werden. Für die HEK293-Zellen, die mit wt-Virusüberständen infiziert wurden, war ein hoher Anteil infizierter GFP-positiver Zellen nachzuweisen. Die Zugabe von Puromycin erhöhte die Frequenz an KSHV-infizierten Zellen. Im Gegensatz dazu konnten bei den HEK293-Zellen, inkubiert mit den Überständen der CBF1-ko-Zellen, weder in den Ansätzen mit noch in den Ansätzen ohne Puromycin, GFP-exprimierende Zellen detektiert werden. Die Kultivierung mit Puromycin zeigte eine deutlich toxische Wirkung auf die Viabilität dieser Zellen (Abb. 12A).

Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde der prozentuale Anteil an GFP-positiven HEK293-Zellen bestimmt. Parallel konnte im Dot-Plot (*Forward scatter, Sideward scatter*) die Viabilität der Zellen nach Zugabe von Puromycin beobachtet werden. Nicht-infizierte, unbehandelte Zellen wurden für die FACS-Einstellungen eingesetzt, um eine Region (R1) festzulegen, in welcher die Hauptpopulation der lebenden Zellen lokalisiert war. Mit den Puromycinbehandelten Kontrollzellen wurde eine weitere Region (R2) festgelegt, welche den Anteil an toten Zellen repräsentierte. Ohne Puromycin betrug der prozentuale Anteil an Zellen in R2 sowohl bei den HEK293-Kontrollzellen als auch bei den mit wt- oder CBF1-ko-Überstand infizierten HEK293-Zellen maximal 3%. Für die mit Puromycin kultivierten HEK293-Zellen, infiziert mit K-DG75-wt-Überständen, zeigte sich eine leichte Zunahme der R2-Zellpopulation (13-18%). Im Vergleich dazu konnte bei den Kontrollzellen eine Erhöhung von 52% und bei den mit CBF1-ko-Überständen infizierten Zellen von 45-50% der Gesamtpopulation im R2-Bereich beobachtet werden (Abb. 12B).

Weder für die Kontrollzellen noch für die mit CBF1-ko-Überstand behandelten HEK293-Zellen konnte eine GFP-positive Zellpopulation detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte für die mit wt-Überstand infizierten HEK293-Zellen bis zu 82% der Zellen als GFP-positiv identifiziert werden. Die Zugabe von Puromycin zum Kulturmedium dieser Zellen bewirkte einen weiteren Anstieg von 10% an GFP-positiven Zellen (Abb. 12C).

Obwohl in den CBF1-negativen Zellen die frühen Ereignisse der lytischen Reaktivierung durch die Expression der frühen lytischen Gene ORF50/Rta und PAN nachgewiesen werden konnte, war die Produktion von infektiösen Virionen in Abwesenheit von CBF1 nicht möglich.

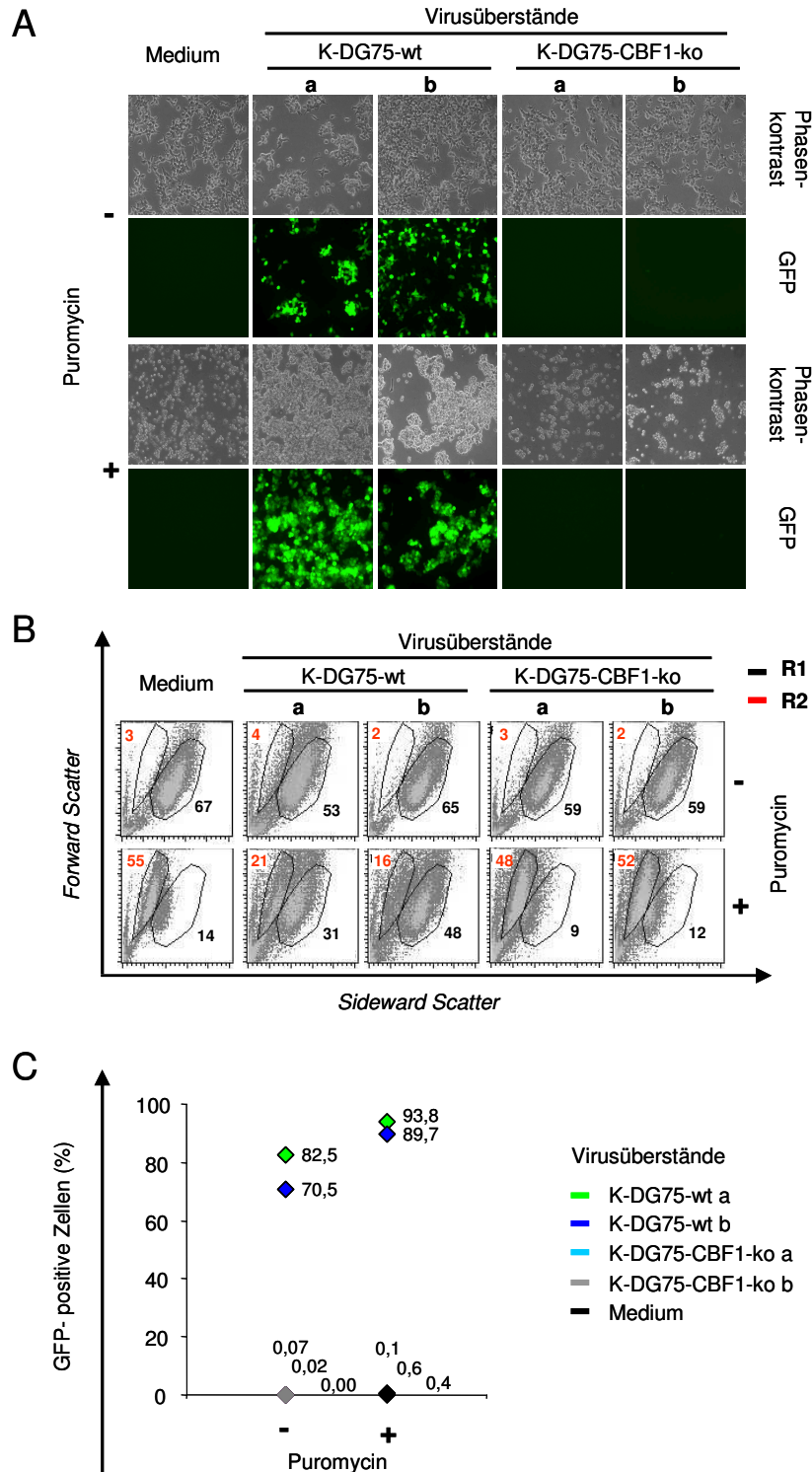


Abb. 12: Die Produktion von infektiösen Viruspartikeln nach Reaktivierung des lytischen Zyklus konnte nur für die CBF1-positive K-DG75-Zelllinie nachgewiesen werden. Es wurden von je zwei verschiedenen K-DG75-wt- und CBF1-ko-Linien die Kulturüberstände (a/b) getestet. (A) Die mit wt- oder CBF1-ko-Virusüberständen behandelten HEK293-Zellen wurden nach 48 Stunden Kultivierung in Medium mit oder ohne Puromycin im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Zellen sind im Phasenkontrast oder GFP-Fluoreszenzkanal dargestellt. (B) Die prozentuale Verteilung an toten (R2) und lebenden (R1) Zellen nach Behandlung mit Puromycin, gezeigt im Forward und Sideward Scatter. (C) Der im FACS ermittelte prozentuale Anteil an GFP-positiven, lebenden (R1) HEK293-Zellen, dargestellt als Punktdiagramm. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

4.2 Genomweite Charakterisierung der viralen Genexpressionsprofile nach lytischer Reaktivierung

Im ersten Teil meiner Dissertation wurde gezeigt, dass nach erfolgreicher Infektion der B-Zelllinie DG75 mit dem rekombinanten KSHV rKSHV.219 sowohl von den wt- als auch von den CBF1-ko-Zellen KSHV-positive Linien nach Puromycinselektion generiert werden konnten. Obwohl die Anzahl an GFP-RFP-doppelt-positiven Zellen und die Expression des *immediate-early* Gens ORF50/Rta nach der NaB-Induktion in den wt- oder CBF1-ko-K-DG75-Linien auf einem vergleichbaren Niveau war, konnte nur für die CBF1-positiven K-DG75-Zelllinien die Produktion von infektiösen Viruspartikeln nachgewiesen werden.

In der Literatur sind für die Rekrutierung des Transkriptionsfaktors ORF50/Rta an die Promotoren seiner viralen Zielgene zwei verschiedene Mechanismen beschrieben. Neben der direkten DNA-Interaktion über eine Konsensussequenz, ist die Bindung von ORF50/Rta im Komplex mit zellulären DNA-bindenden Proteinen an die DNA beschrieben. Bisher konnte für eine Reihe von lytischen Genen, aber auch für das latente Transkript LT_i, eine CBF1-abhängige Regulation gezeigt werden. Die Charakterisierung der CBF1-abhängigen Regulation dieser Gene erfolgte bislang aber nur durch Luziferase-Reporterstudien oder Gel-Retardationsanalysen.

Mit Hilfe der etablierten Zellsysteme sollte nun die Rolle des zellulären Transkriptionsfaktors CBF1 im Verlauf des lytischen Zyklus analysiert und erstmals der Einfluss von CBF1 auf die transkriptionelle Regulation viraler Gene in einer Lymphomzelllinie mit B-Zell-Charakter im Detail untersucht werden.

4.2.1 Der *real-time* PCR KSHV-Array ermöglichte die Analyse der Expression viraler Gene KSHV-infizierter DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen

Der Verlust der Virusproduktion wies darauf hin, dass die Anwesenheit von CBF1 eine essentielle Rolle im Verlauf des lytischen Zyklus, der viralen DNA-Replikation oder bei der Reifung von infektiösen Partikeln einnimmt.

Um den Einfluss von CBF1 während der lytischen Lebensphase zu untersuchen, wurden die Genexpressionsmuster viraler Transkripte zu verschiedenen Zeitpunkten nach chemischer Reaktivierung mit Hilfe eines KSHV-Arrays analysiert.

4.2.1.1 Aufbau des KSHV-Arrays und experimentelle Durchführung

Die Analyse der Genexpressionsprofile viraler Transkripte im Verlauf des lytischen Zyklus in den CBF1-positiven und -negativen, KSHV-infizierten B-Zellen wurde in Kooperation mit Prof. Dirk Dittmer (Universität North Carolina, USA) mit Hilfe eines *real-time* PCR KSHV-Arrays durchgeführt.

Der KSHV-Array setzte sich aus insgesamt 89 Genen zusammen: 3 Haushaltsgenen (beta-Aktin, HPRT-1 und GAPDH) und 81 verschiedenen KSHV-Genen (Fakhari and Dittmer, 2002) (Tab. 21). Für die KSHV-Gene ORF22, ORF57, K8, K9 und K10.5 wurden jeweils zwei Primerpaarkombinationen im Array mitgeführt. Die Auswahl der Primer für die Amplifikation der offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) der KSHV-Gene basierte auf der DNA-Sequenz des KSHV-Stammes des M-Typs, beschrieben bei Russo et al. (Russo et al., 1996a). In der Regel hatten die Amplifikate eine Größe von 50-100 bp. Ausnahmen waren folgende Gene: ORF57 (115 bp), ORF72 (192 bp), K10.5 (174 bp gespleißte, 268 bp ungespleißte Variante), K9 (141 bp latente, 268 bp lytische Transkriptionsstartstelle), K6 (172 bp), K8.1 (255 bp), K14 (234 bp), ORF22 (123 bp), ORF26 (223 bp), ORF41 (324 bp), ORF50 (111 bp), beta-Aktin (295 bp) und GAPDH (225 bp). Die Transkripte der KSHV-Gene K15 und K12 wurden aufgrund der zu stark variierenden Gensequenzen zwischen dem Virustyp M und P nicht analysiert.

Da die K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zelllinien das KSHV-Genom des rekombinanten rKSHV.219 tragen, welches der KSHV-Gensequenz des P-Typs entspricht, konnten mögliche Abweichungen bei der Transkriptanalyse mit dem *real-time* PCR-Array nicht ausgeschlossen werden. Der Unterschied zwischen der Nukleotidsequenz des M- und P-Typs beläuft sich jedoch auf weniger als 3%.

| Gen ^a | Synonym ^b | Klasse ^c | Funktion ^d | Array-Bez. ^e |
|--------------------|----------------------|---------------------|---|-------------------------|
| K1 | KIS | E | <i>K ITAM-containing signal transducing membrane glycoprotein</i> | 80_G8_K1F1 |
| ORF4 | KCP | L | <i>complement control protein</i> | 02_A2_orf4-1511F |
| ORF6 ^h | | E | <i>major single stranded DNA binding protein</i> | 03_A3_orf6-2093F |
| ORF7 | ICP18.5 | u | <i>processing and transport protein, Terminase-Untereinheit</i> | 04_A4_orf7-1632F |
| ORF8 ^h | gB | E | Glykoprotein B | 05_A5_orf8-2305F |
| ORF9 | | E | DNA Polymerase | 06_A6_orf9-708F |
| ORF10 | | E | HVS Homolog | 07_A7_orf10-1065F |
| ORF11 | | E | HVS Homolog | 08_A8_KS1008-1 |
| K2 ^h | v-IL-6 | E | <i>viral interleukin-6</i> | 89_H5_K2-430F |
| ORF2 | DHFR | E | Dihydrofolatreduktase | 01_A1_orf2-137F |
| K3 (ORF12) | v-MIR1 | E | <i>modulator of immune recognition 1, E3-Ubiquitinligase</i> | 90_H6_K3-142F |
| ORF70 ^h | TS | E | Thymidylat-Synthase | 64_F4_orf70-107F |
| K4 | v-MIP-II/v-CCL-2 | E | <i>viral macrophage inflammatory protein-II, viral interleukin 8-like CC chemokine, zelluläres MIP-II-Homolog</i> | 91_H7_K4-188F |

| | | | | |
|---------------------------------|-----------------|-----|--|---|
| K5 ^h | v-MIR2 | E | <i>modulator of immune recognition 2</i> , E3-Ubiquitinligase | 92_H8_kshv10014-1 |
| K6 ^h | v-Mip-I/v-CCL-1 | E | <i>viral macrophage inflammatory protein-I</i> , <i>viral interleukin 8-like CC chemokine</i> , zelluläres MIP-I-Homolog | 94_H10_K6-191F |
| K7-nut-1 | v-IAP/NUT-1/PAN | u/E | <i>viral inhibitor of apoptosis</i> | 95_H11_K7-114F_nut-1 |
| ORF16 | v-Bcl-2 | L | <i>bcl-2-like inhibitor of apoptosis</i> -Homolog | 09_A9_orf16-200F |
| ORF17 | | E | <i>minor capsid assembly protein</i> , <i>capsid maturational protease</i> | 10_A10_orf17-59F |
| ORF18 | | L | HVS Homolog | 11_A11_orf18-690F |
| ORF19 ^h | | L | <i>putative portal capping protein</i> , Tegumentprotein | 12_A12_orf19-480F |
| ORF20 | | L | Fusionsprotein, HVS Homolog | 13_B1_kshv10021-1 |
| ORF21 ^h | | E | Thymidinkinase | 14_B2_orf21-1578F |
| ORF22 | gH | L | Glykoprotein H | 15_B3_orf22-14F/ 16_B4_orf22-1017F |
| ORF23 | | L | Tegumentprotein, HVS Homolog | 17_B5_orf23-102F |
| ORF24 | | L | HVS Homolog | 18_B6_orf24-306F |
| ORF25 | | L | <i>major capsid protein</i> | 19_B7_orf25-3733F |
| ORF26 | | L | <i>minor capsid protein</i> , <i>capsid triplex protein</i> | 20_B8_26flore1F |
| ORF27 | | L | HVS Homolog | 21_B9_orf27-441F |
| ORF28 | | L | Glykoprotein, HVS Homolog | 22_B10_orf28-31F |
| ORF29a | | L | <i>DNA packaging protein</i> | 23_B11_tac29-5F_spl |
| ORF30 | | L | HVS Homolog | 24_B12_orf30-85F |
| ORF31 | | L | HVS Homolog | 25_C1_orf31-365F |
| ORF32 | | L | Tegumentprotein, HVS Homolog | 26_C2_orf32-1233F |
| ORF33 | | L | Tegumentprotein, HVS Homolog | 27_C3_kshv10034-1 |
| ORF34 | | L | HVS Homolog | 28_C4_orf34-461F |
| ORF35 | | E | HVS Homolog | 29_C5_orf35-200F |
| ORF36 | | E | Serin-Threoninproteinkinase, Phosphotransferase | 30_C6_orf36-1119F |
| ORF37 | SOX | E | <i>shutoff and exonuclease</i> , Alkaline DNA-Exonuklease | 31_C7_orf37-1321F |
| ORF38 | | E | Myristoyliertes Tegumentprotein, EHV-2 Homolog | 32_C8_orf38-56F |
| ORF39 | gM | L | Glykoprotein M | 33_C9_orf39-111F |
| ORF40 | | L | DNA Helikase-Primase-Komplexkomponente | 34_C10_orf40F |
| ORF41 | | L | DNA Helikase-Primase-Komplexkomponente | 35_C11_orf41F_spl |
| ORF42 | | L | Tegumentprotein, HVS Homolog | 36_C12_orf42-343F |
| ORF43 | | L | <i>minor capsid protein</i> | 37_D1_orf43-319F |
| ORF44 | | L | DNA-Replikationprotein, Helikase/Primase-Untereinheit | 38_D2_orf44-1578F |
| ORF45 | KIE-2 | E | <i>KSHV-immediate-early-2</i> | 39_D3_orf45-254F |
| ORF46 | | E | Uracil-DNA-Glucosidase | 40_D4_orf46-267F |
| ORF47 ^h | gL | E | <i>envelope glycoprotein</i> , Glykoprotein L | 41_D5_orf47-13F |
| ORF48 | | L | Glykoprotein | 42_D6_orf48-262F |
| ORF49 | | E | HVS Homolog | 43_D7_orf49-452F |
| ORF50 ^h | Rta | IE | <i>replication and transcripton activator</i> | 44_D8_kshv10052-1 |
| K8 ^f ^h | K-bZIP/RAP | E | <i>K-basic leucin zipper/replication associated protein</i> | 77_G5_exon3F/ 78_G6_exon3-4F_spl |
| K8.1/(ORF51) | gp35-37 | L | <i>envelope glycoprotein</i> | 82_G10_orfK8.1s1F_spl |
| ORF52 | | E | HVS Homolog | 45_D9_orf52-55F |
| ORF53 | gN | E | Glykoprotein N, HVS Homolog | 46_D10_kshv10055-1 |
| ORF54 | | L | Deoxyuridinetriphosphatase (dUTPase)-Homolog | 47_D11_orf54-778F |
| ORF55 | | u | Tegumentprotein, HVS Homolog | 48_D12_orf55-66F |
| ORF56 | | E | DNA-Replikationprotein, Helikase/Primase-Untereinheit | 49_E1_orf56-2040F |
| ORF57 ^f ^h | Mta | E | Posttranskriptioneller Regulator | 50_E2_orf57F1_spl/ 51_E3_orf57F5 |
| K9 ^f | v-IRF-1 | E | <i>viral interferone regulatory factor 1</i> | 75_G3_K9/vIRF-1_lytF/ 76_G4_K9/vIRF-1_latF |
| K10 | v-IRF-4 | E | <i>viral interferone regulatory factor 4</i> | 87_H3_k10-439F |
| K10.5 ^f | v-IRF-3/LANA-2 | LA | <i>viral interferone regulatory factor 3</i> , <i>latency associated nuclear antigen</i> | 72_F12_vIRF3-1F/ 74_G2_vIRF3-3F_spl |
| K11 | v-IRF-2 | L | <i>viral interferone regulatory factor 2</i> | 88_H4_k11-55F |
| ORF58 | | E | Multiplres Transmembranprotein, HVS Homolog | 52_E4_orf58-242F |
| ORF59 ^h | PF-8 | E | <i>DNA polymerase processivity factor</i> | 53_E5_orf59-481F |
| ORF60 | | L | Ribonukleotid-Reduktase, kleine Untereinheit | 54_E6_orf60-70F |
| ORF61 ^h | | E | Ribonukleotid-Reduktase, große Untereinheit | 55_E7_orf61-76F |

| | | | | |
|-----------------------------|------------|----|--|--------------------|
| ORF62 | | u | <i>capsid assembly and DNA maturation protein</i> | 56_E8_orf62-22F |
| ORF63 | | L | Tegumentprotein | 57_E9_orf63-2072F |
| ORF64 | | L | großes Tegumentprotein | 58_E10_kshv10069-1 |
| ORF65 | VCA/SCIP | L | <i>minor capsid protein, capsomer interacting protein</i> | 59_E11_kshv10070-1 |
| ORF66 | | E | Kapsidprotein | 60_E12_orf66-25F |
| ORF67 | | E | Tegumentproteinen | 61_F1_orf67-150F |
| ORF68 | | L | <i>major envelope glycoprotein</i> | 62_F2_orf68-1003F |
| ORF69 | | E | HVS Homolog | 63_F3_orf69-573F |
| K12 ^g | Kaposin | LA | <i>virus structure protein T0.7</i> | |
| ORF71 ^h (K13) | v-FLIP | LA | <i>FLICE-inhibitory protein</i> | 65_F5_KS10076-1 |
| ORF72 ^h | v-cyclin D | LA | Zyclin D-Homolog | 66_F6_orf72F1 |
| ORF73 ^h | LANA-1 | LA | <i>latency associated nuclear antigen</i> | 68_F8_LANA78f |
| K14 ^h | v-OX-2 | E | OX-2 Glykoprotein-Homolog | 83_G11_K14F |
| ORF74 ^h | v-GPCR | L | <i>viral G-protein coupled receptor</i> | 70_F10_orf74F-spl |
| ORF75 | FGARAT | L | Tegumentprotein, Phosphoryl-transformyl-glycine-amideamido-transferase-Homolog | 71_F11_orf75-707F |
| K15 ^g | LAMP | L | <i>latency-associated membrane protein</i> | |

Tab. 21: Auflistung der im KSHV-Array enthaltenen viralen Gene.

^a Dargestellt sind die im KSHV-Array untersuchten 81 offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) (inkl. K12 und K15) nach ihrer 5'-3'-Lokalisation im KSHV-Genom.

^b Alternative Bezeichnung der KSHV-Gene.

^c Klassifizierung der Gene nach ihrem Vorkommen im Verlauf des viralen Lebenszyklus in latente (LA), *immediate-early* (IE), *early* (E), *late* (L) und unbekannte (u) Gene (Schulz and Chang, 2007).

^d Molekulare Funktion und Homologien zum Herpesvirus Saimiri (HVS).

^e Bezeichnung der entsprechenden, im KSHV-Array enthaltenen Primerpaarkombinationen.

^f Für diese Gene wurden jeweils zwei Primerpaarkombinationen im KSHV-Array mitgeführt.

^g Die Transkripte der KSHV-Gene K15 und K12 wurden aufgrund der zu stark variierenden Gensequenzen zwischen dem Virustyp M und P nicht analysiert.

^h Für diese KSHV-Gene ist eine CBF1-abhängige Regulation in der Literatur bereits beschrieben.

Für die Array-Analyse wurden die KSHV-infizierten wt- oder CBF1-ko-Zellen mit 3 mM NaB für 2, 4, 8, 16 und 32 Stunden lytisch reaktiviert. Nach den entsprechenden Zeitpunkten wurde die totale RNA isoliert. Mittels dT-Oligomeren wurde die polyadenylierte mRNA angereichert und durch die reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde im Anschluss mit RNaseH behandelt, um nicht-transkribierte mRNA zu beseitigen. Die Qualität der cDNA-Proben wurde in *real-time* PCR-Analysen mit spezifischen Primern für das GAPDH-Transkript überprüft. Für den nicht-induzierten Zustand der K-DG75-Zellen wurden die Proben im Duplikat präpariert. Die Werte der Zeitkinetik entsprechen Einzelwerten.

4.2.1.2 Auswertung des KSHV-Arrays

Zur Analyse der Transkriptlevel der 81 KSHV-Gene (Targetgene) wurde der *cycle-threshold* (Ct)-Wert, der die Anzahl der Zyklen beschreibt, an welcher das Fluoreszenzsignal des Amplifikats erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, auf ein geeignetes Referenzgen (Haushaltsgen) normalisiert ($\Delta Ct = Ct_{tx \text{ von Targetgen}} - Ct_{tx \text{ von Referenzgen}}$, $t =$

Zeitpunkt x (0-32 Stunden nach der NaB-Induktion)). Je niedriger der Ct-Wert ist, desto höher ist die Konzentration der gemessenen Transkripte. Die Normalisierung der Ct-Rohwerte der KSHV-Gene auf ein Referenzgen sollte die möglichen Konzentrationsunterschiede der eingesetzten cDNA-Proben ausgleichen (Papin et al., 2005).

Parallel zu den KSHV-Genen wurde die Expression der Referenzgene beta-Aktin, HPRT-1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) analysiert. Bei diesen Genen handelt es sich um typische Haushaltsgene, die unabhängig von Zelltyp und äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert werden.

Der lytische Zyklus wurde mit NaB induziert. Die Wirkung von NaB als Histondeacetylaseinhibitor führt zur Dekondensation des Chromatins und ermöglicht damit die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren zu ihren Zielpromotoren. Schon millimolare Konzentrationen an NaB können eine Veränderung des zellulären Milieus verursachen, Apoptose induzieren und den Zellzyklusarrest bewirken. Für die Normalisierung war es von großer Bedeutung ein Referenzgen zu wählen, welches trotz der NaB-Behandlung über ein stabiles Transkriptniveau verfügt und keine zu großen Expressionsschwankungen zwischen den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen aufweist. Bei Betrachtung der Ct-Rohwerte der Haushaltsgene im Verlauf der Reaktivierungskinetik zeichneten sich die geringsten Schwankungen bei beta-Aktin ab. Mit der hypothetischen idealen Amplifikations-effizienz der Transkripte von Faktor 2, der einer Verdoppelung der eingesetzten cDNA pro Zyklus entspricht, wurde der Unterschied der Ct-Werte von beta-Aktin vom Zeitpunkt 0 bis 32 Stunden nach der NaB-Induktion ermittelt. Dabei unterschied sich beta-Aktin in den wt-Zellen um 2,9 Zyklen (7,4-facher Unterschied) und in den CBF1-ko-Zellen um einen Zyklus (2-facher Unterschied) (Tab. 22).

| K-DG75 -wt | Stunden nach der NaB-Induktion | | | | | | MW | SD |
|---------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | 0 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | | |
| beta-Aktin | 22,7 | 25,4 | 24,0 | 23,6 | 24,3 | 25,6 | 24,3 | ± 1,0 |
| GAPDH | 19,7 | 20,9 | 20,0 | 19,0 | 25,7 | 27,0 | 22,1 | ± 3,1 |
| HPRT-1 | 24,3 | 25,6 | 25,2 | 24,9 | 34,9 | 32,0 | 27,8 | ± 4,1 |

| K-DG75 -CBF1-ko | Stunden nach der NaB-Induktion | | | | | | MW | SD |
|--------------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | 0 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | | |
| beta-Aktin | 22,6 | 22,3 | 24,3 | 20,9 | 21,8 | 23,6 | 22,6 | ± 1,1 |
| GAPDH | 25,8 | 25,7 | 27,6 | 18,0 | 18,2 | 20,0 | 22,5 | ± 3,9 |
| HPRT-1 | 38,6 | 37,4 | 39,1 | 23,0 | 24,6 | 25,7 | 31,4 | ± 7,0 |

Tab. 22: Auflistung der Ct-Rohwerte, der im Array getesteten Haushaltsgene beta-Aktin, GAPDH und HPRT-1 im Verlauf der Reaktivierungskinetik der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen. Die im Array

enthaltenen zellulären Referenzgene beta-Aktin, GAPDH und HPRT-1 wurden auf ihre konstitutive Expression bzw. Stabilität während der chemischen Induktion mit NaB für 2, 4, 8, 16 und 32 Stunden überprüft. Der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) wurden aus den Ct-Rohdaten ermittelt.

Die Normalisierung der Ct-Werte für jedes der 86 Primerpaare (81 verschiedene Gene, inkl. 5 alternativer Primerpaarkombinationen) des KSHV-Arrays erfolgte mit beta-Aktin als Referenzgen.

4.2.1.3 In den CBF1-negativen K-DG75-Zellen ist die Expression der viralen Transkripte stark beeinträchtigt

In der Latenz wird nur eine begrenzte Anzahl viraler Gene exprimiert, die für die Erhaltung des viralen Genoms in der Wirtszelle erforderlich sind. Für die etablierten KSHV-positiven PEL-Zelllinien wie BCBL-1 oder BC-1 konnte aber auch im nicht-induzierten, latenten Zustand ein geringer Anteil von 1-4% spontan lytischer Zellen nachgewiesen werden (Cannon et al., 2000, Renne et al., 1996b, Cesarman et al., 1995).

In den durchgeführten FACS-Studien konnten weder bei den K-DG75-wt- noch bei den CBF1-ko-Linien im nicht-reaktivierten Zustand spontan lytische GFP-RFP-doppelt-positive Zellen detektiert werden (Abschnitt 4.1.4.1). Dennoch wurde zunächst das Expressionsniveau der KSHV-Gene auf transkriptioneller Ebene in den nicht-induzierten CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen, basierend auf den Daten des *real-time* PCR KSHV-Arrays, verglichen.

Für die Δ Ct-Werte der gesamten 86 Gene wurde mit der hypothetischen idealen Amplifikationseffizienz von Faktor 2 der x-fache Unterschied zwischen den Δ Ct-Werten der CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen bestimmt. Dabei wurde ein mindestens 20-facher Unterschied für 8%, ein mindestens 7-facher Unterschied für 11% und ein mindestens 2,5-facher Unterschied für 24% der Gene zwischen den Δ Ct-Werten der CBF1-positiven und -negativen Linien ermittelt. Für 57% der KSHV-Gene lag der x-fache Unterschied zwischen den Δ Ct-Werten der wt- und ko-Linie jedoch bei einem Wert kleiner 2,5. Bei den KSHV-Genen, die zwischen den wt- und CBF1-ko-Zellen einen mindestens 20-fachen Unterschied aufwiesen, handelte es sich um die Gene K1, K5, K11, ORF59, ORF65, ORF71 und ORF73.

Nach chemischer Reaktivierung kommt es zur Induktion der viralen Genexpressionskaskade. Im Verlauf des viralen Lebenszyklus werden die KSHV-Gene entsprechend ihres zeitlichen Expressionsmusters in latente (LA), *immediate-early* (IE), *early* (E) und *late* (L) Gene unterteilt. Um die frühen und späten Ereignisse im Verlauf des lytischen Zyklus zu untersuchen, wurde eine Zeitkinetik von 2, 4, 8, 16 und 32 Stunden nach Induktion mit NaB

durchgeführt. Diese Zeitspanne sollte es ermöglichen, die potentielle Rolle von CBF1 bei der Regulation der verschiedenen Klassen der viralen Gene zu charakterisieren.

Um einen ersten Eindruck von der Expressionskaskade der viralen Transkripte in CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen im Verlauf der Reaktivierungskinetik zu bekommen, wurde der Mittelwert aus den ΔCt -Werten aller 86 Gene zu jedem Zeitpunkt berechnet und gegen die Zeitkinetik aufgetragen. Sowohl für die wt- als auch für die CBF1-ko-Linie konnte eine kontinuierliche Zunahme der Transkriptlevel, gezeigt durch die Abnahme der ΔCt -Werte, im Verlauf der 32 Stunden beobachtet werden. Die Akkumulation der viralen Transkripte war jedoch in den wt-Zellen deutlich größer (Abb. 13).

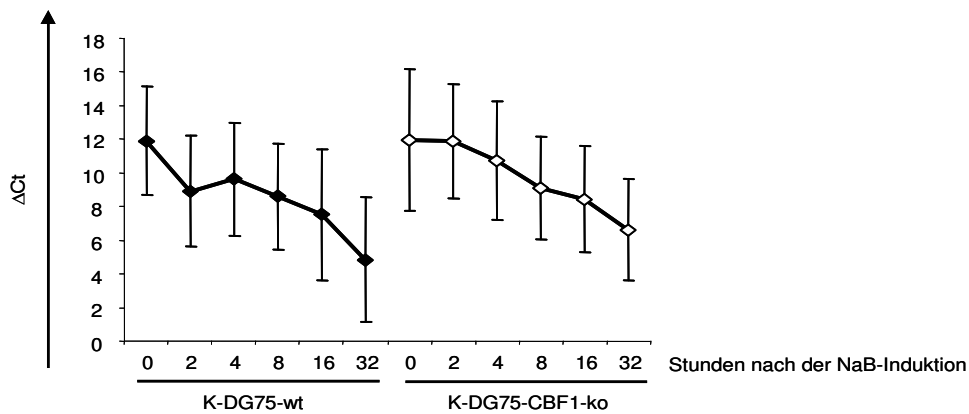


Abb. 13: Vergleich der viralen Genexpressionsprofile der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen. Die ΔCt -Mittelwerte aus den ΔCt -Werten der 86 KSHV-Gene der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Proben, normalisiert auf beta-Aktin, und die entsprechenden Standardabweichungen zu jedem einzelnen Zeitpunkt wurden gegen die NaB-Zeitkinetik (x-Achse) aufgetragen.

Bei der Berechnung des x-fachen Unterschiedes des ΔCt -MWs zum Zeitpunkt Null zu den ΔCt -MWs 32 Stunden nach der NaB-Induktion, mit der hypothetischen idealen Amplifikationseffizienz von Faktor 2, konnte in den K-DG75-wt-Zellen eine Zunahme der viralen Transkripte um das 139,3-fache ermittelt werden. In den CBF1-ko-Zellen hingegen zeigte sich nur ein 42,3-facher Unterschied der Transkriptlevel der getesteten KSHV-Gene nach 32 Stunden NaB (Tab. 23).

| K-DG75-wt | Stunden nach der NaB-Induktion | | | | | |
|--|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | 0 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 |
| $\Delta\text{Ct-MW}^a$ | 12,0 ± 3,1 | 9,0 ± 3,1 | 9,7 ± 3,3 | 8,7 ± 3,1 | 7,6 ± 3,9 | 4,9 ± 3,7 |
| $\Delta\text{Ct-Unterschied zu }t_0^b$ | - | 7,9-fach | 4,9-fach | 9,9-fach | 21,7-fach | 139,3-fach |

| K-DG75-CBF1-ko | Stunden nach der NaB-Induktion | | | | | |
|--|--------------------------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| | 0 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 |
| $\Delta\text{Ct-MW}^a$ | 12,1 ± 4,1 | 12,0 ± 3,2 | 10,8 ± 3,4 | 9,2 ± 3,0 | 8,5 ± 3,1 | 6,7 ± 3,0 |
| $\Delta\text{Ct-Unterschied zu }t_0^b$ | - | 1,0-fach | 2,3-fach | 7,4-fach | 11,7-fach | 42,3-fach |

Tab. 23: Vergleich der ΔCt -Mittelwerte der 86 getesteten KSHV-Gene zwischen den K-DG75-wt und CBF1-ko-Zellen.

^a Die Mittelwerte (MW) und die entsprechenden Standardabweichungen (\pm) wurden aus den ΔCt -Werten, normalisiert auf beta-Aktin, der gesamten 86 KSHV-Gene zu jedem einzelnen Zeitpunkt für die K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Zelllinie ermittelt.

^b Der x-fache Unterschied der ΔCt -Werte der K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Linien zu den ΔCt -Werten zum Zeitpunkt Null (t_0) wurde mittels einer hypothetischen idealen Amplifikationseffizienz von Faktor 2 berechnet.

Mit der Software von *Genesis* wurden, basierend auf den ΔCt -Daten, die Expressionswerte der 86 KSHV-Gene zwischen den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen im Verlauf der 32 Stunden der NaB-Kinetik verglichen. Die Sortierung der Gene entsprechend ihrer Klasse (LA, IE, E oder L) sollte darüber Auskunft geben, zu welchem Zeitpunkt nach Reaktivierung CBF1 als ein limitierender Faktor für die Progression des lytischen Zyklus diskutiert werden kann, und ob es sich bei den in Abhängigkeit von CBF1-regulierten KSHV-Genen um eine bestimmte Klasse von Genen handelt.

Sowohl in den KSHV-infizierten wt- als auch in den CBF1-ko-DG75-Zellen war im Verlauf der NaB-Kinetik von 32 Stunden eine Zunahme der Expression der meisten KSHV-Gene zu beobachten. Das Expressionsniveau dieser Gene war in den CBF1-ko-Zellen deutlich reduziert. Bei Betrachtung der verschiedenen Gruppen hob sich jedoch keine der Genklassen besonders hervor (Abb. 14).

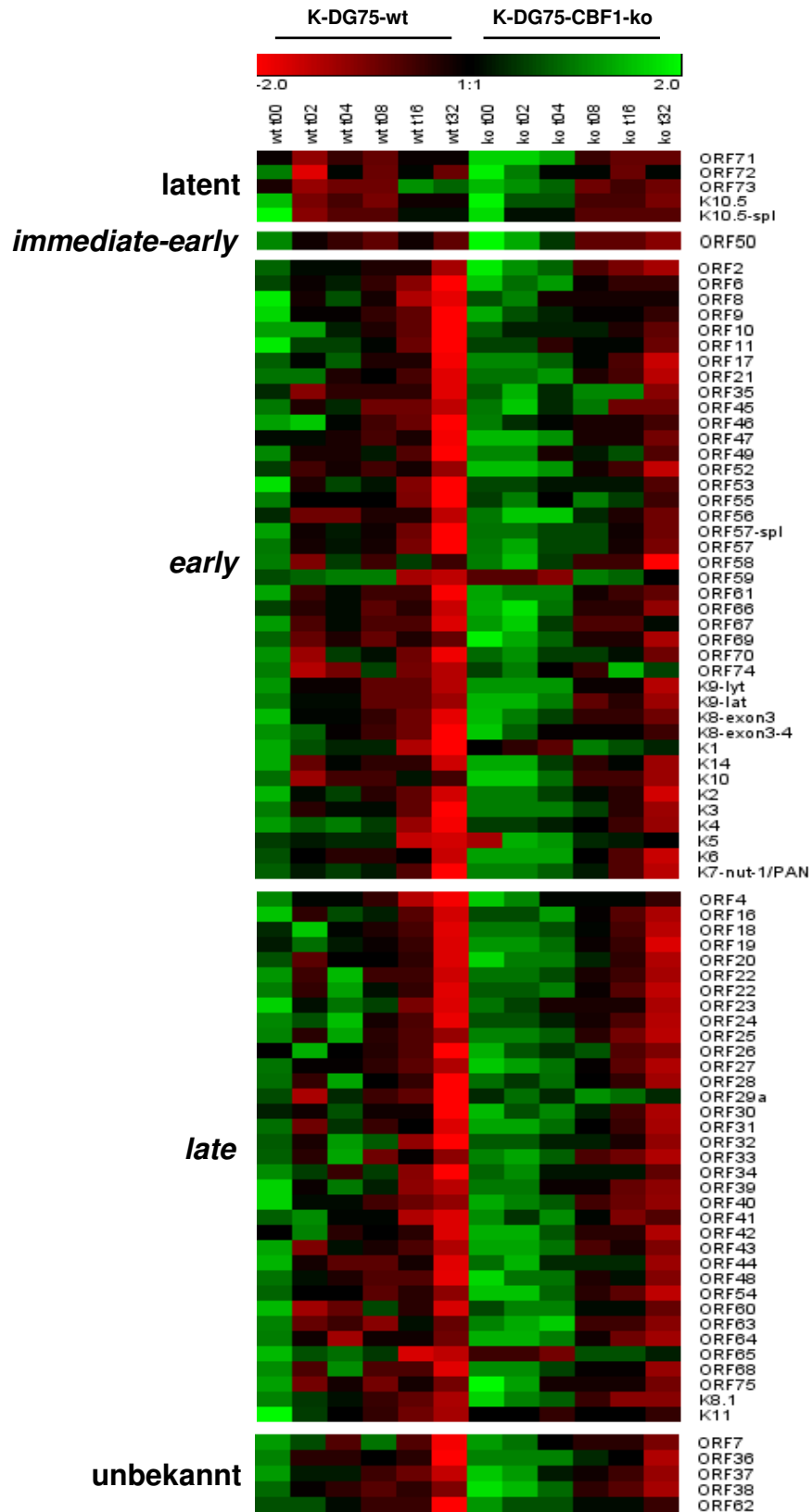


Abb. 14: Nach lytischer Reaktivierung war das Expressionsprofil viraler Transkripte der verschiedenen Phasen des lytischen Zyklus in den CBF1-ko-Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen deutlich eingeschränkt. Die Ct-Rohdaten eines jeden Primerpaares der 86 KSHV-Gene der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Proben wurden auf beta-Aktin normalisiert (ΔCt). In den Spalten 1 bis 6 sind die Daten für die wt- und in den Spalten 7 bis 12 für die CBF1-ko-Zellen im Verlauf der Reaktivierungskinetik (t00, t02, t04, t08, t16 und t32) aufgetragen. Die

Reihen repräsentieren die 86 Gene. Die Skala der Expressionswerte ist von -2 bis +2 normalisiert. Niedrige ΔCt -Werte, also hohe Expressionswerte, sind in rot, mittlere in schwarz und hohe, also niedrige Expressionswerte, in grün dargestellt. Die Genexpressionsprofile der 86 KSHV-Gene sind entsprechend ihrer Klassifizierung in latente (n=5), *immediate-early* (n=1), *early* (n=40), *late* (n=35) und unbekannte (n=5) Gene unterteilt.

Um die einzelnen Zeitpunkte zwischen den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen zu vergleichen, wurde der x-fache Unterschied zwischen den ΔCt -Werten zum Zeitpunkt Null und den verschiedenen Zeitpunkten nach der NaB-Induktion, unter Verwendung der hypothetischen idealen Amplifikationseffizienz von Faktor 2, berechnet ($E = 2^{(\Delta Ct_{tx} - \Delta Ct_{t0})}$, t = Zeitpunkt x (0-32 Stunden nach NaB Induktion)). Durch den Quotienten aus den Werten der wt-Zellen und der CBF1-ko-Zellen ließ sich das x-fach reduzierte Expressionsniveau der getesteten Gene in der CBF1-negativen Linie im Vergleich zu der CBF1-positiven Linie ermitteln. Der Quotient aus den Werten der CBF1-ko-Zellen und den wt-Zellen stellte das x-fach erhöhte Expressionsniveau in Abwesenheit von CBF1 dar. In Tab. 24 wurden die mindestens 2-fach regulierten Gene nach ihren verschiedenen Klassen (La, IE, E, L und U) sortiert.

Bei Betrachtung der Tabelle fällt auf, dass in den CBF1-negativen Zellen die Expression der latenten Gene nach 2 und 4 Stunden der NaB-Induktion reduziert, und ab 8 Stunden im Vergleich zu den K-DG75-wt-Zellen mindestens 2-fach erhöht war. Ein auffälliges Expressionsmuster war auch für die *early* Gene ORF59 und K1 und das *late* Gen ORF65 zu beobachten. So zeigte sich für diese Gene anfänglich ein erhöhtes und ab 4 Stunden nach der NaB-Induktion ein deutlich reduziertes Transkriptniveau in den CBF1-negativen Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen. Insgesamt konnte aber im Verlauf der Reaktivierungskinetik für die Expression der IE-, E- und L-Gene kein einheitliches Muster erkannt werden. Neben einem erhöhten Expressionsniveau konnten in den K-DG75-CBF1-ko-Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen auch KSHV-Gene mit niedrigerem Expressionsprofil detektiert werden. Der Anteil der lytischen Gene mit reduzierten Expressionsniveau überwog jedoch in der CBF1-negativen Linie (Tab. 24).

| wt/ CBF1-ko = x-fach reduziert in CBF1-ko CBF1-ko/ wt = x-fach erhöht in CBF1-ko | Anzahl der Gene | | | | | |
|---|-----------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | ∑ 86 | LA (5) | IE (1) | E (40) | L (35) | U (5) |
| 2 Stunden | | | | | | |
| > 2-fach erhöht in K-DG75-CBF1-ko | 7 | - | - | 2 | 5 | - |
| > 2-fach reduziert in K-DG75-CBF1-ko | 67 | 5 | 1 | 32 | 25 | 4 |
| kein Effekt | 12 | - | - | 6 | 5 | 1 |
| 4 Stunden | | | | | | |
| > 2-fach erhöht in K-DG75-CBF1-ko | 14 | - | - | 2 | 12 | - |
| > 2-fach reduziert in K-DG75-CBF1-ko | 31 | 2 | - | 14 | 13 | 2 |
| kein Effekt | 41 | 3 | 1 | 24 | 10 | 3 |
| 8 Stunden | | | | | | |
| > 2-fach erhöht in K-DG75-CBF1-ko | 23 | 3 | - | 9 | 9 | 2 |
| > 2-fach reduziert in K-DG75-CBF1-ko | 21 | 1 | - | 18 | 2 | - |
| kein Effekt | 42 | 1 | 1 | 13 | 24 | 3 |
| 16 Stunden | | | | | | |
| > 2-fach erhöht in K-DG75-CBF1-ko | 34 | 5 | - | 9 | 13 | 1 |
| > 2-fach reduziert in K-DG75-CBF1-ko | 29 | - | 1 | 20 | 12 | 2 |
| kein Effekt | 23 | - | - | 11 | 10 | 2 |
| 32 Stunden | | | | | | |
| > 2-fach erhöht in K-DG75-CBF1-ko | 24 | 3 | 1 | 9 | 10 | 1 |
| > 2-fach reduziert in K-DG75-CBF1-ko | 44 | - | - | 24 | 17 | 3 |
| kein Effekt | 18 | 2 | - | 7 | 8 | 1 |

Tab. 24: Das reduzierte Expressionsniveau in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen kann auf keine bestimmte Genklasse eingeschränkt werden. Der x-fache Unterschied der ΔCt -Werte der 86 Gene, normalisiert auf beta-Aktin, wurde für jeden Zeitpunkt (2, 4, 8, 16 und 32 Stunden nach der NaB-Induktion) relativ zum Zeitpunkt Null mittels der hypothetischen idealen Amplifikationseffizienz von Faktor 2 berechnet. Durch den Quotienten aus den Werten für die Gene der K-DG75-wt- und der Gene der CBF1-ko-Linie konnten die x-fach reduzierten Gene in den CBF1-ko-Zellen ermittelt werden. Durch den Quotienten aus den Werten für die Gene der K-DG75-CBF1-ko- und der Gene der wt-Linie konnten die x-fach erhöhten Gene in den CBF1-ko-Zellen ermittelt werden. Dargestellt ist die Anzahl an mindestens 2-fach erhöhten oder reduzierten KSHV-Genen in den CBF1-negativen Zellen, sortiert entsprechend ihrer Klassifizierung in latente (LA), *immediate-early* (IE), *early* (E) und *late* (L) Gene. Gene, deren Expressionsprofil in der Literatur nicht beschrieben sind, werden mit unbekannt bezeichnet (U).

Zusammengefasst ergab sich folgendes Bild: im nicht-induzierten Zustand der Zellen waren bereits ca. 50% der getesteten 86 KSHV-Gene unterschiedlich stark zwischen den CBF1-ko- und wt-K-DG75-Zellen exprimiert. Bei den KSHV-Genen, die zwischen den wt- und CBF1-ko-Zellen den größten Unterschied aufwiesen, handelte es sich um die Gene K1, K5, K11, ORF59, ORF65, ORF71 und ORF73. Die hier beobachteten Unterschiede zwischen den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen konnten aber in keinen der darauffolgenden *real-time* PCR-Experimenten bestätigt werden. So ist in diesen Fällen von technischen Problemen bei der Durchführung des KSHV-Arrays auszugehen.

Nach chemischer Induktion der B-Zellen konnte sowohl in den CBF1-positiven als auch in den -negativen K-DG75-Zellen die Akkumulation lytischer Gene beobachtet werden. Bei über der Hälfte der getesteten Gene war aber in Abwesenheit von CBF1 das

Expressionsniveau mindestens 2-fach reduziert oder zeigte große Verzögerungen in der viralen Genexpressionskaskade im Vergleich zu den wt-Zellen. Die verminderte Expression lytischer Gene, die für Strukturproteine oder Proteine kodieren, welche einen essentiellen Beitrag zur viralen Replikationsmaschinerie leisten, könnte die fehlende Produktion infektiöser Viruspartikel trotz anfänglicher Reaktivierbarkeit der CBF1-negativen K-DG75-Zellen erklären.

4.2.2 Bestätigung und Vergleich der Genexpressionsmuster ausgewählter KSHV-Gene in weiteren *real-time* PCR-Analysen

4.2.2.1 Durchführung der *real-time* PCR-Analysen

Um die Array-Daten in einem unabhängigen Experiment zu kontrollieren, wurde die Reaktivierungskinetik mit 3 mM NaB in je zwei verschiedenen K-DG75-wt- und CBF1-kolonien wiederholt. Die RNA wurde 2, 4, 8, 16 und 32 Stunden nach der NaB-Induktion isoliert, mit DNase verdaut, mittels reverser Transkription zu cDNA umgeschrieben und anschließend in *real-time* PCR-Analysen mit genspezifischen Primern, die sich von den im KSHV-Array verwendeten Primern unterschieden, eingesetzt. Im Folgenden werden die *real-time* PCR-Daten des KSHV-Arrays als Array-Daten und die Daten aus weiteren unabhängigen Experimenten als *real-time* PCR-Daten bezeichnet. Die *real-time* PCR-Daten, die auf den Linien basieren, die zuvor für den KSHV-Array eingesetzt wurden, werden als *real-time* PCR-Analyse a deklariert. Die *real-time* PCR-Analyse b wurde mit K-DG75-Linien durchgeführt, die in einer unabhängigen Infektion generiert worden waren.

Insgesamt wurden 21 KSHV-Gene aus den verschiedenen Klassen ausgewählt. Dabei handelte es sich um folgende Gene: ORF73, K10.5 (latent), ORF50 (*immediate-early*), ORF6, ORF8, ORF9, ORF57, ORF59, K1, K2, K5, nut-1/PAN, K8, K10, K14 (*early*), ORF4, ORF29a, ORF65, ORF74 (*late*) und ORF37 und ORF62 (unbekannt). Für 12 dieser KSHV-Gene war bereits eine CBF1-abhängige Regulation in der Literatur anhand von Reporterstudien oder Gel-Retardationsanalysen beschrieben (ORF6, K8, ORF50, ORF57, ORF59, ORF8, K2, K5, ORF73, ORF74, K14 und nut-1/PAN). Die Expression dieser 12 Gene sollte mit der Expression von Genen, für welche noch kein CBF1-abhängiger Regulationsmechanismus beschrieben worden ist, in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen verglichen werden.

Die Überprüfung des Transkriptniveaus des viralen Transaktivators ORF50/Rta in den *real-time* PCR-Analysen war von besonderem Interesse, da die Expression von ORF50/Rta

sowohl für die Initiierung als auch für den korrekten Ablauf des lytischen Programms essentiell ist.

Zur Normalisierung der *real-time* PCR-Daten wurde das Haushaltsgen beta-Aktin eingesetzt, welches sich zuvor schon für die Array-Analyse bewährt hatte. Zur Auswertung der *real-time* PCR-Daten wurde die relative Transkriptmenge der ausgewählten KSHV-Gene unter Berücksichtigung der jeweiligen Amplifikationseffizienz des verwendeten Primerpaares, relativ zu einer genspezifischen Kalibratorprobe, bestimmt und auf das Referenzgen beta-Aktin normalisiert.

4.2.2.2 Untersuchung der Transkriptlevel nicht-induzierter CBF1-positiver und -negativer K-DG75-Zellen

Im KSHV-Array konnten bereits im nicht-induzierten Zustand der Zellen Unterschiede in den Δ Ct-Werten zwischen der wt- und der CBF1-negativen-Linie detektiert werden. Um dieser Beobachtung nachzugehen, wurden die Daten des Arrays der 21 ausgewählten KSHV-Gene den *real-time* PCR-Daten gegenübergestellt. Da im KSHV-Array für die Gene ORF57, K8 und K10.5 jeweils zwei verschiedene Primerpaarkombinationen mitgeführt wurden, werden im Folgenden für die Array-Analyse immer 24 Datensätze gezeigt.

Mittels der linearen Regressionsanalyse wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 (Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten), welches den Grad der Übereinstimmung zwischen den Δ Ct-Werten der CBF1-ko- und wt-Ansätze der *real-time* PCR-Analysen angibt, ermittelt. Je näher der Wert des Bestimmtheitsmaßes dem Wert 1 ist, desto größer ist die Übereinstimmung zwischen den Δ Ct-Werten der nicht-induzierten K-DG75-wt- und CBF1-ko-Linien. Durch die Auftragung der Δ Ct-Werte der CBF1-positiven gegen die Δ Ct-Werte der CBF1-negativen Zellen ließ sich in der *real-time* PCR-Analyse a ein Bestimmtheitsmaß von 0,7937 und in der *real-time* PCR-Analyse b von 0,4732 berechnen. Der R^2 -Wert der ausgewählten Gene aus der Array-Analyse betrug 0,2594. Die Schwankungen der R^2 -Werte basierten auf den großen Abweichungen der Δ Ct-Werte einzelner KSHV-Gene zwischen den K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen. Dabei zeigte sich ein mindestens 2,5-facher Unterschied zwischen den wt- und CBF1-ko-K-DG75-Zellen in der *real-time* PCR-Analyse a für die Gene K10.5, K2, K10 und K5. In der *real-time* PCR-Analyse b verzeichnete der Expressionswert von nut-1/PAN mit einem 20-fachen Unterschied zwischen den beiden Linien die größte Varianz. Für das Expressionsniveau der KSHV-Gene K1, K5, ORF59, ORF65 und ORF73 wurde im Array ein mindestens 20-facher Unterschied zwischen den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-

Zellen berechnet. In den *real-time* PCR-Analysen konnte dies nicht bestätigt werden. Die Unterschiede zwischen den wt- und CBF1-ko-Linien waren maximal 2,5-fach (Abb. 15).

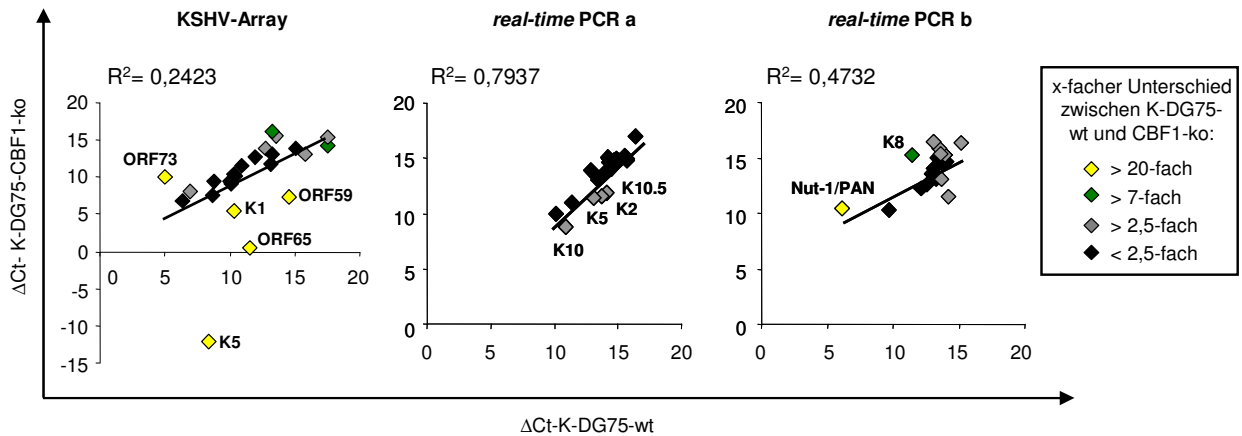


Abb. 15: Vergleich der Transkriptlevel zum Zeitpunkt Null der ausgewählten viralen Gene im nicht-induzierten Zustand der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen. Die ΔCt -Werte der ausgewählten Primerpaare zum Zeitpunkt Null der wt-Proben (x-Achse) wurden gegen die ΔCt -Werte der CBF1-ko-Proben (y-Achse) aufgetragen. Mittels der linearen Regressionsanalyse wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 (Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten) ermittelt. Die einzelnen Gene sind entsprechend der Größe ihrer Varianz zwischen den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen farblich hervorgehoben.

In den drei unabhängig durchgeführten Experimenten konnten keine bestimmten Gene identifiziert werden, die für die niedrige Korrelation zwischen dem Transkriptniveau nicht-induzierter wt- und CBF1-ko-K-DG75-Zellen verantwortlich waren. Die Unterschiede in der Genexpression einzelner Gene im nicht-induzierten Zustand der Zellen sind somit nicht auf einen CBF1-abhängigen Effekt zurückzuführen, sondern könnten auf der Heterogenität latenter und spontan lytischer Zellpopulationen in der Kultur basieren.

4.2.2.3 Die Expression der ausgewählten KSHV-Gene ist nach Reaktivierung in den CBF1-negativen B-Zellen stark beeinträchtigt

Um einen ersten Eindruck von der Expressionskaskade der viralen Transkripte in CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen zu bekommen, sollten die *real-time* PCR-Daten im direkten Vergleich mit den KSHV-Array-Daten betrachtet werden. Bei den *real-time* PCR-Daten handelt es sich im Folgenden um den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführter Experimente von je zwei verschiedenen K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Linien.

Mittels der Software von *Genesis* wurden die ΔCt -Daten der ausgewählten KSHV-Gene der wt- oder CBF1-ko-Linien entsprechend dem Expressionsprofil im Verlauf der 32 Stunden angeordnet. Bei Betrachtung der Expressionsmuster konnte sowohl für die wt- als

auch für die CBF1-ko-Linie im Verlauf der 32 Stunden eine kontinuierliche Zunahme der Transkriptlevel, gezeigt durch die Abnahme der ΔCt -Werte, beobachtet werden. Die Akkumulation der viralen Transkripte war sowohl im KSHV-Array als auch in den *real-time* PCR-Analysen in den wt-Zellen im Vergleich zu den CBF1-negativen Zellen deutlich erhöht.

Bei den Array-Daten ließ sich in den K-DG75-wt-Zellen für die latenten Gene ORF73 und K10.5, das *immediate-early* Gen ORF50/Rta, die *early* Gene K10, K8, K14 und das *late* Gen ORF29a zwischen 2 und 8 Stunden eine Induktion beobachten. Ab dem 16-Stundenwert konnte für die latenten Gene eine Repression und für die restlichen Gene eine Induktion detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde für diese Gene in den CBF1-negativen Zellen nach 8 Stunden der NaB-Behandlung eine kontinuierlich ansteigende Expression nachgewiesen. Die Gene ORF59, ORF65, K1 und K5 waren in den ersten Stunden nach NaB in den CBF1-ko-Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen induziert. Ab dem 8-Stundenwert zeigte sich sowohl für diese Gene als auch für die Gene ORF74 und ORF29a eine Abnahme der Transkriptlevel in Abwesenheit von CBF1. Für die Gene ORF4, ORF6, ORF8, ORF9, ORF29a, ORF62, ORF74 und K8 war das Expressionsprofil in Abwesenheit von CBF1 im Vergleich zu den übrigen KSHV-Genen besonders stark eingeschränkt (Abb. 16A).

Bei den unabhängigen *real-time* PCR-Analysen war für die Gene ORF73, K10.5 und ORF74 in den CBF1-ko-Linien zu den frühen Zeitpunkten der Kinetik ein erhöhtes Transkriptniveau zu detektieren, welches aber nach spätestens 8 Stunden deutlich unter den Werten der wt-Linien lag. Die Expression der restlichen Gene nahm im Verlauf der lytischen Reaktivierung sowohl in den wt- als auch in den CBF1-ko-K-DG75-Zellen zu. Das Expressionsniveau war aber in den CBF1-negativen Zellen deutlich reduziert (Abb. 16B).

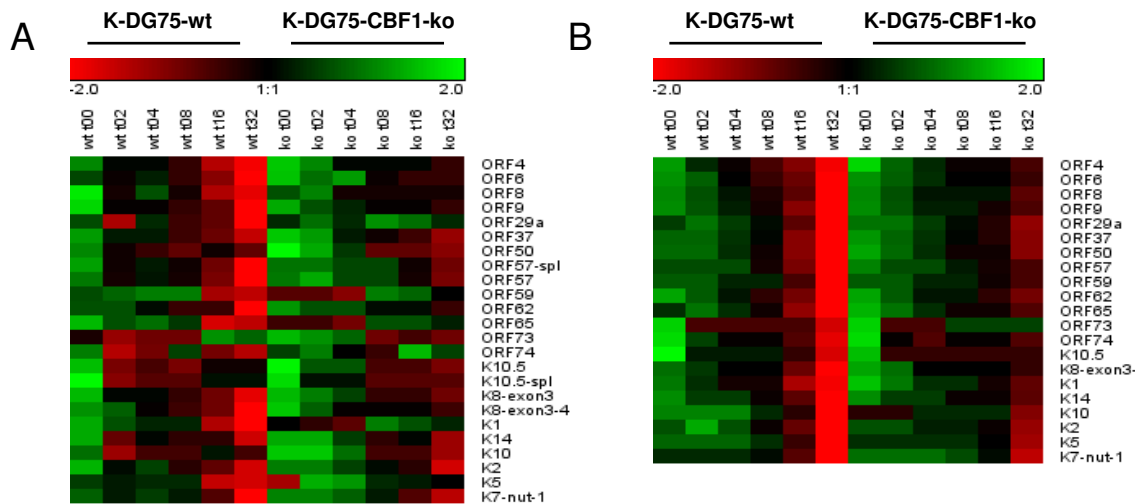


Abb. 16: Vergleich der viralen Genexpressionsprofile von K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen zwischen den KSHV-Array-Daten und den *real-time* PCR-Analysen. (A) (KSHV-Array) und (B) (MW aus *real-time* PCR-Analyse a und b) Der Vergleich der Expressionsstärke, basierend auf den Δ Ct-Daten der wt- und CBF1-negativen Zellen, im Verlauf der NaB-Induktion wurde mit der Software von Genesis durchgeführt. Die Skala der Expressionswerte ist von -2 bis +2 normalisiert. In den Spalten 1 bis 6 sind die Daten für die wt- und in den Spalten 7 bis 12 für die CBF1-ko-Zellen im Verlauf der Reaktivierungskinetik (t00, t02, t04, t08, t16 und t32) aufgetragen. Die Reihen repräsentieren die getesteten Gene. Insgesamt wurden 21 KSHV-Gene getestet. Da im KSHV-Array für die Gene ORF57, K8 und K10.5 jeweils zwei verschiedene Primerkombinationen mitgeführt wurden, werden für die Array-Analyse 24 Datensätze gezeigt. Die *real-time* PCR-Daten entsprechen dem Mittelwert zweier unabhängig durchgeführter Experimente mit je zwei verschiedenen K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Linien. Niedrige Δ Ct-Werte, also hohe Expressionswerte, sind in rot, mittlere in schwarz und hohe, also niedrige Expressionswerte, in grün dargestellt.

Die Berechnung der x-fachen Induktion der Expressionslevel (MW aus *real-time* PCR Analyse a und b) relativ zum Zeitpunkt Null der getesteten viralen Gene ermöglichte den direkten Vergleich zwischen den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen im Verlauf der Reaktivierungskinetik. Bei Betrachtung von Abb. 17 wird klar, dass in Abwesenheit von CBF1 alle untersuchten Gene aktiviert wurden, das Expressionsniveau aber deutlich unter dem Wert für die CBF1-positiven Linien lag (Abb. 17).

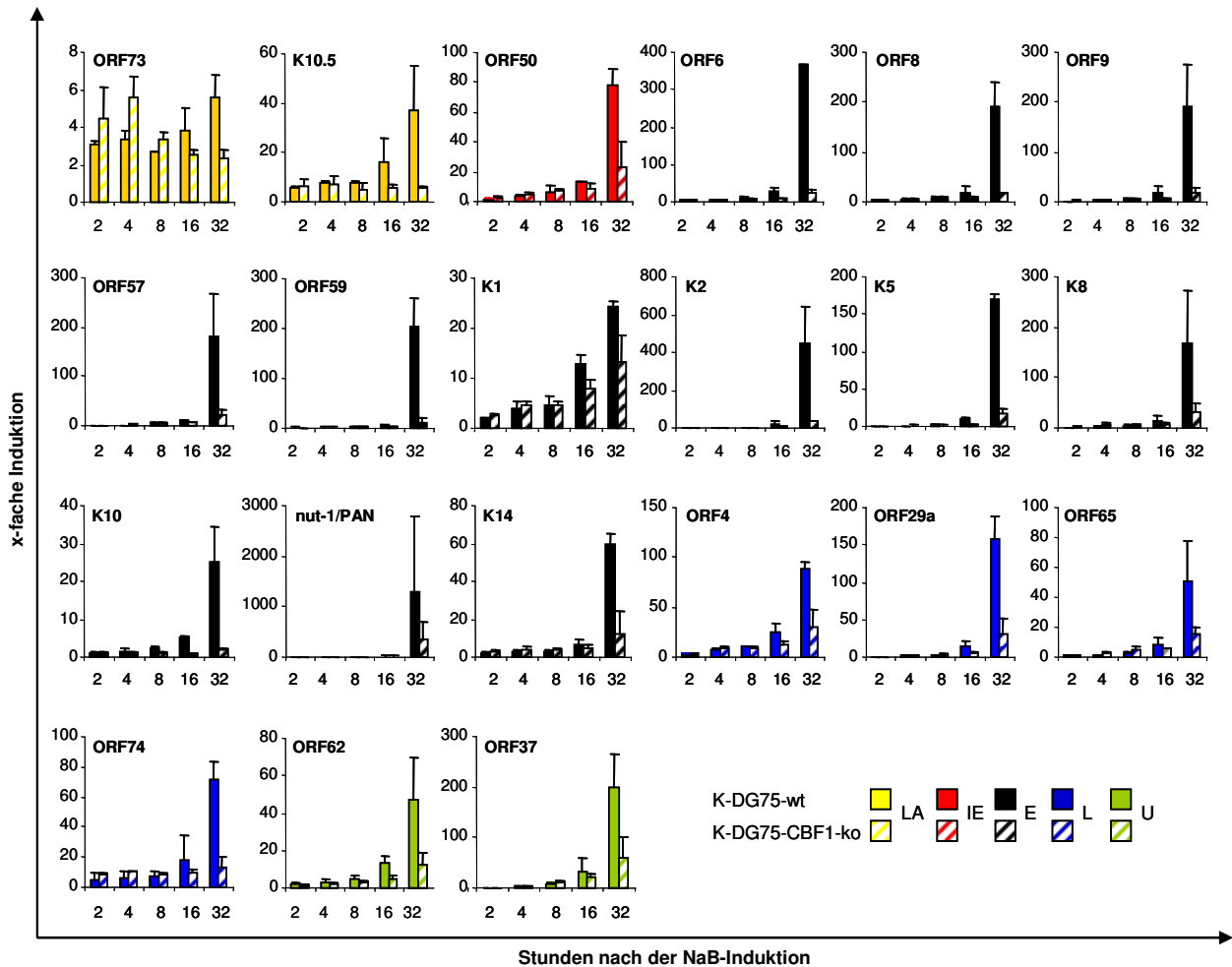


Abb. 17: Untersuchung der im KSHV-Array regulierten Gene im Verlauf des lytischen Zyklus mittels *real-time* PCR. Die Expression der ausgewählten KSHV-Gene (n=21) aus den verschiedenen Klassen (ORF73, K10.5 (latent, LA), ORF50 (*immediate-early*, IE), ORF6, ORF8, ORF9, ORF57, ORF59, K1, K2, K5, nut-1/PAN, K8, K10, K14 (*early*, E), ORF4, ORF29a, ORF65, ORF74 (*late*, L), ORF37 und ORF62 (unbekannt, U)) wurde in *real-time* PCR-Analysen mit spezifischen Primern zwischen den K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen verglichen. Die relative Transkriptmenge, auf beta-Aktin normalisiert, wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Amplifikationseffizienz des verwendeten Primerpaares relativ zu einer Kalibratorprobe bestimmt. Die x-fache Induktion der relativen Transkriptmenge wurde relativ zum Zeitpunkt Null ermittelt. Dargestellt sind der Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten zweier verschiedener K-DG75-wt- und CBF1-ko-Linien.

Um den Unterschied der Expressionslevel der getesteten Gene zwischen den wt- und CBF1-negativen Zellen im Verlauf der Reaktivierungskinetik zu verdeutlichen, wurde der Quotient aus der relativen Transkriptmenge (MW aus *real-time* PCR-Analyse a und b) der K-DG75-wt- und der CBF1-ko-Zellen ermittelt, der die x-fach reduzierte Induktion der Gene in den CBF1-ko-Zellen widerspiegelte. Die x-fach erhöhte Induktion der Gene wurde aus dem Quotienten der relativen Transkriptmenge der K-DG75-ko- und der wt-Zellen bestimmt.

Ein mindestens 2-fach höheres Expressionsniveau in den CBF1-negativen Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen konnte 2 Stunden (ORF74, K8, ORF57 und ORF50) und 4 Stunden (ORF74, K8, ORF65 und ORF37) nach der NaB-Induktion für je vier KSHV-Gene

berechnet werden. Nach 8 Stunden war nur für das Gen K8 ein 2-fach erhöhtes Transkriptlevel zu beobachten. Die Expressionsstärke dieser Gene war jedoch in den CBF1-negativen Zellen maximal um das 3-fache erhöht. Im Vergleich dazu konnte ein mindestens 2-fach reduziertes Transkriptniveau 16 Stunden nach NaB-Induktion für über die Hälfte der getesteten Gene in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen nachgewiesen werden. Nach 32 Stunden waren mit Ausnahme des Gens K1 alle KSHV-Gene in Abwesenheit von CBF1 deutlich schwächer exprimiert. Die Gene ORF9, K5, ORF8, K2, K10/vIRF4, ORF6 und ORF59 waren in den CBF1-ko-DG75-Zellen am deutlichsten reduziert (Abb. 18).

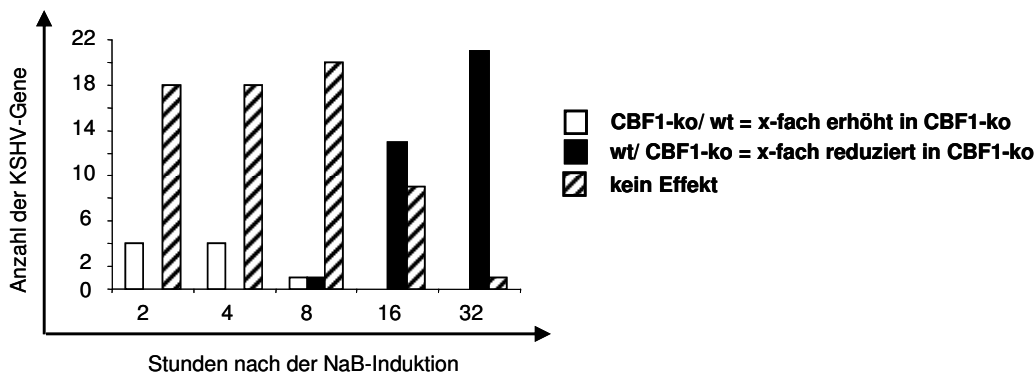


Abb. 18: Vergleich der Expression der 21 Gene in reaktivierten wt- und CBF1-negativen Zellen. Der x-fache Unterschied der relativen Transkriptmenge der 21 getesteten Gene, normalisiert auf beta-Aktin, relativ zum Zeitpunkt Null, wurde für jeden Zeitpunkt (2, 4, 8, 16 und 32 Stunden nach der NaB-Induktion) berechnet. Durch den Quotienten aus den Werten für die Gene der K-DG75-wt- und der Gene der CBF1-ko-Linie wurden die x-fach reduzierten Gene in den CBF1-ko-Zellen ermittelt. Durch den Quotienten aus den Werten für die Gene der K-DG75-CBF1-ko- und der Gene der wt-Linie wurden die x-fach induzierten Gene in den CBF1-ko-Zellen ermittelt. Dargestellt ist die Anzahl der Gene, welche in den CBF1-ko-Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen mindestens 2-fach erhöht oder reduziert waren.

In Tab. 25 sind die Array-Daten den *real-time* PCR-Daten gegenübergestellt. Gezeigt ist die x-fache Induktion der Transkriptlevel nach chemischer Reaktivierung des lytischen Zyklus der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen für die ausgewählten 21 Gene. Da bei den KSHV-Array-Daten keine genspezifischen Kalibratorproben mitgeführt wurden, wurden die normalisierten ΔCt -Werte des KSHV-Arrays und der *real-time* PCR-Analysen relativ zum Zeitpunkt Null, also im nicht-induzierten Zustand der Zellen, berechnet ($\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{GenX zu } t_x} - Ct_{\text{GenX zu } t_0}) - (Ct_{\beta\text{-Aktin zu } t_x} - Ct_{\beta\text{-Aktin zu } t_0})$, t = Zeitpunkt). Dabei zeigte ein negativer $\Delta\Delta Ct$ -Wert die Induktion und ein positiver $\Delta\Delta Ct$ -Wert die Repression eines Transkriptes an. Zur Darstellung einer x-fachen Induktion nach den verschiedenen Zeitpunkten, relativ zum Zeitpunkt Null, wurde der Kehrwert aus den \log_2 -transformierten $\Delta\Delta Ct$ -Werten gebildet. Die x-fach reprimierten Gene sind als \log_2 -transformierte $\Delta\Delta Ct$ -Werte gezeigt.

Die KSHV-Array-Daten konnten in den *real-time* PCR-Analysen nicht für alle der 21 ausgewählten Gene zu jedem Zeitpunkt bestätigt werden. So zeichnete sich in der Array-Analyse eine Gruppe von Genen ab, die im Verlauf der NaB-Kinetik in den CBF1-negativen Zellen nicht nur schwächer induziert, sondern reprimiert wurden. Dabei handelte es sich um die Gene ORF29a, ORF59, ORF65, ORF74, K1 und K5. Für die Transkripte von ORF50/Rta, K10/vIRF4, ORF73/LANA und K10.5/vIRF3 war im KSHV-Array in den CBF1-negativen Zellen nach 32 Stunden NaB ein erhöhtes Expressionslevel zu detektieren. In den zwei unabhängig durchgeführten *real-time* PCR-Analysen sowie in den darauffolgenden Experimenten konnten diese Beobachtungen für keines dieser Gene reproduziert werden. Es darf also angenommen werden, dass es sich dabei um technische Probleme handelte.

Trotz den Abweichungen bei der Expression dieser aufgezählten Gene zwischen den KSHV-Array-Daten und den *real-time* PCR-Daten zeichnete sich deutlich ab, dass in Abwesenheit von CBF1 die Expression einer Reihe von KSHV-Genen, die einen essentiellen Beitrag zur Regulation der lytischen Phase leisten, stark beeinträchtigt war. Der Einfluss von CBF1 während der lytischen Phase wird erst 16 Stunden nach der Reaktivierung unverkennbar. Diese Beobachtung spricht für eine Anhäufung von direkt oder indirekt CBF1-abhängigen Ereignissen im Verlauf des lytischen Zyklus, welche die Produktion von infektiösen Viruspartikeln letztendlich unmöglich macht. Die Differenzierung zwischen einem direkten oder indirekten CBF1-Einfluss bei der Regulation viraler Gene während der lytischen Reaktivierung wurde im Folgenden durch Reporterstudien und Gel-Retardationsanalysen charakterisiert (Abschnitt 4.3).

Tab. 25: Gegenüberstellung der KSHV-Array- und der *real-time* PCR-Daten ausgewählter KSHV-Gene.

| Gen | KSHV-Array | | | | | | | | | | <i>real-time</i> -PCR | | | | | | | | | |
|-------------|--------------------------------|-------|-------|----------|----------|-------------------|----------|----------|----------|----------|--------------------------------|-----|------|------|-------|-------------------|------|------|------|-------|
| | KSHV-DG75-wt | | | | | KSHV-DG75-CBF1-ko | | | | | KSHV-DG75-wt | | | | | KSHV-DG75-CBF1-ko | | | | |
| | Stunden nach der NaB-Induktion | | | | | | | | | | Stunden nach der NaB-Induktion | | | | | | | | | |
| | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 |
| ORF4 | 2,6 | 2,7 | 4,6 | 19,0 | 39,8 | 2,0 | 7,7 | 5,0 | 8,5 | 11,6 | 3,2 | 6,7 | 10,9 | 26,0 | 93,8 | 3,6 | 8,6 | 10,1 | 13,4 | 29,0 |
| ORF6* | 7,2 | 2,4 | 13,9 | 33,8 | 451,9 | 4,4 | 2,3 | 36,5 | 47,2 | 48,5 | 2,4 | 5,8 | 11,7 | 28,3 | 401,7 | 2,6 | 6,5 | 7,3 | 9,7 | 24,4 |
| ORF8* | 34,9 | 7,0 | 22,4 | 163,7 | 432,0 | 2,1 | 6,8 | 5,6 | 5,2 | 5,8 | 1,7 | 3,8 | 6,3 | 16,8 | 197,9 | 2,2 | 4,5 | 5,3 | 6,5 | 16,6 |
| ORF9 | 34,1 | 40,8 | 46,9 | 160,9 | 1629,3 | 3,1 | 9,5 | 13,5 | 15,6 | 36,1 | 1,3 | 3,0 | 6,6 | 19,2 | 226,2 | 2,0 | 4,2 | 5,2 | 7,6 | 19,9 |
| ORF29a | 115,8 | 2,6 | 20,3 | 51,8 | 985,7 | 2,7 | 1,4 | 7,2 | 4,0 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 2,7 | 13,6 | 151,3 | 1,1 | 1,7 | 2,6 | 5,6 | 24,4 |
| ORF37 | 7,7 | 10,7 | 28,6 | 58,5 | 286,0 | 1,4 | 9,6 | 29,4 | 54,2 | 176,1 | 1,1 | 2,1 | 5,6 | 26,8 | 210,1 | 1,7 | 5,4 | 9,3 | 22,9 | 55,5 |
| ORF50* | 19,3 | 32,9 | 58,1 | 16,6 | 51,3 | 6,5 | 33,7 | 701,8 | 590,2 | 1,9E+03 | 1,4 | 3,0 | 6,4 | 15,3 | 95,5 | 2,6 | 5,1 | 8,0 | 8,7 | 23,7 |
| ORF57-spl* | 13,4 | 5,1 | 12,2 | 73,8 | 932,5 | 1,0 | 1,3 | 2,1 | 5,3 | 22,9 | 1,2 | 1,3 | 3,6 | 10,8 | 178,0 | 1,5 | 2,4 | 4,2 | 6,9 | 20,9 |
| ORF57* | 7,4 | 5,4 | 9,2 | 32,1 | 3,4 E+02 | 1,8 | 2,0 | 2,2 | 5,6 | 23,0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ORF59* | 1,1 | 2,9 | 3,9 | 919,7 | 1,7 E+03 | 1,5 | 2,4 | 289,0 | 238,0 | 13,1 | 1,0 | 1,5 | 2,4 | 7,0 | 237,3 | 1,1 | 1,4 | 1,8 | 2,9 | 9,7 |
| ORF62 | 1,0 | 2,0 | 3,4 | 2,9 | 44,2 | 1,3 | 2,0 | 3,2 | 3,6 | 8,9 | 1,2 | 2,4 | 4,5 | 12,9 | 47,2 | 1,4 | 2,3 | 3,1 | 4,9 | 11,5 |
| ORF65 | 15,2 | 13,4 | 34,2 | 8,7 E+04 | 3,9 E+04 | 1,5 | 2,9 | 79,3 | 55,3 | 13,8 | 1,0 | 1,4 | 2,7 | 8,1 | 51,8 | 1,6 | 3,0 | 4,8 | 6,1 | 16,0 |
| ORF73* | 6,5 | 4,6 | 5,0 | 13,0 | 10,0 | 3,0 | 3,4 | 139, | 90,5 | 105,4 | 3,1 | 3,5 | 2,8 | 3,9 | 5,7 | 4,4 | 5,7 | 3,4 | 2,6 | 2,4 |
| ORF74* | 50,7 | 21,6 | 2,0 | 21,5 | 55,1 | 2,9 | 2,2 | 3,9 | 4,1 | 1,6 | 4,0 | 5,5 | 6,7 | 14,9 | 76,2 | 8,4 | 10,6 | 8,4 | 9,3 | 12,7 |
| K10.5 | 36,6 | 26,8 | 37,4 | 8,8 | 12,4 | 11,1 | 9,1 | 89,9 | 66,7 | 98,4 | 5,7 | 8,3 | 8,5 | 15,5 | 37,8 | 6,2 | 6,9 | 5,2 | 5,6 | 6,2 |
| K10.5-spl | 208,7 | 133,0 | 154,9 | 22,9 | 41,8 | 13,3 | 13,3 | 66,0 | 47,3 | 58,7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| K8-exon3* | 6,9 | 6,3 | 11,6 | 21,1 | 103,3 | 1,3 | 3,7 | 12,3 | 11,1 | 36,4 | 1,1 | 2,2 | 3,6 | 9,6 | 157,6 | 3,2 | 7,2 | 9,0 | 8,4 | 28,2 |
| K8-exon3-4* | 2,8 | 7,0 | 16,1 | 33,1 | 221,3 | 3,4 | 8,5 | 11,2 | 11,3 | 32,0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| K1 | 5,7 | 9,1 | 8,5 | 199,5 | 975,5 | 1,2 | 2,5 | 9,2 | 4,9 | 3,6 | 2,4 | 4,1 | 5,2 | 15,6 | 29,9 | 2,7 | 5,6 | 5,4 | 9,4 | 15,6 |
| K14* | 29,7 | 6,5 | 20,0 | 20,3 | 163,1 | 1,7 | 4,3 | 17,9 | 13,4 | 76,4 | 1,8 | 2,3 | 3,0 | 7,0 | 69,6 | 3,2 | 3,1 | 4,2 | 4,4 | 9,8 |
| K10 | 8,5 | 3,8 | 4,0 | 1,4 | 3,4 | 1,3 | 2,4 | 8,5 | 8,3 | 18,3 | 1,1 | 1,4 | 2,2 | 5,8 | 31,1 | 1,1 | 1,3 | 1,6 | 1,3 | 1,8 |
| K2* | 5,1 | 3,5 | 8,9 | 17,3 | 100,4 | 1,0 | 2,3 | 3,9 | 9,1 | 49,5 | 4,1 | 1,5 | 3,4 | 18,3 | 396,8 | 1,5 | 2,0 | 2,8 | 5,6 | 35,2 |
| K5* | 8,3 | 4,1 | 5,9 | 8,4 E+06 | 2,6 E+07 | 8,1 E+08 | 2,0 E+08 | 2,1 E+05 | 1,1 E+05 | 1,7 E+04 | 1,1 | 1,1 | 1,9 | 9,4 | 207,2 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,9 | 16,1 |
| nut-1/PAN* | 6,2 | 2,2 | 4,2 | 31,8 | 1234,7 | 1,1 | 1,7 | 7,9 | 49,0 | 619,5 | 1,2 | 1,1 | 1,3 | 10,5 | 986,7 | 1,0 | 1,1 | 2,4 | 8,8 | 338,1 |

Tab. 25: Gegenüberstellung der KSHV-Array und der *real-time* PCR-Daten ausgewählter KSHV-Gene. Um die aus dem KSHV-Array erhaltenen Expressionslevel der KSHV-Gene der K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen zu überprüfen, wurden erneut Reaktivierungskinetiken mit NaB für 2, 4, 8, 16 und 32 Stunden durchgeführt, RNA isoliert und cDNA präpariert. Die cDNA wurde in den *real-time* PCR-Analysen mit spezifischen Primern für ausgewählte Gene eingesetzt. Die Ct-Rohwerte der ausgewählten Primerpaare, basierend auf dem KSHV-Array oder auf dem Mittelwert von zwei unabhängig durchgeführten *real-time* PCR-Analysen, wurden auf das Haushaltsgen beta-Aktin normalisiert und relativ zum Nullwert berechnet ($\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{Genx zu } t_x} - Ct_{\text{Genx zu } t_0}) - (Ct_{\beta\text{-Aktin zu } t_x} - Ct_{\beta\text{-Aktin zu } t_0})$, t = Zeitpunkt). In der Tabelle ist für die x-fache Induktion der Transkriptlevel nach Reaktivierung des lytischen Zyklus zu den Zeitpunkten 2, 4, 8, 16 und 32 Stunden der Kehrwert aus den log2-transformierten $\Delta\Delta Ct$ -Werten gezeigt (Zahlen in schwarz). Die x-fach reprimierten Gene sind als log2-transformierte $\Delta\Delta Ct$ -Werte dargestellt (Zahlen in grün). Die KSHV-Gene, für die eine CBF1-abhängige Regulation in der Literatur bereits beschrieben ist, sind mit einem Stern markiert.

4.2.3 Auch in der angereicherten GFP-RFP-doppelt-positiven K-DG75-CBF1-ko-Zellpopulation ist die Induktion viraler Transkripte reduziert

In den vorangegangenen FACS-Studien konnten keine Unterschiede im Anteil von GFP-RFP-doppelt-positiven Zellen nach der NaB-Induktion zwischen den wt- und CBF1-ko-K-DG75-Zellen beobachtet werden (Abschnitt 4.1.4.1). Um dennoch ausschließen zu können, dass das verminderte Expressionsniveau der viralen Transkripte im Verlauf des lytischen Zyklus in den CBF1-negativen Zellen auf einer ungleichen Verteilung von latenten und lytisch-induzierten Zellen in den wt- oder CBF1-ko-Linien beruht, sollten die Transkriptlevel in angereicherten GFP-positiven oder RFP-GFP-doppelt-positiven Zellen untersucht werden. Die Expression von GFP im nicht-induzierten Zustand sowie von GFP und RFP nach Reaktivierung des lytischen Zyklus ermöglichte die Sortierung dieser Zellen im Durchflusszytometer.

48 Stunden nach der NaB-Induktion wurden die K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Zellen in GFP-positive oder GFP-RFP-doppelt-positive Zellen sortiert. Von der Gesamtzellpopulation waren 2,1% der K-DG75-wt- und 3,9% der CBF1-ko-Zellen GFP-RFP-doppelt-positiv (Abb. 19A). Die RNA der sortierten Zellen wurde isoliert, mit DNase verdaut und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Parallel wurde die RNA aus lytisch-induzierten nicht-sortierten Zellen präpariert. In *real-time* PCR-Analysen mit spezifischen Primern wurden die Transkripte der KSHV-Gene ORF50/Rta, ORF57/Mta und ORF59 überprüft. Die relative Transkriptmenge der getesteten Gene wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Amplifikationseffizienz relativ zu einer genspezifischen Kalibratorprobe ermittelt und auf beta-Aktin normalisiert.

Als erstes fiel die über 10-fach erhöhte relative Transkriptmenge in den GFP- oder GFP-RFP-sortierten Zellen im Vergleich zu den nicht-sortierten Zellen auf. Dieser Effekt beruhte auf der erhöhten Akkumulation viraler Transkripte in der 100%-igen lytischen Zellpopulation im Vergleich zu der heterogenen Kultur mit einem sehr geringen Anteil an

lytischen Zellen. Bei Betrachtung der relativen Transkriptlevel der nicht-sortierten, CBF1-negativen Zellen zeigte sich im Vergleich zu den wt-Zellen für die Gene ORF50/Rta ein 1,5-fach, für ORF57/Mta ein 4,2-fach und für ORF59 ein 3,3-fach reduziertes Expressionsniveau.

Die Unterschiede zwischen der relativen Transkriptmenge dieser Gene in den wt- und CBF1-K-DG75-Zellen waren in den GFP-RFP-sortierten Zellen deutlich ausgeprägter. So wurde in den GFP-RFP-doppelt-positiven CBF1-negativen Zellen für ORF57/Mta ein 7-fach, für ORF59 ein 8,5-fach und für ORF50/Rta ein sogar 16-fach vermindertes Transkriptniveau nachgewiesen (Abb. 19B).

Dieses Experiment zeigte, dass die verminderte Induktion der viralen Transkripte in Abwesenheit von CBF1 nicht auf eine größere Heterogenität von latenten Zellen in der CBF1-negativen Kultur zurückzuführen ist, sondern der tatsächlichen Situation in lytisch-reaktivierten Zellen entspricht.

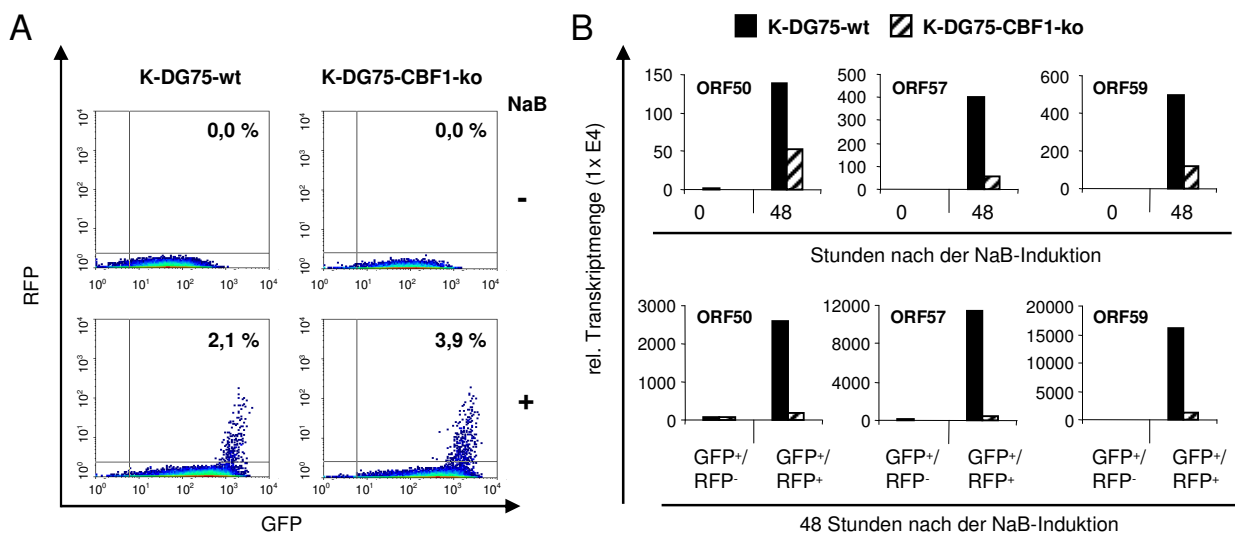


Abb. 19: Die stark verminderte Induktion viraler Transkripte in Abwesenheit von CBF1 zeigt sich auch in einer GFP-RFP-doppelt-positiven angereicherten Zellpopulation. Die K-DG75-wt- und CBF1-ko-Linie wurde in einer Dichte von 4×10^5 Zellen/ ml ausgesät und mittels 3 mM NaB für 48 Stunden in Medium ohne Puromycin kultiviert. Für die Sortierung in GFP-positive (GFP+/RFP-) oder GFP-RFP-doppelt-positiv (GFP+/RFP+) Zellen mittels Durchflusszytometrie (MoFlo) wurden die Zellen auf eine Dichte von 3×10^7 Zellen/ ml in PBS eingestellt. Von 1×10^8 eingesetzten Zellen wurden je 2×10^6 GFP- oder GFP-RFP-doppelt-positiv Zellen sortiert. (A) Im Density-Plot ist der prozentuale Anteil an GFP- oder GFP-RFP-doppelt-positiven K-DG75-Zellen vor und nach 48 Stunden der NaB-Induktion dargestellt. (B) Die RNA aus 2×10^6 nicht-sortierten, GFP- oder GFP-RFP-sortierten K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen wurde isoliert, mit DNase verdaut und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Proben wurden mittels *real-time* PCR mit spezifischen Primern getestet. Die relative Transkriptmenge von ORF50/Rta, ORF57/Mta und ORF59 wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Amplifikationseffizienz relativ zu einer genspezifischen Kalibratorprobe, nach interner Normalisierung auf beta-Aktin, berechnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängig durchgeführter Experimente.

4.2.4 Die Überexpression des KSHV-Gens ORF50/Rta fördert nicht die Expression viraler Gene in den CBF1-negativen Zellen

Die Expression des *immediate-early* Gens ORF50/Rta ist für die Reaktivierung und virale Replikation latent KSHV-infizierter B-Zellen absolut essentiell (Lukac et al., 1999). Das beeinträchtigte Transkriptniveau der viralen Gene in den CBF1-negativen Linien könnte somit auf die reduzierte Expression des ORF50/Rta-Transkriptes zurückzuführen sein. Um diese mögliche Ursache zu überprüfen, sollte untersucht werden, ob die Überexpression von ORF50/Rta der verminderten Expression viraler Gene in den KSHV-infizierten CBF1-negativen Zellen entgegenwirken kann.

Die K-DG75-wt oder CBF1-ko-Zellen wurden mit 15, 30 oder 60 µg eines ORF50/Rta-Expressionsvektors oder dem entsprechenden Kontrollvektor (pHACR3) mittels Elektroporation transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 3 mM NaB induziert und für weitere 12 oder 24 Stunden kultiviert. Als Kontrolle wurden parallel nicht-transfizierte Zellen für die entsprechenden Zeitpunkte lytisch induziert. Die RNA wurde isoliert, mit DNase verdaut und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde für *real-time* PCR-Analysen mit spezifischen Primern eingesetzt. Die relative Transkriptmenge der KSHV-Gene ORF50/Rta, ORF57/Mta und ORF59 wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Amplifikationseffizienz relativ zu einer genspezifischen Kalibratorprobe ermittelt und auf beta-Aktin normalisiert. Zur Darstellung der Daten wurde die x-fache Induktion des Transkriptniveaus relativ zum Zeitpunkt Null nicht-transfizierter Zellen berechnet.

Mit zunehmender Konzentration an transfizierter ORF50-Plasmid-DNA stieg auch die x-fache Induktion der Transkriptlevel der untersuchten Gene an. Die Transkripte in den Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen 24 Stunden nach der NaB-Induktion ein erhöhtes Expressionsniveau. Dies könnte auf eine größere Sensitivität der transfizierten Zellen auf die NaB-Behandlung zurückzuführen sein, welche durch den Elektroporationsprozess zusätzlichem Stress ausgesetzt waren.

Die ORF50/Rta-Transkripte waren sowohl in der CBF1-negativen als auch in der CBF1-positiven Linie stark erhöht. Die zusätzliche Behandlung mit NaB für 12 oder 24 Stunden bewirkte keine erhebliche Veränderung der relativen Transkriptmenge von ORF50/Rta. Das maximale ORF50/Rta-Transkriptniveau schien mit diesen Mengen an ektopisch exprimiertem ORF50/Rta und NaB-induzierten endogenem ORF50/Rta ausgereizt

zu sein. Die Transfektion des ORF50/Rta-Konstruktes bewirkte in CBF1-ko-Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen ein höheres ORF50/Rta-Transkriptniveau. Obwohl es sich bei der wt- und CBF1-ko-K-DG75-Linie um dieselben Zellen handelt und das Transfektionsprotokoll für diese Zellen zuvor im Labor optimiert wurde, können Schwankungen in der Transfektionseffizienz zwischen den einzelnen Ansätzen nicht ausgeschlossen werden, und die erhöhte ORF50/Rta-Expression in den ko-Zellen erklären.

Bei Betrachtung der ORF57/Mta- und ORF59-Transkripte nach Überexpression von ORF50/Rta zeigte sich für beide Zelllinien in den Transfektionskontrollansätzen im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen ein erhöhtes Expressionsniveau 24 Stunden nach der Transfektion. Ein zusätzlicher Anstieg der viralen Transkripte konnte nach Zugabe von NaB für weitere 12 oder 24 Stunden sowohl für die wt- als auch für CBF1-ko-K-DG75-Zellen beobachtet werden. Trotz der Überexpression von ORF50/Rta war die Akkumulation der Transkripte von ORF57/Mta und ORF59 in den CBF1-negativen Zellen aber im Vergleich zu den wt-Zellen stark vermindert. So zeigte sich für das ORF57/Mta-Gen nach ORF50/Rta-Überexpression mit 60 µg Plasmid-DNA und 24 Stunden NaB in den wt-Zellen eine 293-fache und in den CBF1-ko-Zellen nur eine 32-fache Erhöhung. Unter den maximalen Induktionsbedingungen war für das ORF59-Transkript in den wt-Zellen eine 452-fache und in den CBF1-negativen Zellen eine 69-fache Zunahme zu detektieren (Abb. 20).

Obwohl die Expression dieser Gene durch die verstärkte lytische Reaktivierung in den CBF1-negativen Zellen deutlich erhöht war, konnte die wt-Situation nicht rekonstituiert werden. Die Transkription der viralen Gene in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen nach lytischer Reaktivierung war somit nachweislich nicht durch ein zu geringes ORF50/Rta-Expressionsniveau beeinträchtigt.

4.3 Untersuchung der CBF1-abhängigen Regulation ausgewählter KSHV-Promotoren

4.3.1 Charakterisierung CBF1-abhängig regulierter KSHV-Gene

Der Vergleich der Genexpressionsmuster viraler Gene in den K-DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen zeigte, dass nach 32 Stunden lytischer Reaktivierung die Expression von über 50% der KSHV-Gene in den CBF1-negativen Zellen stark beeinträchtigt war. Der Einfluss von CBF1 auf die Expression der viralen Gene im Verlauf des lytischen Zyklus konnte jedoch auf keine bestimmte Klasse von Genen eingeschränkt werden. So konnte in den KSHV-infizierten CBF1-negativen Zellen für latente, *immediate-early*, *early* und *late* Gene ein stark vermindertes Transkriptniveau nachgewiesen werden. In den *real-time* PCR-Analysen konnte dieser Effekt, mit Ausnahme des Gens K1, für alle ausgewählten KSHV-Gene bestätigt werden.

Für 12 dieser Gene war bereits eine CBF1-abhängige Regulation in der Literatur bekannt. Da neben der CBF1-ORF50/Rta-Bindung noch meist zusätzlich eine direkte oder eine indirekte ORF50/Rta-DNA-Interaktion im Komplex mit anderen zellulären Faktoren beschrieben ist, sollten diese Gene auch in Abwesenheit von CBF1 exprimiert werden. Bei Betrachtung der essentiellen Rolle dieser Gene im Verlauf des viralen Lebenszyklus wird klar, dass auch eine eingeschränkte Expression dieser Gene durch das Fehlen von CBF1 die verschiedenen Phasen des viralen Lebenszyklus beeinträchtigen könnte (siehe Abschnitt 1.3.2).

Die verminderte Akkumulation viraler Transkripte in den KSHV-infizierten CBF1-negativen Zellen nach 32 Stunden NaB lässt das Zusammenspiel von Einzelereignissen, basierend auf direkten und indirekten CBF1-abhängigen Effekten, vermuten. Um nun direkte CBF1-bedingte Effekte von Sekundärereignissen zu differenzieren, sollte anhand der Genexpressionsdaten des KSHV-Array und der *real-time* PCR-Analysen die Expression der bekannten CBF1-abhängig regulierten Gene mit den restlichen Genen im Verlauf der Reaktivierungskinetik der K-DG75-CBF1-ko-Zellen verglichen werden. Ziel war es, die Gene für die noch keine CBF1-abhängige Regulation beschrieben ist, im nächsten Schritt in Reporterstudien und Gel-Retardationsanalysen auf eine mögliche CBF1-abhängige Regulation zu überprüfen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse in Tab. 25 (Abschnitt 4.2.2.3) zeigt sich, dass für das KSHV-Gen ORF50/Rta, dem Aktivator des lytischen Zyklus, und für die Gene ORF6, K8,

ORF57 und ORF59, welche einen wichtigen Beitrag bei der viralen DNA-Replikation leisten, im KSHV-Array und bei den *real-time* PCR-Analysen ein mindestens 3-fach reduziertes Transkriptniveau nach 32 Stunden NaB in den K-DG75-CBF1-ko-Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen nachzuweisen war. Die Expression des Strukturproteins ORF8 war in Abwesenheit von CBF1 in beiden Experimenten mindestens 10-fach niedriger. Auch die Transkriptmenge der Gene K2 und K5, für die eine immunmodulierende Funktion beschrieben ist, lag mindestens 2-fach unter dem Wert der wt-Zellen. Das Expressionsniveau von ORF73/LANA, welches unter anderem eine essentielle Rolle bei der Erhaltung des viralen Genoms während der Latenz spielt, wich in den CBF1-ko-Zellen nur geringfügig vom wt-Niveau ab. Das im Array erhöhte Transkriptlevel von ORF73/LANA in den CBF1-negativen Zellen konnte in keinem der folgenden *real-time* PCR-Versuche reproduziert werden. Auch die Expression der Gene ORF74 und K14, Modulatoren zellulärer Signalwege, und des abundanten nut-1/PAN-Transkripts war in Abwesenheit von CBF1 nur schwach eingeschränkt (Tab. 25).

Die restlichen 9 Gene zeigten in den *real-time* PCR-Analysen, mit Ausnahme des Gens K1, ein mindestens 2,5-fach reduziertes Expressionsniveau in Abwesenheit von CBF1. Die kontroversen Array-Daten für die Gene K10 und K10.5 konnten in keinen der darauffolgenden Experimenten wiederholt werden. Auch die Repression der Transkriptlevel für die Gene ORF29a, ORF65 und K1 in den CBF1-negativen Linien konnte nicht beobachtet werden (Tab. 25).

Bei der Einteilung dieser potentiell CBF1-abhängig regulierten Kandidaten nach ihrer beschriebenen Funktion (Jenner and Boshoff, 2002) kristallisierte sich keine Gruppe von Genen heraus, die in den CBF1-negativen Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen besonders stark oder schwach exprimiert war (Tab. 26).

| Gen | Klasse | Funktion |
|---------------------------------|--------|---|
| | | Virale Replikation und Nukleotid Metabolismus |
| ORF9 | E | DNA-Polymerase |
| ORF37 | u | Alkaline-Exonuklease |
| Strukturproteine | | |
| ORF29a | L | <i>DNA packaging protein</i> |
| ORF62 | u | <i>Capsid assembly and DNA maturation protein</i> |
| ORF65 | L | <i>Capsomer interacting protein</i> |
| Immunmodulation | | |
| ORF4 | L | <i>Complement-binding protein</i> |
| K10.5/vIRF3 | LA | <i>viral interferone regulatory protein-3</i> |
| Zellteilung und Apoptose | | |
| K1 | E | <i>Itam-containing signal transducing membrane glycoprotein</i> |
| unbekannt | | |
| K10/vIRF4 | E | - |

Tab. 26: Eine CBF1-abhängige Regulation der ausgewählten KSHV-Gene wurde bisher noch nicht beschrieben. Die Unterteilung dieser Gene nach ihrer Funktion erfolgte wie beschrieben bei Jenner und Boshoff (Jenner and Boshoff, 2002). Die Klassifizierung erfolgte für jedes Gen in latente (LA), *immediate-early* (IE), *early* (E), *late* (L) und unbekannte (u) Gene.

Die 9 Gene, für die eine CBF1-abhängige Regulation noch nicht bekannt war, setzen sich aus den Genen K1, ORF4, ORF9, ORF29a, ORF37, ORF62, ORF65, K10.5 und K10 zusammen. Eine Aktivierung über ORF50/Rta war für die Gene K1, ORF4, ORF9 und ORF37 in der Literatur bereits beschrieben (Bowser et al., 2002, Bowser et al., 2006, Ellison et al., 2009). Ob diese Gene in direkter Abhängigkeit von CBF1 über ORF50/Rta aktiviert werden, oder ob die Transkription dieser Gene durch andere virale oder zelluläre Faktoren in Abwesenheit von CBF1 indirekt beeinflusst wird, sollte nun auf molekularbiologischer Ebene geklärt werden.

4.3.2 Promotoranalyse potentiell CBF1-abhängig regulierter KSHV-Gene

Von den 9 potentiellen Kandidaten wurden 5 Gene nach folgenden Kriterien ausgewählt: (i) die Regulation der Gene sollte in den K-DG75-CBF1-ko-Zellen im KSHV-Array und in den *real-time* PCR-Analysen 32 Stunden nach der lytischen Induktion im Vergleich zu den wt-Zellen mindestens 2-fach reduziert sein, (ii) die hypothetischen Promotorbereiche dieser Gene sollten mindestens eine potentielle CBF1-Bindungsstelle besitzen und (iii) eine CBF1-abhängige ORF50/Rta Regulation der entsprechenden Gene sollte in der Literatur noch nicht beschrieben sein.

Für die Gene ORF4, ORF9, ORF29a, ORF62 und ORF65 konnte sowohl im KSHV-Array als auch in den *real-time* PCR-Analysen ein mindestens 2-fach vermindertes Transkriptniveau in den CBF1-negativen Zellen nachgewiesen werden.

Da die Regulation und die Lokalisation der Promotoren dieser KSHV-Gene noch nicht beschrieben war, wurde ein Bereich von 1 kb stromaufwärts vom 5'-Ende des Translationsstartpunktes „ATG“ dieser Gene als hypothetische Promotorregion (hp) ausgewählt. Mit Hilfe des *MatInspector*, einer Software der Firma Genomatix, wurden die Promotorbereiche auf potentielle CBF1-Bindungsstellen überprüft, welche der Matrixfamilie V\$RBPF (Matrices V\$RBPJK.01 und V\$RBPJK.02) entsprachen. Die Core-Sequenz der CBF1-Bindungsstelle setzt sich aus vier konservierten Basen zusammen, deren Matrixpositionen einem Konservierungsgrad größer 60 betragen (0 = nicht konserviert; 100 = absolut konserviert). Um die Core-Sequenz beider Matrices \$RBPJK.01 (nncgTGGGaaah) und V\$RBPJK.02 (nngTGGGaaann) zu bewahren und falsch-positive CBF1-Bindungsstellen einzuschränken, wurde die *Core similarity* auf 1,0 und die *Matrix similarity* auf größer 0,8 gesetzt, wobei der Wert 1,0 einem perfekten Treffer entspricht.

Im hypothetischen Promotorbereich von ORF4 konnten zwei, von ORF9 eine, von ORF29a und ORF62 drei und von ORF65 sogar fünf potentielle CBF1-Bindungsstellen identifiziert werden. Eine Rekrutierung von CBF1 in den Promotorbereich des Gens K5 war bereits beschrieben (Chang et al., 2005b). In diesen Experimenten wurde aber nur die Aktivierung des Promotors durch Notch überprüft. Da die Expression dieses Gens in den CBF1-negativen Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen um das 10-fache reduziert war und die Promotoranalyse eine hohe Anreicherung von fünf CBF1-Bindungsstellen ergab, sollte der Promotor auf eine mögliche CBF1-abhängige ORF50/Rta-Regulation untersucht werden.

Für die folgenden Experimente wurde zusätzlich ein Fragment von 1 kb stromaufwärts vom 5'-Ende des Translationsstartpunktes des ORF59-Gens als Kontrolle mitgeführt, für welches sowohl die Aktivierung durch ORF50/Rta als auch eine CBF1-abhängige Regulation in der Literatur bereits beschrieben ist (Liu et al., 2008) (Tab. 27).

| Promotor ^a | Lokalisation ^b | vorhergesagte CBF1-Bindung ^c | Orientierung ^d | Matrix-similarity ^e | Sequenz ^f |
|-----------------------|---------------------------|---|---------------------------|--------------------------------|----------------------|
| ORF59-p ^g | 96740-97739 | 97662-97674 | - | 0,998 | cacgTGGGaaaca |
| | | 97601-97613 | + | 0,928 | ttttTGGGaatgg |
| | | 96985-96997 | - | 0,841 | aataTGGGaggaa |
| ORF4-hp | 142-1141 | 340-351 | + | 0,815 | aatcTGGGcatcg |
| | | 854-866 | - | 0,836 | acaaTGGGcaaag |
| ORF9-hp | 10363-11362 | 11069-11081 | + | 0,931 | ctgcTGGGaatgc |
| ORF29a-hp | 54677-55676 | 55255-55267 | - | 0,852 | cgttTGGGagcgt |
| | | 55427-55439 | - | 0,979 | gggtTGGGaatg |
| | | 55590-55602 | - | 0,851 | acgaTGGGatgat |
| ORF62-hp | 101195-102194 | 101363-101375 | - | 0,831 | cagtTGGGcaaca |
| | | 101714-101726 | + | 0,824 | atacTGGGcagct |
| | | 101758-101770 | - | 0,845 | gaaGTGGGagggt |
| ORF65-hp | 112444-113443 | 112570-112582 | - | 0,841 | gcctTGGGacgcc |
| | | 112807-112819 | + | 0,846 | ttgTGGGaggaa |
| | | 113352-113364 | + | 0,812 | gagtTGGGcacag |
| | | 113391-113403 | - | 0,842 | cgtaTGGGcaaaa |
| | | 113433-113445 | + | 0,823 | ggccTGGGcacgg |
| K5-hp | 26484-27483 | 26532-26544 | - | 0,828 | taacTGGGcactc |
| | | 26979-26991 | + | 0,851 | cttcTGGGaaaaa |
| | | 27238-27250 | + | 0,823 | gtttTGGGcacgc |
| | | 27247-27259 | + | 0,835 | acgcTGGGgacgt |
| | | 27255-27267 | + | 0,892 | gacgTGGGatacc |

Tab. 27: Auflistung der potentiellen CBF1-Bindungsstellen in den Promotorbereichen der KSHV-Gene ORF4, ORF9, ORF29a, ORF62, ORF65, K5 und K10.

^a Der Bereich von 1 kb stromaufwärts vom 5'-Ende des Translationsstartpunktes der KSHV-Gene ORF4, ORF9, ORF29a, ORF62, ORF65, K5 und K10 wurde als hypothetische Promotorregion (hp) gewählt. Die entsprechenden Fragmente wurden aus der genomischen DNA der KSHV-positiven Zelllinie BC-1 gewonnen und mittels geeigneter Restriktionsschnittstellen in ein Luziferase-Reportergenkonstrukt kloniert.

^b Angabe der genauen Lokalisation der hypothetischen Promotorregionen im KSHV-Genom (BC-1, Typ M, NCBI Referenznummer U75698).

^c Die entsprechenden Promotorregionen wurden mit dem Programm *MatInspector* einer Software der Firma Genomatix auf potentielle CBF1-Bindungsstellen (Matrixfamilie V\$RBPF, die sich aus den Matrices V\$RBPK.01 und V\$RBPK.02 zusammensetzt) überprüft. Angegeben ist die genaue Lokalisation der vorhergesagten CBF1-Bindungsstellen im KSHV-Genom.

^d Die potentiellen CBF1-Bindungsstellen befinden sich sowohl auf dem Plus- (+) als auch auf dem Minusstrang (-) des KSHV-Genoms.

^e Um die Anzahl an falsch-positiven CBF1-Bindungsstellen einzuschränken, wurde die *Core similarity* auf 1,0 und die *Matrix similarity* auf größer 0,8 (ein perfekter Treffer ist 1,0) gesetzt.

^f Die Core-Sequenz besteht aus 4 konservierten Basen und ist in Großbuchstaben hervorgehoben. Die roten Buchstaben stehen für die Matrixpositionen mit einem Konservierungsgrad von größer 60 (0 = nicht konserviert; 100 = absolut konserviert).

^g Als Kontrolle wurde ein Fragment von 1 kb stromaufwärts vom 5'-Ende des Translationsstartpunktes des KSHV-Gens ORF59 hergestellt, für welches sowohl die Aktivierung durch ORF50/Rta als auch eine CBF1-abhängige Regulation in der Literatur bereits beschrieben ist.

Die hypothetischen Promotorbereiche der ausgewählten Gene wurden mit spezifischen Primern, die mit passenden Restriktionsschnittstellen für den Zielvektor ausgestattet waren, mittels PCR aus der genomischen DNA der KSHV-positiven Zelllinie BC-1 gewonnen. Die Fragmente wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in ein Luziferase-Reportergenkonstrukt ligiert. In Luziferase-Reportergenstudien sollten die Promotorkonstrukte ORF4-hp, ORF9-hp, ORF29a-hp, ORF62-hp, ORF65-hp und K5-hp sowohl auf eine Aktivierbarkeit durch ORF50/Rta als auch auf eine mögliche CBF1-abhängige Regulation durch ORF50/Rta überprüft werden.

4.3.2.1 Die Aktivierung der ORF29a- und ORF65-Promotorbereiche durch ORF50/Rta ist partiell CBF1-abhängig

Die Aktivierung der Promotoren ORF4-hp, ORF9-hp, ORF29a-hp, ORF62-hp, ORF65-hp und K5-hp durch den viralen Transkriptionsfaktor ORF50/Rta wurde mittels Luziferase-Reportergenstudien in den KSHV-negativen DG75-wt-Zellen untersucht. Ob eine Aktivierung dieser Promotoren durch ORF50/Rta auch in Abwesenheit von CBF1 stattfinden kann, wurde parallel in den KSHV-negativen CBF1-ko-DG75-Zellen überprüft. Das ORF59-Promotor-Reportergenkonstrukt, für welches sowohl die Aktivierung durch ORF50/Rta als auch eine CBF1-abhängige Regulation beschrieben ist, wurde als Kontrolle mitgeführt.

Die DG75-wt- oder CBF1-ko-Zellen wurden transient mit 3 µg des entsprechendem Luziferase-Reportergenkonstruktes und zunehmenden Konzentrationen (50 ng, 100 ng, 500 ng und 1 µg) eines ORF50/Rta-Expressionsvektors oder dem äquivalenten Kontrollvektor transfiziert. Um die Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den verschiedenen Ansätzen auszugleichen, wurde zu jedem Transfektionsansatz ein lacZ (β-Galaktosidase)-Expressionsplasmid kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurde die Luziferase-Aktivität gemessen und gegen die β-Galaktosidase-Aktivität normalisiert. Die x-fache Aktivierung der

Luziferase-Reportergenkonstrukte wurde durch den Quotienten der relativen Luziferaseeinheiten der Proben, transfiziert mit ORF50/Rta-Expressionsplasmid, zu den entsprechenden Proben, transfiziert mit dem Kontrollvektor, berechnet. Mit Hilfe des Student'schen t-Tests wurde die Signifikanz der Varianz der Rta-abhängigen Regulation der verschiedenen Promotoren zwischen den DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen statistisch überprüft.

Schon mit einer ORF50/Rta-Konzentration von 500 ng war eine maximale Aktivierung des Kontrollpromotors ORF59-p, um das 700-fache im Vergleich zu dem Kontrollvektoransatz, erreicht. In den CBF1-negativen DG75-Zellen war die Aktivierung erwartungsgemäß eingeschränkt und lag unter 50% des wt-Niveaus. Die Aktivierung des ORF4-hp-Konstruktes wurde mit zunehmenden Konzentrationen an ORF50/Rta sowohl in den DG75-wt- als auch in CBF1-ko-Zellen gesteigert. Da die Induktion durch ORF50/Rta zwischen den verschiedenen unabhängigen Experimenten große Schwankungen aufwies, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den wt- und CBF1-negativen Zellen berechnet werden. Das Promotorkonstrukt des ORF9-Gens wurde nach der Überexpression von ORF50/Rta in den wt- und CBF1-ko-Zellen aktiviert, zeigte aber bei einer ORF50/Rta-Konzentration von 50 ng oder 100 ng eine signifikante Zunahme der relativen Luziferaseeinheiten in Abwesenheit von CBF1. Für den Promotor ORF62-hp konnte mit einer ORF50/Rta-Konzentration von 1 µg auch in den CBF1-negativen Zellen eine 5- bis 7-fache Zunahme der Luziferaseaktivität detektiert werden. Der K5-Promotor, für welchen eine Aktivierung durch Notch über CBF1 bereits beschrieben ist, konnte mit der höchsten ORF50/Rta-Konzentration sowohl in den wt- als auch in den CBF1-ko-Zellen induziert werden. So führte die Überexpression von ORF50/Rta sowohl in den wt- als auch in den CBF1-ko-Zellen zur Induktion der Promotoren ORF4, ORF9, ORF62 und K5. Diese ORF50/Rta-Aktivierung war jedoch nicht CBF1-abhängig.

Die Aktivierung des ORF29a und des ORF65 Reportergenkonstruktes hingegen war in den CBF1-positiven DG75-Zellen deutlich höher als in den CBF1-negativen Zellen. Für das ORF29a-Promotorkonstrukt konnte mit der höchsten Konzentration an ORF50/Rta in den wt-Zellen eine 7 (\pm 0,9)-fach und in den CBF1-ko-Zellen jedoch nur eine 2 (\pm 1,6)-fach induzierte Luziferaseaktivität beobachtet werden. Die maximale ORF65-Promotoraktivierung war bereits bei 500 ng ORF50/Rta, mit einer 472 (\pm 195)-fachen Zunahme der relativen Luziferaseeinheiten erreicht. In Abwesenheit von CBF1 hingegen konnte nur eine geringe Aktivierbarkeit um das 16 (\pm 9,0)-fache im Vergleich zu dem Kontrollvektoransatz detektiert werden. Sowohl für den ORF29a- als auch für den ORF65-Promotor konnte ein signifikanter

Unterschied in der Induzierbarkeit durch ORF50/Rta zwischen den wt- und CBF1-negativen DG75-Zellen berechnet werden (Abb. 21).

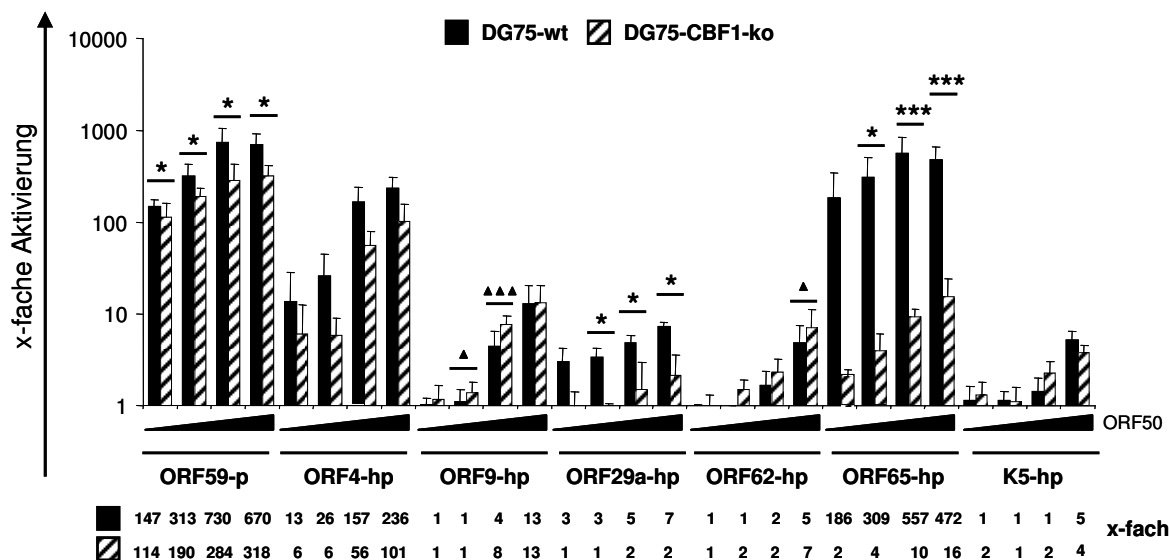


Abb. 21: Für die Promotorregionen der KSHV-Gene ORF29a und ORF65 konnte eine signifikante CBF1-abhängige Aktivierung durch ORF50/Rta gezeigt werden. Je 5×10^6 DG75-wt- oder CBF1-ko-Zellen (SM224.9) wurden mit $3 \mu\text{g}$ des entsprechenden Promotor-Luziferase-Reportergenkonstruktes (ORF59-p, ORF4-hp, ORF9-hp, ORF29a-hp, ORF62-hp, ORF65-hp und K5-hp) und zunehmenden Konzentrationen (50 ng, 100 ng, 500 ng und $1 \mu\text{g}$) eines ORF50/Rta-Expressionsvektors (BS268) oder dem entsprechenden Kontrollvektor (pHACR3) mittels Elektroporation transient transfiziert. Um die Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den verschiedenen Ansätzen auszugleichen, wurde zu jedem Ansatz ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, die Luziferase-Aktivität gemessen und auf die β -Galaktosidase-Aktivität normalisiert. Die x-fache Aktivierung der Luziferase-Reportergenkonstrukte (y-Achse) wurde mittels des Quotienten aus den Proben, transfiziert mit ORF50/Rta-Expressionsplasmid, zu den entsprechenden Proben, transfiziert mit dem Kontrollvektor, ermittelt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichungen von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Um die Varianz der ORF50/Rta-abhängigen Regulation der verschiedenen Promotoren zwischen den DG75-wt- und CBF1-ko-Zellen statistisch zu belegen, wurde die Signifikanz (*bzw. Δ : $p = 0,05-0,01$, * $p < 0,01$, ** $p < 0,005$, ***) der jeweiligen Ereignisse mit dem Student'schen t-Test (zweiseitig, gepaart) ermittelt. Dabei wurde zwischen einer reduzierten Promotor-Aktivierung (*) und einer erhöhten Promotor-Aktivierung (Δ) in den DG75-CBF1-ko-Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen unterschieden.

Als nächstes wurde überprüft, ob die beeinträchtigte ORF50/Rta-Aktivierung der getesteten Promotoren in den CBF1-negativen Zellen durch die ektopische Expression von CBF1 wieder aufgehoben wird.

Die DG75-CBF1-ko-Zellen wurden mit den verschiedenen Promotoren und dem ORF50/Rta-Expressionsplasmid oder dem entsprechenden Kontrollvektor transient transfiziert. Die Konzentration des ORF50/Rta-Vektors wurde so gewählt, dass die Reporter-gene jeweils suboptimal aktiviert wurden. So wurde das ORF59- und ORF65-Promotor-konstrukt mit 100 ng und die restlichen Reporter-genkonstrukte mit 500 ng ORF50/Rta

aktiviert. In einem parallelen Ansatz wurden 5 µg eines CBF1-Expressionskonstruktes kotransfiziert. Die Transfektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Für das ORF59-Promotorkonstrukt konnte nach Überexpression von CBF1 eine Verdreifachung der ORF50/Rta-Aktivierung nachgewiesen werden. Die Induzierbarkeit des ORF4- oder des ORF9-Reportergergenkonstruktes durch ORF50/Rta verzeichnete zwischen den Ansätzen mit oder ohne CBF1 keine signifikanten Unterschiede. Die exogene Expression von CBF1 bewirkte in den Ansätzen mit den Promotorkonstrukten ORF62-hp und K5-hp eine Abnahme der ORF50/Rta-gesteuerten Luziferaseaktivierung. Für das K5-Promotorkonstrukt konnte auch ohne ORF50/Rta-Überexpression durch die Zugabe von CBF1 eine 3-fache Erhöhung der relativen Luziferaseeinheiten detektiert werden. Diese Beobachtungen waren jedoch nicht signifikant.

Die Aktivierung der Promotoren des ORF29a- oder ORF65-Gens durch ORF50/Rta hingegen wurde nach Rekonstitution von CBF1 in den CBF1-negativen DG75-Zellen deutlich verstärkt. Für beide Promotoren konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Rta-abhängigen Regulation in Abwesenheit oder nach Überexpression von CBF1 detektiert werden. So wurde das ORF29a-Promotorkonstrukt 17,4 (± 2,5)-fach (p= 0,01), und das ORF65-Konstrukt 61 (± 3,1)-fach (p= 0,002) stärker in Anwesenheit von CBF1 und ORF50/Rta aktiviert (Abb. 22).

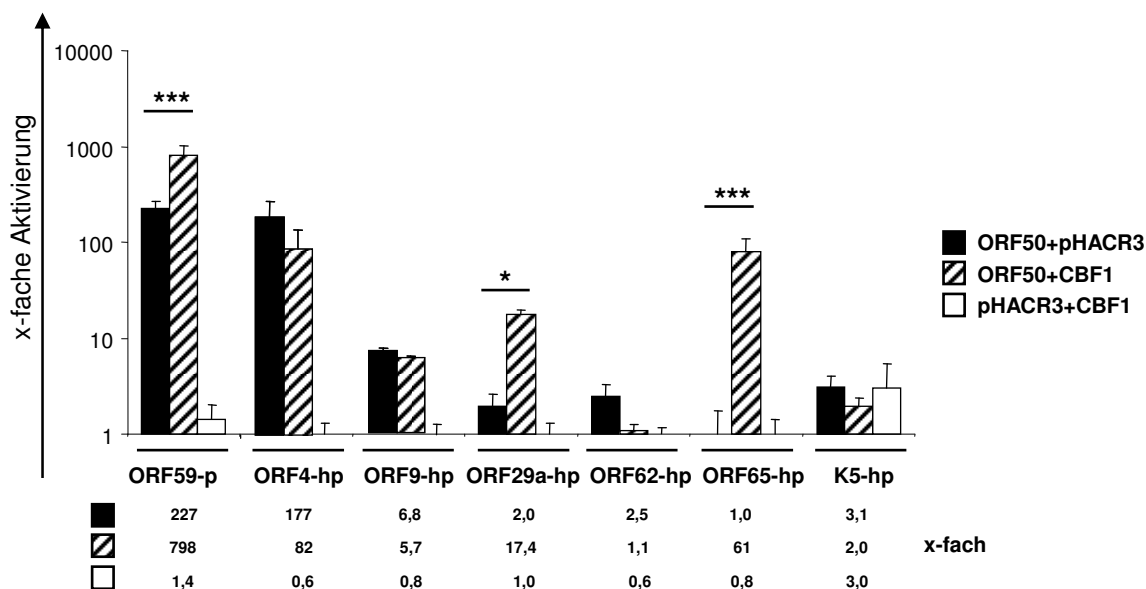


Abb. 22: Die reduzierte Aktivierung der ORF29a- und ORF65-Promotorkonstrukte in den DG75-CBF1-ko-Zellen kann durch die Expression von CBF1 rekonstituiert werden. Je 5 x 10⁶ DG75-CBF1-ko-Zellen (SM224.9) wurden mit 3 µg der Promotor-Luziferase-Reportergergenkonstrukte ORF4-hp, ORF9-hp, ORF29a-hp, ORF62-hp und K5-hp, sowie 500 ng eines ORF50/Rta-Expressionsvektors (BS268) oder dem entsprechenden Kontrollvektor (pHACR3) mittels Elektroporation transient transfiziert. In den Ansätzen mit ORF59-p und ORF65-hp wurden nur 100 ng des ORF50/Rta-Expressionsvektors eingesetzt. Parallel wurden 5 µg eines CBF1-Expressionsplasmids (AJ224.9) oder des Kontrollvektors (pHACR3) kotransfiziert. Um die Unterschiede in der

Transfektionseffizienz zwischen den verschiedenen Ansätzen auszugleichen, wurde zu jedem Ansatz ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, die Luziferase-Aktivität gemessen und auf die β -Galaktosidase-Aktivität normalisiert. Die x-fache Aktivierung der Luziferase-Reportergenkonstrukte (y-Achse) wurde mittels des Quotienten aus den Proben, transfiziert mit ORF50-Expressionsplasmid, zu den entsprechenden Proben, transfiziert mit dem Kontrollvektor, ermittelt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichungen von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Um die Varianz der Rta-abhängigen Regulation der verschiedenen Promotoren in Abwesenheit oder nach Überexpression von CBF1 in den DG75-CBF1-ko-Zellen statistisch zu belegen, wurde die Signifikanz ($p = 0,05$ - $0,01$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,005$ ***) der jeweiligen Ereignisse mit dem Student'schen t-Test (zweiseitig, gepaart) ermittelt.

Für alle der 6 getesteten Promotorkonstrukte konnte in den durchgeführten Luziferase-Reporterstudien sowohl in den DG75-wt- als auch in den CBF1-ko-Zellen eine Aktivierung durch ORF50/Rta nachgewiesen werden. Die Induzierbarkeit der Promotoren variierte jedoch sehr stark. Für zwei dieser Promotoren aber, ORF29a-hp und ORF65-hp, konnte in den CBF1-negativen DG75-Zellen eine verminderte Aktivierbarkeit durch ORF50/Rta beobachtet werden. Die exogene Überexpression von CBF1 in diesen Zellen in Gegenwart von ORF50/Rta bewirkte eine signifikante Induktion dieser Promotorkonstrukte. Da der Aktivierungsmechanismus der KSHV-Gene ORF29a und ORF65 im Verlauf des lytischen Reaktivierungsprozesses noch nicht beschrieben war, war es von großem Interesse, eine mögliche Bindung von CBF1 an die potentiellen Bindestellen in ihren Promotoren zu untersuchen.

4.3.3 Nachweis der direkten CBF1-Bindung in den Promotorbereichen der KSHV-Gene ORF29a und ORF65

Die Promotorbereiche der KSHV-Gene ORF29a und ORF65, welche ein Fragment von 1 kb stromaufwärts vom 5'-Ende des Translationsstartpunktes umfassten, zeigten in den vorangegangenen Luziferase-Reporterexperimenten eine verstärkte Aktivierung durch ORF50/Rta in Anwesenheit von CBF1.

Um den Beitrag von CBF1 an der Regulation dieser Gene im Detail zu bestimmen, sollten die mittels *MatInspector* vorhergesagten CBF1-Bindungsstellen in den Promotorbereichen von ORF29a und ORF65 auf eine mögliche CBF1-Bindung überprüft werden. Für den ORF29a-Promotor wurden drei (ORF29a-hp-1, -2 und -3) und für den ORF65-Promotor fünf potentielle CBF1-Bindungsstellen (ORF65-hp-1, -2, -3, -4 und -5) ermittelt (Abb. 23). Fragmente einer Größe von 25 bp, welche die potentiellen CBF1-Bindungsstellen in den hypothetischen Promotorbereichen umfassten, wurden in Gel-Retardationsstudien (*electromobility shift assays*, EMSA) untersucht.

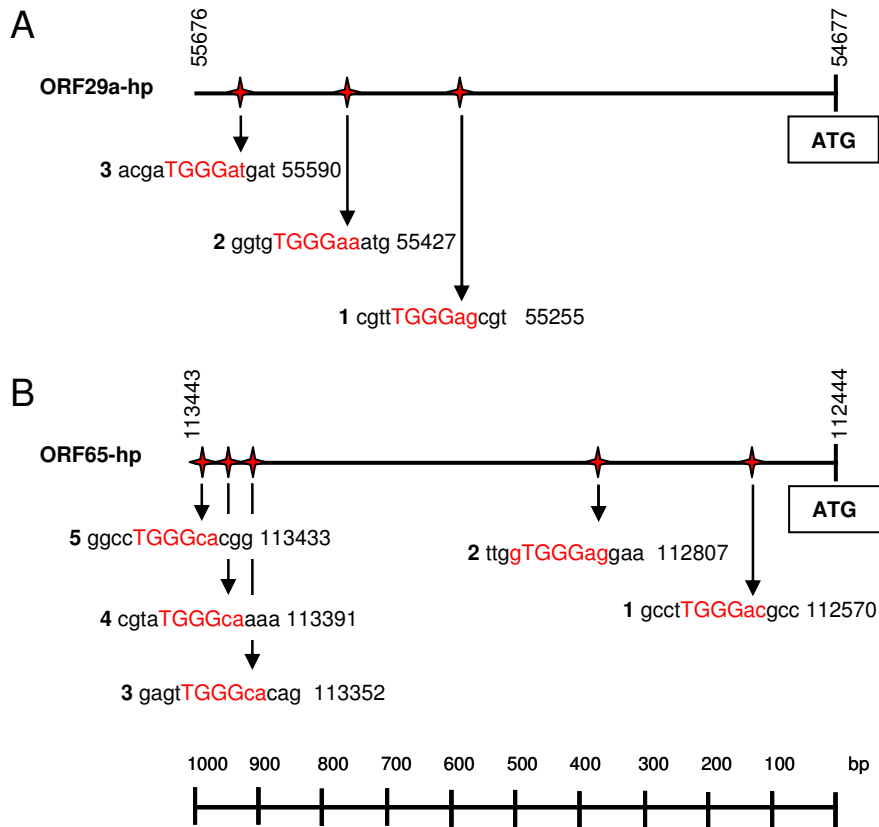


Abb. 23: Schematische Darstellung der vorhergesagten CBF1-Bindungsstellen im Promotorbereich der KSHV-Gene ORF29a und ORF65. In den 1 kb großen hypothetischen Promotorbereichen, der in den Luziferasestudien identifizierten CBF1-abhängig regulierten KSHV-Gene ORF29a (A) und ORF65 (B), sollten die CBF1-Bindungsstellen im Detail charakterisiert werden. Dargestellt sind die mittels *MatInspector* der Firma Genomatix vorhergesagten potentiellen CBF1-Bindungsstellen (*Core similarity* = 1,0/ die *Matrix similarity* > 0,8) sowie ihre genaue Lokalisation im KSHV-Genom (BC-1, Typ M, NCBI Referenznummer U75698). Die Core-Sequenz besteht aus 4 konservierten Basen und ist in Großbuchstaben hervorgehoben. Die roten Buchstaben stehen für die Matrixpositionen mit einem Konservierungsgrad von größer 60 (0 = nicht konserviert; 100 = absolut konserviert). Doppelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von 25 bp aus dem Promotorbereich des ORF29- (3 Fragmente) und ORF65-Gens (5 Fragmente), welche für die potentiellen CBF1-Bindungsstellen kodierten, wurden mittels der T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP am 5'-Ende markiert und anschließend in Gel-Retardationsstudien eingesetzt, um eine mögliche CBF1-Bindung zu überprüfen.

Die einzelsträngigen DNA-Fragmente wurden zu doppelsträngigen Oligonukleotiden hybridisiert. Die radioaktive Markierung dieser Fragmente erfolgte durch die Übertragung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP mittels der T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) auf das 5'-OH-Ende der Oligonukleotide. Die Höhe der Radioaktivität der markierten Oligonukleotide wurde in der Maßeinheit *counts per minute* (cpm) bestimmt, welche als Anzahl der Zerfälle der Atome pro Minute definiert ist. Je 8000 cpm der radioaktiv-markierten Oligonukleotide (heiße Oligos) wurden anschließend mit rekombinantem CBF1-Protein in einer Konzentration von 10 pmol inkubiert. Zur Spezifizierung des DNA-Proteinkomplexes wurde das rekombinante Protein zuvor mit dem entsprechenden nicht-markierten Oligonukleotid (kaltes Oligo) im 100-fachen

Überschuss inkubiert. Zusätzlich wurde durch die Zugabe eines spezifischen Antikörpers gegen CBF1 der direkte Nachweis für den DNA-CBF1-Komplex erbracht. Als Kontrolle wurde ein Oligonukleotid mit der CBF1-Bindungsstelle des gut charakterisierten EBV-C-Promotors (Cp) in den Gel-Retardationsstudien mitgeführt. Die DNA-Proteinkomplexe wurden über ein 6%-iges natives Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Mit dem Cp-Oligonukleotid konnte eine starke Komplexbildung mit rekombinantem CBF1 detektiert werden, die sowohl kalt kompetiert als auch mittels des langsamer wandernden DNA-CBF1-Antikörperkomplexes nachgewiesen werden konnte (Spur 1-4). Von den fünf getesteten DNA-Sequenzen der potentiellen CBF1-Bindungsstellen im Promotorbereich des ORF65-Gens konnte nur mit dem ORF65-hp-2-Fragment (Spur 9-12) eine CBF1-Komplexierung beobachtet werden, die aber im Vergleich zu dem Cp-CBF1-Komplex deutlich schwächer ausgeprägt war. Für das ORF29a-Gen zeigte sich neben einer sehr schwachen (ORF29a-hp-1, Spur 25-28) auch eine starke (ORF29a-hp-2, Spur 29-32) CBF1-Bindung in dem Promotorbereich. Die ORF29a-hp-2-CBF1-Bindungsstelle lag 763 bp von dem Translationsstartpunkt entfernt. Im Vergleich dazu war die direkte CBF1-Bindung im ORF65-Promotor nur 363 bp vor dem Translationsstartpunkt lokalisiert (Abb. 24).

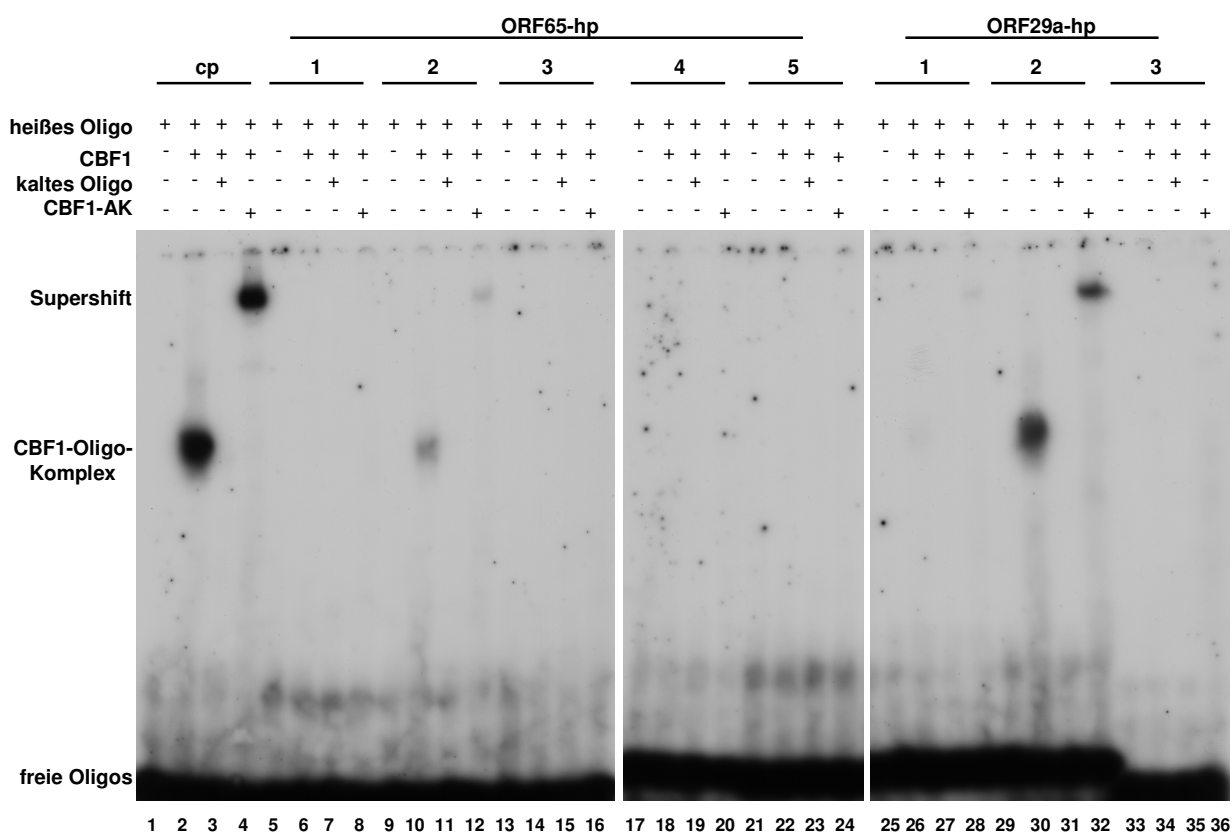


Abb. 24: Sowohl im Promotorbereich des ORF29a- als auch des ORF65-Gens konnte eine CBF1-Bindungsstelle nachgewiesen werden. In Gel-Retardationsstudien wurden die potentiellen CBF1-Bindungsstellen in den Promotorbereichen der KSHV-Gene ORF29a (3 Fragmente) und ORF65 (5 Fragmente) auf eine

direkte CBF1-Bindung untersucht. Dafür wurden dsDNA-Fragmente von einer Größe von 25 bp eingesetzt, welche die CBF1-Bindungsstellen umspannten (Lokalisation im KSHV-Genom (U75698): ORF29a-1 (55249-55273), -2 (55421-55445), -3 (55584-55608), ORF65-1 (112564-112588), -2 (112801-112825), -3 (113346-113370), -4 (113385-113410) und -5 (113428-113452)). Als Kontrolle wurde ein Fragment von 25 bp mit der CBF1-Bindungsstelle des gut charakterisierten C-Promotors (Cp) mitgeführt. Je 8000 cpm der [γ - 32 P] ATP-markierten dsDNA-Oligonukleotide (heiße Oligos) wurden mit 10 pmol rekombinatem CBF1 inkubiert. In einem parallelen Ansatz wurde die CBF1-DNA-Komplexformation mit dem entsprechenden unmarkierten Oligonukleotid (kaltes Oligo) in 100-fachem Überschuss kompetiert. Zusätzlich wurde mittels eines spezifischen Antikörpers gegen CBF1 der direkte Nachweis für den CBF1-DNA-Komplex (Supershift) erbracht. Nach Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe über ein natives 6%-iges Acrylamidgel wurden die getrockneten Gele für 48 Stunden mit Fuji-Xray-Filmen bei -80°C exponiert. Dargestellt ist eine repräsentative Abbildung dreier unabhängiger Experimente.

Die Stärke der CBF1-DNA-Komplexierung in den Promotorbereichen des ORF29a- und ORF65-Gens variierte deutlich. Um die Qualität der identifizierten CBF1-Bindungsstellen des ORF29a- und ORF65-Promotors mit der gut beschriebenen CBF1-Bindungsstelle im C-Promotor zu vergleichen, wurden die entsprechenden markierten Oligonukleotide mit einer zunehmenden Konzentration an rekombinatem CBF1 inkubiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach 24 und 96 Stunden Exposition des getrockneten Gels mit der PhosphoImager-Platte wurden die gespeicherten Lichtsignale, ausgehend von den radioaktiv-markierten Oligonukleotid-Proteinkomplexen, im PhosphoImager zu Bildsignalen umgewandelt und mit der AIDA-Software ausgewertet.

Mit Ausnahme des ORF29-hp-1-Fragmentes konnte für alle getesteten Oligonukleotide mit zunehmender Proteinkonzentration auch eine verstärkte DNA-CBF1-Komplexierung beobachtet werden (Cp: Spur 1-5, ORF29a-hp: Spur 5-15, ORF65-hp: Spur 16-20). Für die Bindung von CBF1 an das Cp-Oligonukleotid konnte eine 120-fach stärkere Signalintensität als für den ORF65-hp-2-CBF1-Komplex detektiert werden. Die detektierte Signalstärke des ORF29a-hp-2-CBF1-Komplexes hingegen war nur 2-fach schwächer als die Signale für die ideale CBF1-Bindungsstelle des C-Promotors. Auch für das Oligonukleotid ORF29a-hp-1 konnte erneut ein sehr schwacher CBF1-DNA-Komplex beobachtet werden. Aufgrund der zu schwachen Signalintensität konnte jedoch keine Quantifizierung mit dem PhosphoImager durchgeführt werden (Abb. 25A und B).

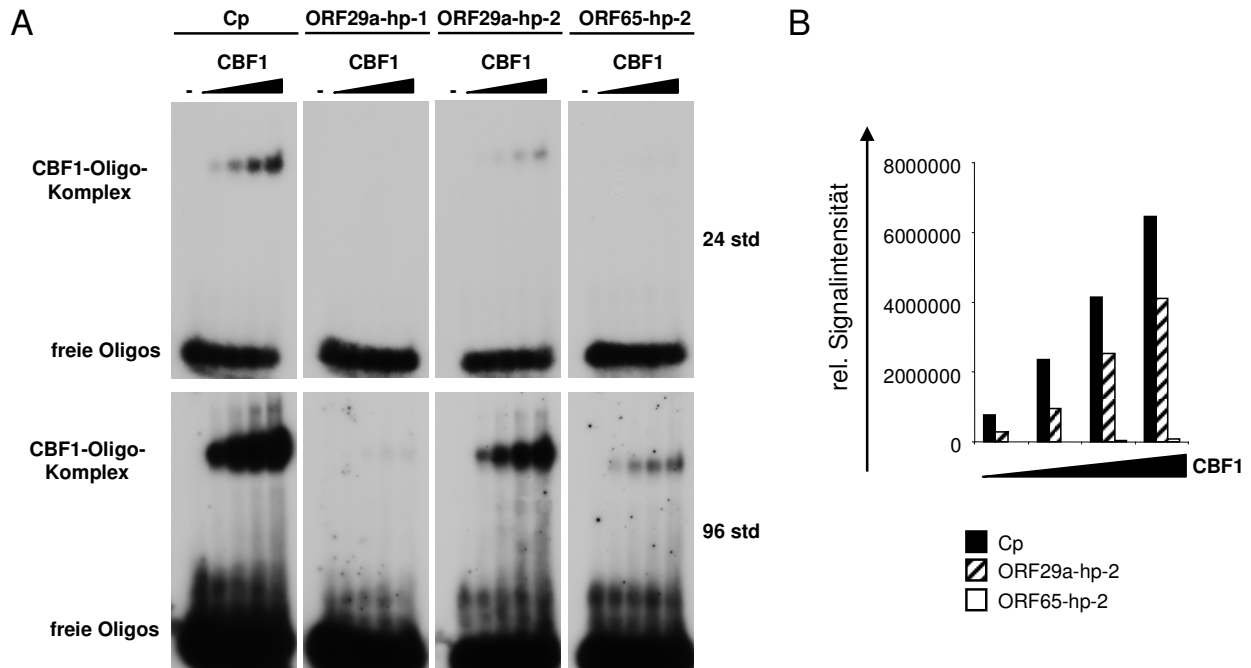


Abb. 25: Vergleich der CBF1-Bindungsstärke der identifizierten CBF1-Bindungsstellen im Promotorbereich des ORF29a- und ORF65-Gens. (A) Die [γ - 32 P] ATP-markierten dsDNA-Fragmente aus den Promotorbereichen der KSHV-Gene ORF29a (Fragment 1 und 2) und ORF65 (Fragment 2), welche eine CBF1-Bindung im vorherigen Experiment gezeigt hatten, wurden mit einer zunehmenden Konzentration an rekombinantem CBF1 (2,5, 5, 10 und 20 pmol) inkubiert und über ein natives 6%-iges Acrylamidgel aufgetrennt. Die getrockneten Gele wurden für 24 und 96 Stunden mit Fuji-Xray-Filmen oder einer PhosphoImager-Platte bei -80°C exponiert. (B) Die relative Signalintensität der CBF1-DNA-Komplexbildung wurde im PhosphoImager detektiert und anschließend mit der AIDA-Software ausgewertet. Für das Fragment ORF29-1 konnte aufgrund einer zu geringen Signalstärke keine Quantifizierung durchgeführt werden.

In den durchgeführten *in vitro* Analysen konnte für zwei weitere KSHV-Promotoren die direkte Rekrutierung des zellulären Transkriptionsfaktors CBF1 nachgewiesen werden. Von den mittels *MatInspector* vorhergesagten potentiellen CBF1-Bindungsstellen im ORF29a- oder ORF65-Promotorbereich konnte nur für jeweils eine Sequenz die Bindung von CBF1 bestätigt werden. Die Funktionalität dieser CBF1-Bindungsstellen konnte zuvor in den durchgeführten Luziferase-Reporterstudien gezeigt werden. So konnte die stark beeinträchtigte Induzierbarkeit dieser Promotoren in den CBF1-negativen DG75-Zellen durch die Überexpression von CBF1 aufgehoben werden. Für die vorhergesagten CBF1-Bindungsstellen, für welche in den Gel-Retardationsstudien keine CBF1-Komplexierung zu detektieren war, darf eine funktionelle Rolle im Aktivierungsprozess der Promotoren *in vivo* zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgeschlossen werden, da diese CBF1-Bindungsstellen Sequenzen mit geringerer Affinität zu CBF1 darstellen könnten, an welchen CBF1 erst im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor rekrutiert wird. Gel-Retardationsanalysen mit Zellkernextrakten aus reaktivierten KSHV-positiven Zellen oder rekombinaten ORF50/Rta und CBF1 oder

Luziferasestudien mit Reportergenkonstrukten, die Mutationen in den potentiellen CBF1-Bindungsstellen tragen, könnten darüber endgültig Aufschluss geben.

5 Diskussion

Zu Beginn meiner Arbeit war bekannt, dass sowohl CBF1-positive als auch -negative murine Fibroblasten-Zelllinien mit KSHV infiziert werden können. Für beide Zelllinien konnte die Expression des latenten Markerproteins ORF73/LANA nachgewiesen werden. Nach Induktion des lytischen Zyklus konnte jedoch nur von den CBF1-positiven Fibroblasten-Zellen infektiöse Viren produziert werden. In den CBF1-negativen Zellen war sowohl die Expression der frühen lytischen Gene K8/KbZIP und ORF59 als auch die virale Replikation und die Virusproduktion blockiert. Ob ORF50/Rta in den KSHV-infizierten Fibroblasten durch NaB induziert werden kann, wurde nicht untersucht (Liang and Ganem, 2003).

Alle weiteren Experimente zur Analyse der Aktivierung viraler Gene in Abhängigkeit von CBF1 basierten auf Promotor-Reporter- oder Gel-Retardationsstudien. Außerdem wurde die CBF1-abhängige Regulation viraler Gene bisher, mit Ausnahme der Gene K8/KbZIP und ORF59, nicht im Kontext des viralen Genoms untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine genomweite Analyse viraler Transkripte zur Charakterisierung der CBF1-abhängigen Genregulation in KSHV-infizierten humanen B-Zellen im Verlauf des lytischen Reaktivierungsprozesses durchgeführt. Dies schien notwendig, da (i) der natürliche Wirt des KSHV der Mensch ist, (ii) humane B-Zellen ein wichtiges Reservoir im latent KSHV-infizierten Wirt darstellen, (iii) das primäre Effusionslymphom und die multizentrische Castleman Erkrankung maligne KSHV-assoziierte Erkrankungen mit B-Zell-Charakter sind und (iv) für den lytischen Zyklus ein wesentlicher Beitrag an der Pathogenese dieser Krankheiten angenommen wird.

5.1 Nach Etablierung KSHV-infizierter CBF1-positiver und -negativer B-Zellen konnte nur in Anwesenheit von CBF1 die Produktion von infektiösen Viruspartikeln beobachtet werden

Im ersten Teil meiner Arbeit wurden zelluläre Systeme etabliert, die es ermöglichten, den Einfluss von CBF1 erstmalig in KSHV-infizierten humanen B-Zellen zu untersuchen und mit dem Phänotyp KSHV-infizierter muriner Fibroblasten zu vergleichen. Nach folgenden Kriterien wurde für die Infektion der B-Zellen ein geeignetes System ausgesucht:

- (i) Die KSHV-infizierte CBF1-negative B-Zelllinie sollte im direkten Vergleich zu einer parentalen infizierten CBF1-positiven B-Zelllinie untersucht werden können.

- (ii) Für die Infektion KSHV-positiver B-Zelllinien sollte ein rekombinantes KSHV-System eingesetzt werden, welches mit Hilfe von Selektionsmitteln die Etablierung von stabil KSHV-positiven Kulturen ermöglicht.
- (iii) Das KSHV-positive Zellsystem sollte mit aussagekräftigen Experimenten die Untersuchung des lytischen Reaktivierungsprozesses gewährleisten.

Für die EBV-negative Burkitt-Lymphom B-Zelllinie DG75-wt, die eine Myc-Translokation aufweist, war im Labor bereits eine parentale etablierte DG75-CBF1-ko-Linie SM224.9 vorhanden (Ben-Bassat et al., 1977, Gabay et al., 1999, Maier et al., 2005). In der CBF1-negativen DG75-Zelllinie wurden die CBF1-Gene durch homologe Rekombination inaktiviert. Weder in der Viabilität noch in der Proliferationsrate konnten Unterschiede zwischen den CBF1-positiven und -negativen DG75-Zellen ermittelt werden. Die wt- und CBF1-ko-DG75-Zellen stellten somit ein geeignetes Zellsystem für die Untersuchung des CBF1-Effektes nach der Infektion mit KSHV dar.

Eine weitere mögliche Option für die Untersuchung der Rolle von CBF1 in KSHV-infizierten Zellen wäre die Stilllegung (*knock down*) des CBF1-Gens durch die RNA-Interferenz (RNAi)-Technologie in PEL-Zellen gewesen. Da aber der Gen-*knock down* im Vergleich zum *knock out* keine 100%-ige Inaktivierung des Gens gewährleistet, wären schwache CBF1-bedingte-Effekte möglicherweise verloren gegangen. Zudem bestand bei der Anwendung von RNAi die Gefahr von unspezifischen Effekten auf die Regulation weiterer zellulärer Gene, die schwer zu kontrollieren gewesen wären (Cullen, 2006). Da mit dem CBF1-*knock out* jegliche Restaktivität von endogenen CBF1 ausgeschlossen werden konnte, stellten die DG75-CBF1-ko-Zellen das geeignetere System dar, die Regulation viraler Gene in Abhängigkeit von CBF1 zu analysieren.

Für die Infektion der DG75-Zellen wurde das rekombinante KSHV rKSHV.219, welches für eine GFP-RFP-Puromycin-Kassette kodiert, eingesetzt (Vieira and O'Hearn, 2004). Das Puromycinresistenzgen ermöglichte die Selektion einer GFP-positiven, KSHV-infizierten Zellpopulation. Mit Hilfe von FACS-Analysen oder der Fluoreszenzmikroskopie konnte der Anteil an latenten GFP-positiven oder der lytisch reaktivierten GFP-RFP-doppelt-positiven KSHV-infizierten B-Zellen quantifiziert werden.

Aus einer anfänglich niedrigen Frequenz GFP-positiver Zellen konnten B-Zellen etabliert werden, die das KSHV-Genom tragen

Bereits eine Woche nach der Infektion der CBF1-positiven und -negativen DG75-Zellen mit Virusüberständen der rKSHV.219-positiven Verozelllinie ließ sich in beiden Linien ein signifikanter Unterschied für die mittlere Fluoreszenzintensität der gesamten Zellpopulation im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen ermitteln.

Sowohl in der DG75-wt als auch in der CBF1-ko-Kultur konnte aber nicht zwischen einer schwachen GFP-Expression oder einer grün fluoreszierenden Ablagerung auf den Zellen unterschieden werden. Zu diesem Zeitpunkt war es daher noch nicht möglich zu beurteilen, ob die Detektion des Fluoreszenzsignals auf der GFP-Expression der KSHV-infizierten DG75-Zellen, auf dem passiv übertragenen GFP-Marker aus dem Überstand der VK219-Zellen in der Empfängerzelle oder auf der Anhaftung viraler Partikel auf der Zelloberfläche basierte. Möglicherweise handelte es sich dabei um den Nachweis von Virosomen. Diese Virus-ähnlichen-Partikel setzen sich aus viralen Strukturproteinen zusammen, enthalten virale Proteine aber keine virale DNA und können virale Proteine oder in diesem Fall das GFP-Protein in die Empfängerzellen transferieren. Diese Beobachtung wurde aber nicht weiter verfolgt.

In den darauffolgenden Wochen konnte anhand des ansteigenden Fluoreszenzsignals sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch in den FACS-Studien in den CBF1-positiven und -negativen DG75-Linien eindeutig GFP-exprimierende Zellen identifiziert werden. Mit Hilfe des rekombinanten KSHV rKSHV.219-Systems war es mittels der Puromycinselektion möglich, innerhalb von 6 Wochen aus einer niedrigen Frequenz GFP-positiver Zellen 100%ig GFP-positive DG75-wt und CBF1-ko-Zelllinien zu etablieren. Insgesamt konnten 14 KSHV-infizierte Linien der DG75-wt-Zellen und 13 der CBF1-negativen Variante in unabhängig durchgeführten Experimenten nach Infektion mit unabhängig präparierten VK219-Virusüberständen generiert werden.

Die Aufrechterhaltung der KSHV-Infektion war in den CBF1-positiven und -negativen DG75-Zellen aber nur unter Selektionsdruck gewährleistet. Nach dem Absetzen der Puromycinselektion war eine kontinuierliche Abnahme der GFP-positiven Population zu beobachten. Nach 10 Wochen Kultivierung ohne Puromycin waren nur noch 20-30% der Gesamtpopulation der K-DG75-Linien GFP-positiv. Die KSHV-Infektion bot somit für die DG75-Zelllinien keinen Selektionsvorteil.

Bei Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) war nach der Langzeitkultivierung der CBF1-positiven und -negativen B-Zellen für die K-DG75-wt-Linie tendenziell ein niedrigerer Wert zu detektieren. Zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit war die Analyse der MFI über mehrere Wochen für je eine Linie der CBF1-positiven und -negativen

Zellen durchgeführt worden. Um eine endgültige Aussage über die möglichen Unterschiede in der MFI zwischen diesen Linien machen zu können, bedarf es Studien mit weiteren K-DG75-Linien.

Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass die stärkere Fluoreszenzintensität auf eine erhöhte Anzahl an viralen Genomen in der CBF1-ko Linie zurückzuführen ist, da der Vergleich der relativen Menge an viraler DNA zwischen den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen keine signifikanten Unterschiede zeigte.

Da es sich bei CBF1 um einen Repressor zellulärer Gene handelt, könnte eine mögliche Erklärung für die erhöhte MFI in den CBF1-negativen Zellen eine verstärkte Induktion des EF-1 α -Promotors in Abwesenheit von CBF1 sein, über welchen die GFP-Expression kontrolliert wird. Diese These wurde aber nicht weiter verfolgt.

Im Vergleich zu der PEL-Zelllinie BCBL-1 war die relative Menge an viraler DNA in der K-DG75-wt- oder CBF1-ko-Linie 7-fach geringer. Da die K-DG75-Linien zu 100% GFP-positiv waren, ist anzunehmen, dass sich diese Linien von der PEL-Linie in der Anzahl an Virusgenomen pro Zelle unterscheiden.

Auch ohne CBF1 ist in den KSHV-positiven B-Zelllinien das Transkript des latenten Markergens ORF73/LANA nachzuweisen

In der Literatur ist die Rolle von CBF1 bei der Infektion und Etablierung der latenten Phase KSHV-positiver Zellen noch nicht eindeutig geklärt.

Vier Tage nach der KSHV-Infektion wurde sowohl in den CBF1-positiven als auch -negativen murinen Fibroblasten die Expression des latenten Markerproteins ORF73/LANA nachgewiesen (Liang and Ganem, 2003). In den Untersuchungen einer weiteren Arbeitsgruppe konnte eine verzögerte Etablierung der Latenz in den frühen Stunden des Infektionsprozesses in Abwesenheit von CBF1 beobachtet werden (Lan et al., 2005c). Bereits 4 Stunden nach der Infektion konnte mit Immunfluoreszenzstudien in den wt-Fibroblasten-Zellen die Expression von ORF73/LANA und ORF50/Rta nachgewiesen werden. Nach 48 Stunden war aber eine kontinuierliche Abnahme des ORF50/Rta- und eine Zunahme des ORF73/LANA-Expressionsniveaus zu detektieren. Im Gegensatz dazu ließ sich in den KSHV-infizierten CBF1-negativen murinen Fibroblasten eine erhöhte ORF50/Rta-Expression beobachten. Zudem konnte die Expression von ORF73/LANA erst 48 Stunden nach der Infektion nachgewiesen werden. Da in Promotor-Reporterstudien sowohl die aktive Repression des ORF50/Rta-Promotors durch ORF73/LANA als auch die Aktivierung des

ORF73/LANA-Promotors durch ORF50/Rta in Abhängigkeit von CBF1 gezeigt werden konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass das lytische Protein ORF50/Rta und das latente Protein ORF73/LANA über die CBF1-vermittelte Bindung an dem jeweiligen Promotor in einem Rückkopplungsmechanismus eine Balance zwischen lytischer und latenter Phase bewirken (Lan et al., 2004, Lan et al., 2005a, Lan et al., 2005b). Erst kürzlich wurde von derselben Arbeitsgruppe nach der Infektion von Zellen aus peripherem Blut mit einem rekombinanten KSHV, das eine Deletion in den CBF1-Bindungsstellen im ORF73/LANA-Promotor trug, neben einer reduzierten ORF73/LANA-Aktivierung auch eine induzierte Expression von ORF50/Rta sowie eine erhöhte Virusproduktion nachgewiesen (Lu et al., 2011). Basierend auf diesen Ergebnissen wird für CBF1 eine wesentliche Rolle in den frühen Stunden nach der Infektion und bei der Etablierung des latenten Zustandes vorgeschlagen.

Während der KSHV-Infektion der B-Zelllinien DG75-wt oder CBF1-ko konnte zwischen beiden Linien weder in der Anzahl an GFP-positiven Zellen noch bei den Werten für die MFI ein wesentlicher Unterschied im Verlauf der ersten 6 Wochen ermittelt werden. Die hier untersuchten Zeitpunkte lagen allerdings außerhalb der Zeitfenster, die von der Arbeitsgruppe von D. Ganem oder E. S. Robertson analysiert wurden. So kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beurteilt werden inwieweit die Infektion oder der Etablierungsprozess der Latenz in den CBF1-negativen B-Zellen eingeschränkt oder verzögert war.

Während der Langzeitkultivierung der wt- oder CBF1-ko-K-DG75-Zellen unter Puromycinselektion war aber sowohl die Menge an viraler DNA als auch der Anteil GFP-positiver Zellen konstant gleich. Auch das Expressionsniveau des latenten ORF73/LANA-Transkriptes zeigte keine Abweichungen zwischen den beiden Linien. Eine essentielle Rolle von CBF1 bei der Aufrechterhaltung des latenten Zustandes bei den KSHV-infizierten DG75-Linien unter Puromycinselektion konnte somit nicht beobachtet werden.

Die NaB-Induktion führt sowohl in den CBF1-positiven als auch -negativen K-DG75-Zellen zur Aktivierung des RFP-PAN-Reporters

Die lytische Reaktivierung der wt- oder CBF1-ko-K-DG75-Zellen wurde mit dem Histondeacetylaseinhibitor NaB induziert. Die Expression von ORF50/Rta, dem Hauptinitiator des lytischen Zyklus, wird über Histondeactelylasen (HDAC 1, 5 und 7) und über eine stabile Nukleosom-Positionierung im Promotorbereich des ORF50/Rta-Transkriptionsstartpunktes während der Latenz unterdrückt. Die NaB-Induktion führt zur Freisetzung des Nukleosoms und zur Aktivierung des ORF50/Rta-Promotors (Lu et al., 2003).

Die Autoregulation des ORF50/Rta-Promotors beruht auf der Kombination eines direkten und indirekten Aktivierungsmechanismus (Deng et al., 2000, Chen et al., 2009). Dabei ist eine Reihe von verschiedenen zellulären Transkriptionsfaktoren an der indirekten ORF50/Rta-abhängigen Aktivierung beteiligt (Pan et al., 2006, Wang et al., 2004a, Xie et al., 2008, Sakakibara et al., 2001, Wang et al., 2003b).

Die Regulation des *early* exprimierten *nut-1/PAN*-Transkriptes verläuft sowohl über eine direkte ORF50/Rta-Bindung als auch über die indirekte Rekrutierung durch CBF1 im Promotorbereich von PAN (Chang et al., 2002, Deng et al., 2002, Lukac et al., 2001, Song et al., 2001, Liang et al., 2002). Mit Hilfe einer ORF50/Rta-Mutante, deren DNA-Bindedomäne deletiert war, wurde die absolute Notwendigkeit der direkten ORF50/Rta-DNA-Bindung für die Aktivierung des *nut-1/PAN*-Promotors nachgewiesen (Chang et al., 2005d).

Die verschiedenen Aktivierungsmöglichkeiten des ORF50/Rta-Promotors und das Wissen über den Regulationsmechanismus des PAN-Promotors weisen darauf hin, dass auch in Abwesenheit von CBF1 sowohl die Expression von ORF50/Rta als auch die Aktivierung des RFP-PAN-Promotorsystems stattfinden kann.

Im nicht induzierten Zustand der Zellen konnten weder für die CBF1-positiven noch für die -negativen K-DG75-Linien spontan reaktivierte GFP-RFP-doppelt-positive Zellen nachgewiesen werden. Nach chemischer Induktion der K-DG75-Linien mit 3 mM NaB hingegen waren sowohl in der wt- als auch in der CBF1-ko-Linie durchschnittlich 2% der Zellen GFP-RFP-doppelt-positiv. Obwohl es sich dabei im Vergleich zu den PEL-Zelllinien, die nach chemischer Induktion 20-30% reaktivierte Zellen aufweisen, um einen sehr geringen Anteil an lytischen Zellen handelt, war für alle getesteten K-DG75-Linien ein eindeutiger Unterschied zwischen dem nicht-induzierten und reaktivierten Zustand zu beobachten (Schulz et al., 2002, Dourmishev et al., 2003, Antman and Chang, 2000, Chandran, 2010, Chandran and Hutt-Fletcher, 2007).

In den KSHV-infizierten CBF1-negativen murinen Fibroblasten wurden auch nach der ektopischen Überexpression des lytischen Transaktivators ORF50/Rta die *early* Gene K8/KbZIP und ORF59 nicht exprimiert (Liang and Ganem, 2003). In den CBF1-negativen K-DG75-Zellen hingegen konnte die Expression von RFP, die über den PAN-Promotor kontrolliert und über ORF50/Rta aktiviert wird, nachgewiesen werden. Ein CBF1-Einfluss auf die Regulation von ORF50/Rta und *nut-1/PAN* konnte somit nicht beobachtet werden.

Diese Studien beruhten aber nur auf der Bestimmung des prozentualen Anteils GFP-RFP-doppelt-positiver Zellen. Erst in darauffolgenden *real-time* PCR-Analysen war es möglich das Expressionsniveau von ORF50/Rta und *nut-1/PAN* unter Verwendung von

genspezifischen Kalibratorproben relativ zu quantifizieren und zwischen den beiden Linien zu vergleichen. Dabei stellte sich heraus, dass zwar nach lytischer Reaktivierung ORF50/Rta und nut-1/PAN in beiden Linien exprimiert wird, aber das Expressionsniveau in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen deutlich eingeschränkt war (siehe Abschnitt 5.2).

Nach Induktion des lytischen Zyklus produzieren nur die CBF1-positiven K-DG75-Zellen infektiöse Viruspartikel

In den KSHV-infizierten CBF1-negativen murinen Fibroblasten führte die ektopische Überexpression von ORF50/Rta im Vergleich zu den CBF1-positiven Zellen weder zur Replikation des Virusgenoms noch zur Freisetzung infektiöser Viruspartikel (Liang and Ganem, 2003).

Obwohl der Anteil an GFP-RFP-doppelt-positiven Zellen nach lytischer Reaktivierung in den wt- und CBF1-ko-K-DG75-Linien vergleichbar war, konnten nur mit den Zellkulturüberständen der CBF1-positiven K-DG75-Zellen HEK293-Zellen infiziert werden und unter Puromycinselektion stabil KSHV-positive HEK293-Zelllinien etabliert werden. Die Anwesenheit von CBF1 ist somit auch in den KSHV-infizierten B-Zellen für die Progression des lytischen Zyklus und die Virusproduktion absolut essentiell.

5.2 Die Induktion der viralen Genexpression ist in den KSHV-infizierten CBF1-negativen B-Zellen stark beeinträchtigt

Die etablierten CBF1-positiven und -negativen Zellsysteme ermöglichten nun erstmalig den Einfluss von CBF1 im Verlauf der lytischen Genexpressionskaskade im Kontext einer KSHV-infizierten Lymphomzelllinie zu untersuchen. Die Analyse der Expressionsprofile viraler Transkripte in den K-DG75-wt und CBF1-ko-Zellen während des lytischen Zyklus wurde in Kooperation mit Prof. Dirk Dittmer mit Hilfe eines *real-time* PCR KSHV-Arrays durchgeführt (Fakhari and Dittmer, 2002). Insgesamt wurde das Expressionsniveau von 81 verschiedenen KSHV-Genen überprüft.

Die K-DG75-wt und CBF1-ko-Zelllinien tragen das KSHV-Genom des rekombinanten rKSHV.219, welches der KSHV-Gensequenz des P-Typs entspricht. Da die Amplifikate für die offenen Leserahmen der KSHV-Gene im KSHV-Array auf der DNA-Sequenz des KSHV-Stammes des M-Typs basieren, konnten mögliche Abweichungen bei der

Transkriptanalyse nicht ausgeschlossen werden. Der Unterschied zwischen der Nukleotidsequenz des M- und P-Typs beläuft sich jedoch auf weniger als 3% (Schulz, 2006).

Für 21 ausgewählte KSHV-Gene wurden anschließend die Array-Daten in unabhängigen *real-time* PCR-Analysen mit Primerpaarkombinationen, die sich von den im Array benutzten Primern unterschieden, mit je zwei verschiedenen K-DG75-wt und CBF1-ko-Zelllinien überprüft. Dabei handelte es sich um folgende KSHV-Gene: ORF73, K10.5 (latent), ORF50, K5 (*immediate-early*), ORF6, ORF9, ORF29a, ORF37, ORF57, ORF59, ORF62, ORF74, K1, K2, nut-1/PAN, K8, K10 (*early*), ORF8, ORF65 (*late*) und ORF4, K14 (unbekannt). Für die KSHV-Gene ORF6, K8, ORF50, ORF57, ORF59, ORF8, K2, K5, ORF73, ORF74, K14 und nut-1/PAN war bereits eine CBF1-abhängige Regulation beschrieben. Die Expression dieser Gene sollte mit der Expression ausgewählter Gene, deren Regulationsmechanismus noch weitgehend unbekannt war, in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen verglichen werden.

Im nicht-induzierten Zustand der K-DG75-Linien zeigen sich keine CBF1-vermittelten Effekte auf die virale Transkription

Wie oben beschrieben, ist die Rolle von CBF1 im latenten nicht-induzierten Zustand noch nicht vollständig geklärt. Da die Generierung KSHV-positiver B-Zellen auch in Abwesenheit von CBF1 möglich war und das Transkriptniveau des latenten Markergens ORF73/LANA keine Abweichungen zwischen den wt- und CBF1-ko-Zellen aufwies, ist eine Notwendigkeit von CBF1 für die Etablierung des latenten Zustandes nicht anzunehmen. Dennoch kann der Einfluss von CBF1 auf den Regulationsmechanismus der viralen Genexpression nicht generell ausgeschlossen werden, da CBF1 in Abwesenheit des entsprechenden Transaktivators durch die Rekrutierung eines Korepressor-Komplexes als transkriptioneller Repressor wirkt. Es wird angenommen, dass diese CBF1-assoziierten Korepressoren Histondeacetylasen (HDACs) rekrutieren, wodurch die Stilllegung der entsprechenden Genorte ermöglicht wird (Kovall and Hendrickson, 2004, Dou et al., 1994, Bray, 2006a, Bray, 2006b, Pursglove and Mackay, 2005).

Für eine Reihe von KSHV-Genen ist die Aktivierung durch ORF50/Rta in Abhängigkeit von CBF1 bereits beschrieben. Das Fehlen von CBF1 könnte möglicherweise im nicht-induzierten Zustand der Zellen zu einer Akkumulation CBF1-abhängig regulierter Transkripte führen und damit den Anteil an spontan lytischen Zellen erhöhen.

Obwohl in den durchgeführten FACS-Studien keine Unterschiede zwischen den wt- und CBF1-ko-K-DG75-Zelllinien an spontan lytischen GFP-RFP-doppelt-positiven Zellen beobachtet werden konnten, war es von großem Interesse die viralen Gene in den nicht-induzierten CBF1-negativen Zellen auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen und mit den wt-Zellen zu vergleichen.

Im nicht-induzierten Zustand zeigten die Δ Ct-KSHV-Array-Daten der getesteten Gene zwischen den wt- und CBF1-ko-K-DG75-Zellen nur eine geringe Übereinstimmung. Die niedrige Korrelation zwischen den Δ Ct-Werten der CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Linie war auf eine Gruppe von 7 Genen, die einen mindestens 20-fachen Unterschied zwischen beiden Linien aufwiesen, zurückzuführen. In den darauffolgenden unabhängig durchgeführten *real-time* PCR-Analysen konnte für die Expressionsprofile viraler Transkripte im nicht-induzierten Zustand der KSHV-infizierten B-Zellen kein reproduzierbares Muster ermittelt werden. So war es nicht möglich eine bestimmte Klasse von Genen zu identifizieren, die sich in den CBF1-negativen Zellen durch einen konstanten Unterschied im Transkriptniveau im Vergleich zu den K-DG75-wt -Zellen auszeichneten.

Um eine Aussage über den Einfluss von CBF1 in den nicht-induzierten K-DG75-Zellen treffen zu können bedarf es weiterer Experimente. Erst die wiederholte Durchführung dieser Experimente mit einer angemessenen Anzahl an technischen Replikaten würde es erlauben, die bisher beobachteten Schwankungen zwischen den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen beurteilen zu können und damit Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle von CBF1 im nicht-induzierten Zustand zu ziehen.

Im Verlauf der lytischen Reaktivierung ist in den CBF1-negativen B-Zellen die Expression von über 50% der KSHV-Gene mindestens 2-fach reduziert

Nach chemischer Reaktivierung mit NaB kommt es zur Induktion der viralen Genexpressionskaskade. Entsprechend ihres zeitlichen Expressionsmusters werden KSHV-Gene in vier Klassen eingeteilt: latente, *immediate-early*, *early* und *late* Gene. Mit Hilfe einer Zeitkinetik von 2, 4, 8, 16 und 32 Stunden nach der NaB-Induktion wurden die frühen und späten Ereignisse im Verlauf des lytischen Zyklus der CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen untersucht. Diese Zeitspanne ermöglichte es die Rolle von CBF1 in der Regulation der verschiedenen Klassen der viralen Gene zu charakterisieren.

Die Analyse viraler Genexpressionsmuster in der PEL-Zelllinie BCBL-1 nach TPA-Induktion, durchgeführt von Paulose-Murphy et al., zeigte für die meisten KSHV-Gene

zwischen 10 und 24 Stunden nach der lytischen Reaktivierung eine Verdoppelung der Transkriptmenge im Vergleich zu den nicht-induzierten Zellen. Die Ausnahmen bildeten unter anderem die latenten Gene ORF71, ORF72 und ORF73, die erst ab 36 Stunden eine erhöhte aber keine 2-fach erhöhte Expression aufwiesen. In diesem Experiment konnte sowohl für die meisten lytischen Gene als auch für die latenten Gene die höchste Expression zwischen 36 und 48 Stunden nach der TPA-Induktion beobachtet werden. Unter diesen Genen befanden sich auch Replikations-unabhängig exprimierte Gene, für die bei der Modulation des zellulären Milieus im Verlauf des lytischen Zyklus zusätzliche Funktionen vorgeschlagen wurden (Paulose-Murphy et al., 2001).

Die KSHV-Array-Daten zeigten sowohl für die KSHV-infizierten wt- als auch für die CBF1-negativen DG75-Zellen während der lytischen Reaktivierung eine Zunahme der Expression der meisten viralen Gene. Zwischen 16 und 32 Stunden nach der NaB-Induktion konnte für beide Zelllinien die höchste Akkumulation viraler Transkripte beobachtet werden. Dabei handelte es sich sowohl um Replikations-unabhängig als auch -abhängig regulierte Gene. Die Arbeitsgruppe von J. U. Jung beschreibt im Verlauf des lytischen Zyklus die Abnahme reprimierender und die Akkumulation aktivierender Histonmodifikationen auf dem viralen Genom. Je nach Gen-Klasse (IE, E und L) wurde ein unterschiedliches Zeitfenster für diese Ereignisse ermittelt. So konnte erst nach der viralen DNA-Replikation die Dissoziation reprimierender Histonmodifikationen in Bereichen des viralen Genoms, in welchem die *late* Gene lokalisiert sind, beobachtet werden (Toth et al., 2010). Möglicherweise könnte das Fehlen von reprimierenden Modifikationen auf der replizierten DNA eine Erklärung für die erhöhte Transkription der viralen Gene 32 Stunden nach der lytischen Reaktivierung sein.

Bei Betrachtung der KSHV-Array-Daten der K-DG75-wt-Linie im Detail zeigte sich für die latenten Gene ORF71, ORF72, ORF73 und K10.5 in den ersten vier Stunden nach der NaB-Induktion im Vergleich zu den CBF1-negativen Zellen eine erhöhte Expression. Im weiteren Verlauf der Zeitkinetik ließ sich aber im Vergleich zu den K-DG75-CBF1-ko-Zellen ein geringeres Transkriptniveau ermitteln. Für die restlichen KSHV-Gene konnte in der wt-Linie 32 Stunden nach der NaB-Induktion eine mindestens 2-fache Zunahme des Transkriptniveaus beobachtet werden.

In den K-DG75-CBF1-ko-Zellen hingegen war das Expressionsniveau von über der Hälfte der 81 untersuchten Gene 32 Stunden nach der NaB-Induktion mindestens 2-fach niedriger im Vergleich zu den wt-Zellen. Der Einfluss von CBF1 auf die Expression der viralen Gene im Verlauf des lytischen Zyklus konnte aber auf keine bestimmte Klasse von Genen eingeschränkt werden. So wurde in den KSHV-infizierten CBF1-negativen B-Zellen

für latente, *immediate-early*, *early* und *late* Gene eine stark verminderte Expression nachgewiesen.

In den darauffolgenden unabhängigen *real-time* PCR-Analysen mit 21 ausgewählten Genen konnten die KSHV-Array-Daten nicht für jedes Gen zu jedem Zeitpunkt bestätigt werden. So zeichnete sich im Array eine Gruppe von Genen ab, die in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen im Verlauf der NaB-Kinetik im Vergleich zu den wt-Zellen reprimiert oder erhöht exprimiert wurden. Diese Beobachtungen konnten aber in keiner der folgenden unabhängig durchgeführten *real-time* PCR-Analysen reproduziert werden. Es ist also anzunehmen, dass es sich dabei um technische Probleme bei der Durchführung des KSHV-Arrays handelte.

Trotz der Abweichungen in den Expressionswerten einiger Gene zwischen dem KSHV-Array und den *real-time*-PCR-Daten zeichnete sich deutlich ab, dass in Abwesenheit von CBF1 die Expression einer Reihe von KSHV-Genen, die einen essentiellen Beitrag an der Regulation der lytischen Phase leisten, stark beeinträchtigt war. 32 Stunden nach der NaB-Induktion war der Einfluss von CBF1 auf die Expression von 20 der 21 getesteten viralen Transkripte unverkennbar. Mit Ausnahme des Gens K1 wurde für alle Gene ein mindestens 2-fach reduziertes Expressionsniveau im Vergleich zu den wt-Zellen nachgewiesen.

Die verminderte Expression der viralen Transkripte im Verlauf des lytischen Zyklus in den CBF1-negativen-Zellen konnte auch in einer angereicherten RFP-GFP-doppelt-positiven Zellpopulation für die Transkripte der KSHV-Gene ORF50/Rta, ORF57/Mta und ORF59 reproduziert werden. Eine ungleiche Verteilung an latenten und lytisch induzierten Zellen zwischen der K-DG75-CBF1-ko-Linie und wt-Linie konnte somit nicht beobachtet werden.

Die Expression von ORF50/Rta ist für die Reaktivierung und virale Replikation latent KSHV-infizierter B-Zellen absolut essentiell (Lukac et al., 1999). Im Vergleich zu der chemischen Induktion wird durch die ektopische Expression von ORF50/Rta die virale Genexpressionskaskade stärker stimuliert (Nakamura et al., 2003). Um ausschließen zu können, dass der CBF1-abhängige Effekt auf eine unzureichende Expression von ORF50/Rta zurückzuführen ist, wurde das Transkriptniveau der KSHV-Gene ORF50/Rta, ORF57/Mta und ORF59 nach transienter Überexpression von ORF50/Rta überprüft. Dabei konnte mit zunehmender Konzentration an transfizierter ORF50/Rta-Plasmid-DNA auch der Anstieg der getesteten viralen Transkripte beobachtet werden. Die Transkripte der Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden, waren im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen 24 Stunden nach der NaB-Induktion höher exprimiert. Möglicherweise waren die Zellen nach dem Elektroporationsprozess empfänglicher für die NaB-Induktion. Die transiente Über-

expression von ORF50/Rta führte sowohl in den wt- als auch in den CBF1-ko-K-DG75-Zellen im Vergleich zu den nur chemisch aktivierten Zellen zu einem höheren Transkriptniveau der getesteten Gene. Dennoch blieb die Expression dieser Gene in den CBF1-negativen Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen stark vermindert. Dieses Experiment macht deutlich, dass auch eine erhöhte Induktion durch die Überexpression von ORF50/Rta in Kombination mit NaB in den CBF1-negativen B-Zellen den Phänotyp KSHV-infizierter wt-DG75-Zellen nicht rekonstituieren kann.

Identifizierung potentiell CBF1-abhängig regulierter KSHV-Gene

In der Literatur wurde bereits für eine Reihe von KSHV-Genen eine direkte CBF1-abhängige ORF50/Rta Regulation mit Hilfe von Reporterstudien oder Gel-Retardationsanalysen beschrieben. Bei den meisten ORFs handelt es sich dabei um lytisch exprimierte Gene. Unter ihnen sind neben dem Transkriptionsaktivator ORF50/Rta auch Strukturproteine oder Proteine, die sowohl eine essentielle Rolle bei der viralen Replikation als auch bei der Modulation zellulärer Signalwege einnehmen, vertreten. Es ist aber auch für das latente Transkript LT_i, welches für die Gene ORF71, ORF72 und ORF73 kodiert, eine CBF1-abhängige Regulation bekannt. Bei Betrachtung der essentiellen Rolle dieser Gene im Verlauf des viralen Lebenszyklus wird klar, dass auch eine eingeschränkte Expression dieser Gene durch das Fehlen von CBF1 die verschiedenen Phasen des viralen Lebenszyklus beeinträchtigen könnte.

Bei 12, der in den *real-time* PCR-Analysen getesteten 21 Gene, handelte es sich um bereits bekannte CBF1-abhängig regulierte Gene. Für die Gene ORF50/Rta, ORF6, K8, ORF57, ORF59, ORF74, ORF8, K14, K2 und K5 konnte 32 Stunden nach der NaB-Induktion in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen ein mindestens 5-fach reduziertes Transkriptniveau im Vergleich zu den wt-Zellen beobachtet werden. Das Expressionsniveau der Transkripte von ORF73/LANA und nut-1/PAN hingegen lag in den CBF1-ko-Zellen nur 2-fach unter dem wt-Niveau. Da für diese Gene neben einer CBF1-abhängigen Regulation alternative Aktivierungsmöglichkeiten in der Literatur beschrieben sind, könnte in Abwesenheit von CBF1 die Regulation nur partiell eingeschränkt sein und die geringe Beeinträchtigung in den CBF1-negativen B-Zellen erklären (Chang et al., 2002, Deng et al., 2002, Lukac et al., 2001, Song et al., 2001, Chang et al., 2005a, Chang et al., 2005d, Liang and Ganem, 2003, Liang et al., 2002, Jeong et al., 2004, Verma et al., 2004).

Für die restlichen 9 untersuchten Gene war in der Literatur noch keine CBF1-abhängige Regulation beschrieben. Es handelte sich dabei um die Gene ORF4, ORF9, ORF29a, ORF37, ORF62, ORF65, K1, K10.5 und K10. Mit Ausnahme des Gens K1 war für diese Gene in den *real-time* PCR-Analysen ein mindestens 2,5-fach reduziertes Expressionsniveau in Abwesenheit von CBF1 nachzuweisen. Eine Aktivierung über ORF50/Rta für die Gene K1, ORF4, ORF9 und ORF37 war bereits in der Literatur beschrieben (Bowser et al., 2002, Bowser et al., 2006, Ellison et al., 2009). Die Regulation der Gene ORF29a, ORF62, ORF65, K10.5 und K10 im Verlauf des lytischen Lebenszyklus war hingegen noch unbekannt.

5.3 Für die Promotoren der KSHV-Gene ORF65 und ORF29a wurde eine direkte funktionelle CBF1-Bindung nachgewiesen

Mit Hilfe des KSHV-Arrays und den unabhängigen *real-time* PCR-Analysen konnten 9 potentiell CBF1-abhängig regulierte Gene identifiziert werden. Um nun direkte oder indirekte CBF1-Effekte auf die transkriptionelle Regulation dieser Gene zu untersuchen, wurden 5 Kandidaten ausgewählt für die in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen ein mindestens 2-fach reduziertes Expressionsniveau im Vergleich zu den wt-Zellen vorlag, in deren Promotorbereichen mindestens eine potentielle CBF1-Bindungsstelle zu finden sowie eine CBF1-abhängige ORF50/Rta Regulation in der Literatur noch nicht beschrieben war. Zur Identifizierung potentieller CBF1-Bindungsstellen wurde ein Bereich von 1 kb stromaufwärts vom 5'-Ende des Translationsstartpunktes „ATG“ dieser Gene als hypothetische Promotorregion festgelegt und mit Hilfe der *MatInspector* Software auf mögliche CBF1-DNA-Bindeelemente untersucht. Im Promotorbereich von ORF4 waren zwei, von ORF9 eine, von ORF29a und ORF62 drei und von ORF65 sogar fünf potentielle CBF1-Bindungsstellen lokalisiert.

Für das Gen K5 war eine Bindung von CBF1 im Promotorbereich und die Aktivierung über Notch-IC bereits beschrieben (Chang et al., 2005b). Da die Expression dieses Gens in den CBF1-negativen Zellen 10-fach unter dem Wert der wt-Zellen lag und die bioinformatische Promotoranalyse eine hohe Anreicherung von fünf CBF1-Bindungsstellen ergab, wurde auch dieser Promotor auf eine mögliche CBF1-abhängige ORF50/Rta-Regulation untersucht.

Die Aktivierung der ORF29a- und ORF65-Promotoren durch ORF50/Rta ist partiell CBF1-abhängig

Die Regulation der hypothetischen KSHV-Promotoren wurde in Luziferase-Reporter-Experimenten mit KSHV-negativen wt- oder CBF1-ko-DG75-Zellen untersucht. Als Kontrolle wurde das ORF59-Promotorkonstrukt mitgeführt. Für den ORF59-Promotor war sowohl die Aktivierung durch ORF50/Rta als auch eine CBF1-abhängige Regulation bereits in der Literatur beschrieben (Liu et al., 2008).

Alle 6 Promotorkonstrukte wurden durch ORF50/Rta aktiviert. Die Induzierbarkeit der Promotoren variierte jedoch stark. Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Aktivierbarkeit könnte das Fehlen weiterer viraler Faktoren in der KSHV-negativen DG75-Zelllinie sein, die in Kooperation mit ORF50/Rta die transkriptionelle Regulation der Promotoren im Verlauf des lytischen Zyklus steuern. Beispielsweise nimmt das KSHV-Gen K8/KbZIP eine wesentliche Rolle bei der Koregulation von ORF50/Rta-Zielgenen ein. Dabei ist für die direkte Interaktion von K8/KbZIP mit ORF50/Rta neben einer Inhibierung auch eine Verstärkung der ORF50/Rta-Aktivierung diverser viraler Promotoren beschrieben (Liao et al., 2003, Izumiya et al., 2003). Unter diesen Promotoren befanden sich unter anderem auch die Promotoren der Gene ORF4 und ORF9 (Ellison et al., 2009).

Eine weitere mögliche Erklärung für die Unterschiede in der ORF50/Rta-Aktivierungsstärke könnte sein, dass das untersuchte 1 kb-Promotorfragment nicht den kompletten Promotorbereich der KSHV-Gene repräsentiert und wesentliche DNA-Bindemotive, die die Rekrutierung weiterer zellulärer Transkriptionsfaktoren ermöglichen, außerhalb dieses Bereiches lokalisiert sind.

In den CBF1-negativen DG75-Zellen war die Aktivierung des ORF59-Promotors erwartungsgemäß eingeschränkt und lag unter 50% des Aktivierungspotentials im Vergleich zu den DG75-wt-Linien. Für die ORF50/Rta-Aktivierung der ORF4-, ORF9-, ORF62- und K5-Promotoren konnte keine CBF1-abhängige Regulation beobachtet werden. Die ORF29a- und ORF65-Reporter-Genkonstrukte hingegen wurden in den CBF1-positiven DG75-Zellen signifikant stärker als in den CBF1-negativen Zellen durch ORF50/Rta aktiviert. Zudem wurde nach Rekonstitution von CBF1 in den CBF1-negativen Zellen die Aktivierung des ORF29a und des ORF65-Promotors deutlich erhöht.

Da sowohl für das ORF29a- als auch für das ORF65-Promotorkonstrukt eine Aktivierung durch ORF50/Rta in den CBF1-negativen Zellen möglich war, ist anzunehmen, dass die Regulation dieser Gene nicht allein auf einer ORF50/Rta-CBF1-abhängigen Aktivierung basiert, sondern auch noch weitere direkte oder indirekte Regulationsmechanismen eine Rolle spielen. Dies könnte vor allem für den ORF29a-Promotor in Frage kommen, da zwischen den DG75-wt- und CBF1-ko-Linien nur ein 3,5-facher Unterschied in

der Aktivierbarkeit zu beobachten war. Im Gegensatz dazu handelte es sich bei dem ORF65-Promotor um eine 50-fache Reduktion der Aktivierbarkeit in den CBF1-negativen Zellen.

In Anbetracht der Funktion von CBF1 als transkriptioneller Repressor könnte die konstitutive Bindung von CBF1 in den Promotorbereichen der KSHV-Gene in Abwesenheit von ORF50/Rta eine direkte Repression der viralen Promotoren vermitteln. In Studien mit dem ORF50/Rta-Promotor konnte jedoch keine Repression des Reportergens durch CBF1 beobachtet werden (Liang and Ganem, 2003). Auch bei den hier untersuchten Promotoren zeichnete sich nach der Überexpression von CBF1 in den CBF1-negativen DG75-Zellen keine Repression ab. Eine aktive Repression dieser Promotoren durch die Rekrutierung von CBF1 kann daher weitgehend ausgeschlossen werden.

CBF1 bindet direkt im Promotorbereich der Gene ORF29a und ORF65

In Gel-Retardationsanalysen wurden die Promotorbereiche von ORF29a und ORF65 auf eine mögliche CBF1-Bindung überprüft. Im ORF29a-Promotor wurden 3 und im ORF65-Promotor 5 potentielle CBF1-Bindungsstellen auf eine direkte Assoziation mit CBF1 untersucht.

Die Gel-Retardationsstudien wurden mit rekombinantem CBF1-Protein durchgeführt, wodurch der Beitrag weiterer viraler oder zellulärer Proteine an der DNA-Bindung in den untersuchten Promotorbereichen ausgeschlossen werden konnte.

Im ORF29a-Promotor konnte von 3 möglichen CBF1-Bindungsstellen für 2-Bindungselemente die Interaktion mit CBF1 nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um eine sehr schwache sowie um eine sehr starke CBF1-DNA-Bindung. Die starke Bindung war nur 1,5-fach schwächer als die Bindung von CBF1 an das C-Promotorelement, welches als Positivkontrolle mitgeführt wurde. Im ORF65-Promotor konnte nur für eine CBF1-Bindungsstelle eine direkte CBF1-Interaktion detektiert werden, die aber im Vergleich zu der Cp-CBF1-Bindungsstelle eine 80-fach geringere Affinität zu CBF1 aufwies.

Bei dem Vergleich der Gel-Retardationsanalysen mit den Luziferase-Reportergenstudien zeichnete sich ein gegensätzliches Bild ab. Es war unerwartet, dass in den Gel-Retardationsanalysen für die eine CBF1-Bindungsstelle im ORF29a-Promotor eine stärkere Bindungsaffinität zu CBF1 nachgewiesen werden konnte als im ORF65-Promotor, obwohl in den Reportergenstudien die Aktivierung des ORF65-Promotorkonstruktes im Vergleich zu ORF29a stärker CBF1-abhängig war.

Die Promotorfragmente setzten sich aus insgesamt 25 bp zusammen, die sowohl für die CBF1-Konsensussequenz als auch für die flankierenden Bereiche kodierten. Da die CBF1-Konsensussequenz zwischen den getesteten Promotorfragmenten eine hohe Übereinstimmung aufwies, müssen die angrenzenden Promotor-spezifischen Bereiche in den Fragmenten für die beobachteten Unterschiede in der Bindungsaffinität und in der Aktivierbarkeit des ORF29a- und ORF65-Promotorkonstruktes verantwortlich sein.

Untersuchungen des KSHV-ORF57-Promotors zeigten, dass CBF1 nicht konstitutiv an den Promotor von ORF57 gebunden ist, sondern erst im Komplex mit ORF50/Rta an die DNA rekrutiert wird und die Aktivierung des Promotors bewirkt (Carroll et al., 2006). Da in den hier durchgeführten Experimenten rekombinantes CBF1-Protein eingesetzt wurde, könnte das Fehlen von ORF50/Rta erklären, warum nicht für alle vorhergesagten CBF1-Bindungsstellen im hypothetischen Promotorbereich des ORF29a- und des ORF65-Gens eine direkte CBF1-DNA-Interaktion nachzuweisen war und warum die Bindungsaffinität zu den untersuchten CBF1-Bindungsstellen nicht mit der Aktivierbarkeit der Reporterengenkonstrukte korrelierte. Zum jetzigen Zeitpunkt darf daher eine funktionelle Rolle der vorhergesagten CBF1-Bindungsstellen für die keine CBF1-DNA-Komplexformation gezeigt werden konnte, noch nicht ausgeschlossen werden. Erst Analysen mit Zellkernextrakten lytisch reaktiver KSHV-positiver Zellen oder der Kombination aus rekombinanten CBF1- und ORF50/Rta-Proteinen könnten darüber Auskunft geben, inwiefern die CBF1-Bindungsstellen in den Promotoren der KSHV-Gene ORF29a und ORF65 in Abhängigkeit von CBF1 über ORF50/Rta zur Aktivierung der Reportergene beitragen. Durch das Einführen von Mutationen in den möglichen CBF1-Bindungsstellen der Promotorbereiche könnte anschließend die funktionelle Rolle der einzelnen Sequenzen bei dem Aktivierungsprozess von ORF29a und ORF65 bestimmt werden.

Die Rolle von ORF29a und ORF65 im lytischen Zyklus

Das Expressionsniveau von ORF29a und ORF65 war in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen stark eingeschränkt. In darauffolgenden Studien konnte sowohl eine CBF1-abhängige Aktivierung über ORF50/Rta als auch eine direkte CBF1-Bindung im Promotorbereich nachgewiesen werden.

ORF65 gilt als wichtiges Antigen für den serologischen Nachweis einer KSHV-Infektion (Tedeschi et al., 2002, Simpson et al., 1996). Dabei handelt es sich um ein spät im lytischen Zyklus exprimiertes Strukturprotein, welches als *small capsid protein* (SCP) oder

auch als *capsomer-interacting protein* (SKIP) bezeichnet wird. Zusammen mit den Strukturproteinen ORF25/MCP (*major capsid protein*), ORF26/TRI-2 (*triplex-2 protein*) und ORF62/TRI-1 (*triplex-1 protein*) bildet dieses Protein das ikosaedrische Viruskapsid, welches von einer Hüllmembran bestehend aus Glykoproteinen umgeben ist. Der Bereich zwischen Kapsid und Hülle wird als Tegument bezeichnet und beinhaltet die Gerüstproteine (Lo et al., 2003, Trus et al., 2001, Wu et al., 2000). Der Zusammenbau des viralen Kapsids basiert auf der Assemblierung der Kapsidproteine. Bei diesem Prozess nimmt das ORF65-Protein eine unentbehrliche Funktion ein (Perkins et al., 2008). In Studien mit HEK293-Zellen, transfiziert mit einer rekombinanten KSHV-Mutante, in welcher das ORF65-Gen deletiert war, konnte eine drastische Abnahme der Virusproduktion basierend auf dem defekten Zusammenbau infektiöser Viruspartikel beobachtet werden. Die lytische Genexpression und die virale DNA-Replikation war durch die Abwesenheit von ORF65 hingegen nicht beeinträchtigt (Sathish and Yuan, 2010).

Die essentielle Rolle von ORF65 bei der korrekten Formation des viralen Kapsids macht deutlich, dass die verminderte Expression dieses Gens eine fatale Auswirkung auf die Produktion infektiöser Partikel haben muss.

ORF29a ist ebenfalls ein *late* exprimiertes Gen, welches basierend auf der Homologie zu den Verpackungsproteinen UL (*unique long*) 15 von HSV-1, ORF29a von HVS und EHV2 und zu BGRF1 von EBV als *DNA packaging protein* bezeichnet wird (Moore et al., 1996b). Für das HSV-1 Homolog UL15 ist eine wichtige Funktion bei der Spaltung des replizierten viralen DNA-Stranges und bei der Verpackung der Virus-DNA in die Kapside beschrieben (Baines et al., 1994a, Baines et al., 1994b). Zu der Funktion des KSHV-Gens ORF29a ist nach meinem Wissen in der Literatur bisher nichts beschrieben.

Sollte ORF29a im Verlauf des lytischen Zyklus eine ähnliche funktionelle Rolle wie das homologe HSV-1 Gen UL15 einnehmen, würde die Produktion infektiöser Partikel dramatisch eingeschränkt werden und zu dem beobachteten Phänotyp KSHV-infizierter CBF1-negativer B-Zellen beitragen.

5.4 Résumé

Innerhalb von 6 Wochen war es möglich unter Selektionsdruck sowohl CBF1-positive als auch -negative KSHV-infizierte DG75-Zelllinien zu generieren. Die etablierten KSHV-infizierten DG75-wt-Linien entsprachen per Definition einer latenten KSHV-Infektion. So konnte die Expression der latenten KSHV-Transkripte ORF71/vFlip, ORF72/vCyclin, ORF73/LANA und K10.5/vIRF3 im KSHV-Array nachgewiesen werden. Die chemische Reaktivierung

dieser Zellen führte sowohl zur Aktivierung der lytischen Genexpressionskaskade als auch zur Produktion und Freisetzung infektiöser Viruspartikel. Die KSHV-infizierten DG75-Zellen stellen daher ein biologisch relevantes und vielseitiges Modell dar, das die Untersuchung viraler oder zellulärer Gene im Kontext einer stabilen KSHV-Infektion in B-Zellen ermöglicht. Durch die Modifikation des rekombinanten KSHV oder der Mutagenese des zellulären Genoms könnte die funktionelle Rolle verschiedener zellulärer und viraler Gene charakterisiert werden und zum Verständnis der KSHV-Biologie beitragen.

Die CBF1-negativen K-DG75-Zellen stellen somit ein geeignetes zelluläres System dar, um erstmalig den Einfluss von CBF1 während der viralen Lebensphasen in KSHV-positiven B-Zellen zu charakterisieren. Die Analyse der transkriptionellen Regulation viraler Gene in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen im Verlauf des lytischen Zyklus zeigte, dass viele aber nicht alle KSHV-Gene über CBF1 reguliert werden. Die betroffenen Gene konnten weder nach ihrer Klasse (LA, E, IE, L) noch nach ihrer Funktion eingeteilt werden. So war die Expression viraler Gene, die sowohl für Strukturproteine kodieren als auch eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung des viralen Genoms, der Virusgenom-Replikation, dem Nukleotid-Metabolismus, der Immunmodulation oder der Morphogenese von Viruspartikeln spielen, eingeschränkt. Die Blockade der viralen Genexpressionskaskade in den CBF1-negativen KSHV-infizierten B-Zellen lässt eine Aufsummierung von direkt oder indirekt CBF1-abhängigen Ereignissen im Verlauf des lytischen Zyklus vermuten, welche am Ende zum Verlust der Virusproduktion führen.

5.5 Ausblick

Nach meinem Wissen war zu Beginn dieser Doktorarbeit die *in vitro* Infektion und Etablierung von stabil KSHV-infizierten Tumorzelllinien mit B-Zell-Charakter noch nicht beschrieben (Bechtel et al., 2003, Renne et al., 1998, Blackbourn et al., 2000, Myoung and Ganem, 2011a, Lagunoff et al., 2002, Chen and Lagunoff, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit war es erstmals möglich eine stabile KSHV-Infektion in der B-Zelllinie DG75 zu generieren. Eine mögliche Erklärung für die erfolgreiche Infektion der DG75-Zellen könnte die Expression spezifischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche sein, die die Bindung viraler Glykoproteine und die Aufnahme der Viruspartikel in die Wirtszelle begünstigen. In der Literatur werden für den Viruseintritt *in vivo* verschiedene mögliche Mechanismen vorgeschlagen. In Vorversuchen wurde bereits begonnen die Expression des Oberflächenmoleküls DC-sign, welches von Rappocciolo et al. als Adaptor für die Bindung von KSHV an myeloide dendritische Zellen, Makrophagen und aktivierte B-Zellen beschrieben wurde, auf

den K-DG75-Zellen zu überprüfen (Rappocciolo et al., 2006). Bisher konnte dies aber noch nicht bestätigt werden (nicht gezeigte Daten). Die Charakterisierung spezifischer B-Zellmarker auf der Zelloberfläche der DG75-Zellen würde zum Verständnis des Infektionsprozesses von KSHV beitragen.

Die Etablierung einer stabilen KSHV-Infektion war sowohl in den CBF1-positiven als auch -negativen DG75-Zellen möglich. Die frühen Ereignisse nach der viralen Infektion in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen wurden jedoch bisher nicht untersucht, wodurch ein möglicher CBF1-Einfluss auf die Etablierung des latenten Zustandes nach primärer Infektion von B-Zellen, wie von der Arbeitsgruppe von E. S. Robertson beschrieben, nicht ausgeschlossen werden kann (Lan et al., 2005c, Lu et al., 2011, Lan et al., 2005b, Lan et al., 2005a, Lan et al., 2004). Da die Aufrechterhaltung der viralen Infektion in beiden KSHV-infizierten B-Zellen nur unter Selektionsdruck gewährleistet wurde, könnte ein CBF1-abhängiger Effekt auf die Etablierung der KSHV-Infektion möglicherweise unterdrückt worden sein. Es wäre somit von großem Interesse die frühen Stunden nach primärer Infektion der wt- und CBF1-ko-DG75-Zellen vor der Puromycinselektion zu untersuchen, um zu überprüfen, ob auch in den CBF1-negativen B-Zellen eine verzögerte Etablierung der Latenz zu beobachten ist. Mit Hilfe des hier etablierten Zellsystems könnte der Nachweis der RFP-Expression dazu eingesetzt werden, den Anteil an lytischen Zellen in den DG75-wt- und CBF1-ko-Linien nach der KSHV-Infektion zu vergleichen und die Rolle von CBF1 nach primärer Infektion von B-Zellen zu charakterisieren.

Wie in Abschnitt 5.2 beschrieben, ist es zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich eine Aussage über die Funktion von CBF1 im nicht-induzierten, latenten Zustand der etablierten K-DG75-Zellen zu machen. Bisher beruhen die Daten auf *real-time* PCR-Analysen. Daher wäre es interessant unter Verwendung weiterer Methoden den latenten Zustand der CBF1-negativen K-DG75-Zellen näher zu analysieren. Der Nachweis latenter Markerproteine, wie beispielsweise ORF73/LANA, mittels Immunfluoreszenzfärbung wäre eine mögliche Verfahrensweise um das Expressionsmuster latenter Proteine zwischen den CBF1-positiven und -negativen K-DG75-Zellen zu vergleichen.

Ein wesentliches Merkmal der latenten Infektion ist das Vorliegen der viralen DNA als zirkuläres Genom im Nukleus der Wirtszelle. Nach lytischer Reaktivierung KSHV-infizierter Zellen kommt es im Verlauf des viralen Replikationsprozesses zur Synthese des viralen DNA-Stranges, der aus vielfachen Einheiten des viralen Genoms in konkatemerer Anordnung aufgebaut ist. Bisher wurde das Vorhandensein eines zirkulären Episoms in den K-DG75-Zellen noch nicht überprüft.

Obwohl anhand der ermittelten eingeschränkten Genexpression viraler Gene, die einen wichtigen Beitrag zu der viralen Replikationsmaschinerie leisten, eine funktionelle Replikation in den CBF1-negativen B-Zellen unwahrscheinlich ist, würde die Untersuchung des viralen Genoms nach lytischer Induktion den endgültigen Beweis für den Verlust der viralen Replikation in Abwesenheit von CBF1 liefern. Mit Hilfe einer markierten DNA-Sonde, die gegen eine Region im KSHV-Genom gerichtet ist, könnte in Gardellagelen der Nachweis für die Formation des Genoms im nicht-induzierten Zustand als Episom oder nach lytischer Reaktivierung als lineare DNA erbracht werden (Gardella et al., 1984).

Eine weitere Möglichkeit die Funktionalität der viralen Replikation in den CBF1-negativen K-DG75-Zellen zu analysieren wäre das Einsetzen von Replikationsinhibitoren (z.B. Phosphoracetat-Säure oder Ganciclovir). Der Vergleich der viralen DNA-Menge und der Expressionsmuster viraler Transkripte zwischen den wt- oder CBF1-ko-Zelllinien während des lytischen Zyklus nach Behandlung mit Replikationsinhibitoren, würde helfen zwischen Replikations-abhängigen oder -unabhängigen Ereignissen zu unterscheiden. Dabei könnte überprüft werden, ob es sich bei der beobachteten drastischen Zunahme der viralen Transkripte 32 Stunden nach der NaB-Induktion um einen Replikations-abhängigen Prozess handelt und inwiefern dieser in Abwesenheit von CBF1 beeinträchtigt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CBF1 für die Regulation der viralen Genexpression im Verlauf des lytischen Zyklus eine essentielle Rolle spielt. Neben den 17 bereits bekannten CBF1-abhängig regulierten Genen konnten in dieser Arbeit zwei weitere KSHV-Gene identifiziert werden, die partiell nach Bindung des ORF50/Rta-CBF1-Komplexes reguliert werden. Außerdem ist bei Betrachtung der Anzahl möglicher CBF1-Bindungsstellen im KSHV-Genom nicht auszuschließen, dass noch weitere virale Gene direkt in Abhängigkeit von CBF1 moduliert werden (Persson and Wilson, 2010). Um die Fragen zu beantworten, welche und wieviele KSHV-Gene direkt über eine CBF1-abhängige Bindung reguliert werden und wie die dazugehörigen CBF1-Bindesequenzen inklusive den flankierenden Basen im Detail charakterisiert sind, würden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIPs)-Experimente gegen CBF1 und die anschließende Sequenzierung der CBF1-gebundenen DNA-Fragmente endgültig Klarheit schaffen. In den KSHV-infizierten CBF1-ko-DG75-Zellen könnte ein konditional-induzierbares CBF1-Konstrukt durch Selektion stabil eingeführt werden, wodurch die Erfassung des Repertoires an CBF1-Zielgenen gezielt zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des lytischen Zyklus ermöglicht werden könnte.

Es wurde bereits eine CBF1-negative K-DG75-Linie mit einem Doxyzyklin-induzierbaren CBF1-Konstrukt, fusioniert mit einem Flag-Tag, und eine weitere Linie mit dem

äquivalenten Kontrollvektor etabliert. Um die Funktionalität des Konstruktes zu überprüfen, müssen nun mit diesen Linien NaB-Reaktivierungskinetiken nach und vor Induktion mit Doxyzyklin bzw. Überexpression von exogenem CBF1 durchgeführt werden. Wenn die Expression lytischer Gene in *real-time* PCR-Analysen und die Produktion infektiöser Viren in HEK293-Infektionsstudien vergleichbar mit dem Niveau der K-DG75-wt-Zellen ist, würde sich dieses System anbieten mit CBF1-ChIP-Analysen fortzufahren.

Basierend auf verschiedenen Hinweisen in der Literatur steht der lytische Replikationsprozess in Verbindung mit der Pathogenese KSHV-assoziiierter Krankheiten. Die Manipulation des CBF1-vermittelten Regulationsmechanismus lytischer Gene könnte einen neuen Therapieansatz für KSHV-assoziierte Erkrankungen darstellen. Die Inhibierung der lytischen Replikation könnte die Viruslast im Patienten einschränken und dem Fortschreiten KSHV-assoziiierter Erkrankungen entgegenwirken. Dabei würde sich die Blockierung der ORF50/Rta-Interaktion mit CBF1 z.B. durch *small molecules*, niedermolekulare Verbindungen natürlicher oder synthetischer Herkunft, die spezifisch die ORF50/Rta-CBF1-Bindung verhindern, besonders gut anbieten. Die spezifische Inhibition würde nur die CBF1-vermittelte Regulation der viralen, nicht aber der zellulären Transkriptionsmaschinerie einschränken und damit den viralen DNA-Replikationsprozess unterbinden. Im Gegensatz zu den bisher in der Therapie eingesetzten synthetischen Nukleosid-Analoga, wie dem Replikationsinhibitor Ganciclovir, würden Inhibitoren gegen die ORF50/Rta-CBF1-Bindung somit eine spezifischere antivirale Wirkung ermöglichen und zelluläre Prozesse nicht beeinträchtigen.

6 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| μ | Mikroliter |
| μCi | Mikrocurie |
| μg | Mikrogramm |
| μM | mikromolar |
| A | 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat |
| Abb. | Abbildung |
| AIDS | <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS | Aminosäure |
| BCBL | <i>body cavity-based Lymphoma</i> |
| BL | Burkitt-Lymphom |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin) |
| C | 2'-Desoxycytidin-5'-phosphat |
| cDNA | komplementäre DNA (complementary DNA) |
| ChIP | Chromatin Immunpräzipitation |
| cm | Zentimeter |
| CMV | Cytomegalovirus |
| cp | C-Promotor |
| cpm | Zerfälle pro Minute (counts per minute) |
| Ct | <i>cycle threshold</i> |
| CTD | Carboxy-terminal domain |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | 2'-Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | 3'-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat |
| ds | doppelsträngig |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | <i>early</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EBNA | Epstein-Barr Virus Nukleäres Antigen |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EF-1α | Elongationsfaktor-1α |
| EHV2 | Equines Herpesvirus 2 |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting</i> |
| FCS | Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| fw | <i>forward</i> |
| G | 2'-Desoxyguanosin-5'-phosphat |
| g | Erdbeschleunigung |
| GFP | <i>Green fluorescence protein</i> |
| Gy | Gray |
| h | Stunden (hours) |
| HCl | Hydrogenchlorid |
| HEK | <i>human embryonic kidney cells</i> |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase) |
| HSV-1 | Herpes-simplex-Virus |
| HVS | Herpes-Virus Saimiri |
| IE | <i>immediate-early</i> |
| K | Lysin |
| kb | Kilobasenpaar(e) |

| | |
|----------|--|
| kd | <i>knock down</i> |
| kDa | Kilodalton |
| ko | <i>knock out</i> |
| KS | Kaposi-Sarkom |
| KSHV | Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus |
| L | <i>late</i> |
| LA | latent |
| LANA | <i>latency-associated nuclear antigen</i> |
| LB | Luria-Bertani |
| M | Mol |
| mA | Milliampere |
| max. | maximal |
| MCD | <i>multicentric Castleman's disease</i> |
| mF | Millifarad |
| MFI | mittlere Fluoreszenzintensität |
| min | Minute |
| mind. | mindestens |
| miRNA | Mikro RNA |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| MOI | <i>multiplicity of infection</i> |
| mRNA | <i>messenger</i> Ribonukleinsäure |
| MW | Mittelwert |
| NaB | Natriumbutyrat |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| ORF | offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>) |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAN | <i>polyadenylated nuclear RNA</i> |
| PBS | Phosphat gepufferte Saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PEL | primäres Effusionslymphom |
| PURO | Puromycin |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| rev | <i>reverse</i> |
| RFP | <i>Red fluorescence protein</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| RRE | <i>rta-responsive-element</i> |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| Rta | <i>replication and transcription activator</i> |
| SD | Standardabweichung (standard deviation) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| sec | Sekunden |
| T | 2'-Desoxythymidin-5'-phosphat |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-acetat-EDTA |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin |
| Temp. | Temperatur |
| TPA | 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TRs | <i>terminal repeats</i> |

| | |
|----------|-----------------------------------|
| U | Einheit der Enzymaktivität (Unit) |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| wt | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |
| α | alpha (anti) |
| Δ | delta |

7 Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Charakterisierung der Rolle des zellulären Transkriptionsfaktors CSL/CBF1 im lytischen Zyklus KSHV-infizierter B-Zellen“

von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einem anderen Prüfungskomitee vorgelegt.

München, Juni 2011

Barbara Scholz

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Bettina Kempkes für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten, ihre hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die enthusiastischen Diskussionen sowie für ihre uneingeschränkte persönliche Unterstützung.

Vielen Dank an Prof. Dr. Elisabeth Weiß für das Erstellen des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Dirk Dittmer danke ich für die Kooperation und Durchführung des KSHV-Arrays.

Prof. Dr. Thomas Schulz und Khaled Al-Kharsah danke ich für ihre Hilfe und Beratung bei den Arbeiten mit dem rekombinanten KSHV.

Dr. Joachim Ellwart danke ich für die Hilfe bei der Zellsortierung mit dem MoFlo.

Meinen Laborkolleginnen Agnes Nowak, Sybille Thumann und Laura Glaser sowie meinen früheren Kolleginnen Sabine Petermann, Kathrin Griß und unseren Praktikanten Courtney König und Max Eizinger danke ich für die gute und freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Marie Hertle und Katharina Heinzelmann danke ich für einfach „Alles“, für eine unglaublich lustige und unvergessliche Zeit, die ich nicht missen möchte.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meine lieben Freundinnen Petra Fiedler, Anna Schwarzenberger und Claudia Bek für ihre moralische Unterstützung, ihren Beistand und ihre große Hilfe.

Mein größter Dank gilt meiner Familie: Mama, Papa, Oma, Dadda, Steffi, Dimitris, Thanassis, Alex, Therese, Pepe, Lili, Andi, Marlene und meinem Basti - ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

9 Veröffentlichungen

Publikationen

HEINZELMANN, K.*, SCHOLZ, B. A.*, NOWAK, A., FOSSUM, E., KREMMER, E., HAAS, J., FRANK, R. & KEMPKES, B. 2010. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor 4 (vIRF4/K10) is a novel interaction partner of CSL/CBF1, the major downstream effector of Notch signaling. *Journal of virology*, 84, 12255-64.

* shared first authorship

Poster

- 13th International Workshop on Kaposi's Sarcoma Associated-Herpesvirus (KSHV) and Related Agents, Charleston, South Carolina, USA, 2009

Titel: „KSHV lytic vIRF4 (K10.1), a novel target gene of Rta and potential modulator of Rta mediated transactivation via host CSL/CBF1”

- Graduate Students Day, International Graduate Program „Environmental Health“, Helmholtz Zentrum München, 2009

HMGU award 2009 for BEST POSTER within Graduate Program „Environmental Health

Titel: „KSHV lytic vIRF4 (K10.1), a novel target gene of Rta and potential modulator of Rta mediated transactivation via host CSL/CBF1”

10 Literaturverzeichnis

- AKULA, S. M., PRAMOD, N. P., WANG, F. Z. & CHANDRAN, B. 2002. Integrin alpha3beta1 (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) entry into the target cells. *Cell*, 108, 407-19.
- AKULA, S. M., WANG, F. Z., VIEIRA, J. & CHANDRAN, B. 2001. Human herpesvirus 8 interaction with target cells involves heparan sulfate. *Virology*, 282, 245-55.
- AMBROZIAK, J. A., BLACKBOURN, D. J., HERNDIER, B. G., GLOGAU, R. G., GULLETT, J. H., MCDONALD, A. R., LENNETTE, E. T. & LEVY, J. A. 1995. Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science*, 268, 582-3.
- ANTMAN, K. & CHANG, Y. 2000. Kaposi's sarcoma. *The New England journal of medicine*, 342, 1027-38.
- ARVANITAKIS, L., MESRI, E. A., NADOR, R. G., SAID, J. W., ASCH, A. S., KNOWLES, D. M. & CESARMAN, E. 1996. Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus. *Blood*, 88, 2648-54.
- BAINES, J. D., KOYAMA, A. H., HUANG, T. & ROIZMAN, B. 1994a. The UL21 gene products of herpes simplex virus 1 are dispensable for growth in cultured cells. *Journal of virology*, 68, 2929-36.
- BAINES, J. D., POON, A. P., ROVNAK, J. & ROIZMAN, B. 1994b. The herpes simplex virus 1 UL15 gene encodes two proteins and is required for cleavage of genomic viral DNA. *Journal of virology*, 68, 8118-24.
- BAIS, C., SANTOMASSO, B., COSO, O., ARVANITAKIS, L., RAAKA, E. G., GUTKIND, J. S., ASCH, A. S., CESARMAN, E., GERSHENGORN, M. C. & MESRI, E. A. 1998. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature*, 391, 86-9.
- BALLESTAS, M. E., CHATIS, P. A. & KAYE, K. M. 1999. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science*, 284, 641-4.
- BALLESTAS, M. E. & KAYE, K. M. 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mediates episome persistence through cis-acting terminal repeat (TR) sequence and specifically binds TR DNA. *Journal of virology*, 75, 3250-8.
- BECHTEL, J. T., LIANG, Y., HVIDDING, J. & GANEM, D. 2003. Host range of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *Journal of virology*, 77, 6474-81.
- BEN-BASSAT, H., GOLDBLUM, N., MITRANI, S., GOLDBLUM, T., YOFFEY, J. M., COHEN, M. M., BENTWICH, Z., RAMOT, B., KLEIN, E. & KLEIN, G. 1977. Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int J Cancer*, 19, 27-33.
- BLACKBOURN, D. J., LENNETTE, E., KLENCKE, B., MOSES, A., CHANDRAN, B., WEINSTEIN, M., GLOGAU, R. G., WITTE, M. H., WAY, D. L., KUTZKEY, T., HERNDIER, B. & LEVY, J. A. 2000. The restricted cellular host range of human herpesvirus 8. *AIDS*, 14, 1123-33.
- BONESCHI, V., BRAMBILLA, L., BERTI, E., FERRUCCI, S., CORBELLINO, M., PARRAVICINI, C. & FOSSATI, S. 2001. Human herpesvirus 8 DNA in the skin and blood of patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma: clinical correlations. *Dermatology*, 203, 19-23.
- BOSHOFF, C., ENDO, Y., COLLINS, P. D., TAKEUCHI, Y., REEVES, J. D., SCHWEICKART, V. L., SIANI, M. A., SASAKI, T., WILLIAMS, T. J., GRAY, P. W., MOORE, P. S., CHANG, Y. & WEISS, R. A. 1997. Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science*, 278, 290-4.
- BOWSER, B. S., DEWIRE, S. M. & DAMANIA, B. 2002. Transcriptional regulation of the K1 gene product of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology*, 76, 12574-83.

- BOWSER, B. S., MORRIS, S., SONG, M. J., SUN, R. & DAMANIA, B. 2006. Characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) K1 promoter activation by Rta. *Virology*, 348, 309-27.
- BRANDER, C., RAJE, N., O'CONNOR, P. G., DAVIES, F., DAVIS, J., CHAUHAN, D., HIDESHIMA, T., MARTIN, J., OSMOND, D., KEDES, D. H., WALKER, B. D., SCADDEN, D. T. & ANDERSON, K. C. 2002. Absence of biologically important Kaposi sarcoma-associated herpesvirus gene products and virus-specific cellular immune responses in multiple myeloma. *Blood*, 100, 698-700.
- BRANDER, C., SUSCOVICH, T., LEE, Y., NGUYEN, P. T., O'CONNOR, P., SEEBACH, J., JONES, N. G., VAN GORDER, M., WALKER, B. D. & SCADDEN, D. T. 2000. Impaired CTL recognition of cells latently infected with Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Journal of immunology*, 165, 2077-83.
- BRAY, S. J. 2006a. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7, 678-89.
- BRAY, S. J. 2006b. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 678-89.
- BU, W., CARROLL, K. D., PALMERI, D. & LUKAC, D. M. 2007. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 ORF50/Rta lytic switch protein functions as a tetramer. *Journal of virology*, 81, 5788-806.
- CAMPBELL, T. B., BOROK, M., GWANZURA, L., MAWHINNEY, S., WHITE, I. E., NDEMERA, B., GUDZA, I., FITZPATRICK, L. & SCHOOLEY, R. T. 2000. Relationship of human herpesvirus 8 peripheral blood virus load and Kaposi's sarcoma clinical stage. *AIDS*, 14, 2109-16.
- CANNON, J. S., CIUFO, D., HAWKINS, A. L., GRIFFIN, C. A., BOROWITZ, M. J., HAYWARD, G. S. & AMBINDER, R. F. 2000. A new primary effusion lymphoma-derived cell line yields a highly infectious Kaposi's sarcoma herpesvirus-containing supernatant. *Journal of virology*, 74, 10187-93.
- CARROLL, K. D., BU, W., PALMERI, D., SPADAVECCHIA, S., LYNCH, S. J., MARRAS, S. A., TYAGI, S. & LUKAC, D. M. 2006. Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein stimulates DNA binding of RBP-Jk/CSL to activate the Notch pathway. *J Virol*, 80, 9697-709.
- CARROLL, K. D., KHADIM, F., SPADAVECCHIA, S., PALMERI, D. & LUKAC, D. M. 2007. Direct interactions of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 ORF50/Rta protein with the cellular protein octamer-1 and DNA are critical for specifying transactivation of a delayed-early promoter and stimulating viral reactivation. *Journal of virology*, 81, 8451-67.
- CERIMELE, F., CURRELI, F., ELY, S., FRIEDMAN-KIEN, A. E., CESARMAN, E. & FLORE, O. 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus can productively infect primary human keratinocytes and alter their growth properties. *Journal of virology*, 75, 2435-43.
- CESARMAN, E., MOORE, P. S., RAO, P. H., INGHIRAMI, G., KNOWLES, D. M. & CHANG, Y. 1995. In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences. *Blood*, 86, 2708-14.
- CHANDRAN, B. 2010. Early events in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of target cells. *Journal of virology*, 84, 2188-99.
- CHANDRAN, B. & HUTT-FLETCHER, L. 2007. Gammaherpesviruses entry and early events during infection. In: ARVIN, A., CAMPADELLI-FIUME, G., MOCARSKI, E., MOORE, P. S., ROIZMAN, B., WHITLEY, R. & YAMANISHI, K. (eds.) *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge.
- CHANG, H. 2006. Notch signal transduction induces a novel profile of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *Journal of microbiology*, 44, 217-25.
- CHANG, H., DITTMER, D. P., SHIN, Y. C., HONG, Y. & JUNG, J. U. 2005a. Role of Notch signal transduction in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J Virol*, 79, 14371-82.

- CHANG, H., DITTMER, D. P., SHIN, Y. C., HONG, Y. & JUNG, J. U. 2005b. Role of Notch signal transduction in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *Journal of virology*, 79, 14371-82.
- CHANG, H., GWACK, Y., KINGSTON, D., SOUVLIS, J., LIANG, X., MEANS, R. E., CESARMAN, E., HUTT-FLETCHER, L. & JUNG, J. U. 2005c. Activation of CD21 and CD23 gene expression by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA. *Journal of virology*, 79, 4651-63.
- CHANG, P. J., BOONSIRI, J., WANG, S. S., CHEN, L. Y. & MILLER, G. 2010. Binding of RBP-Jkappa (CSL) protein to the promoter of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF47 (gL) gene is a critical but not sufficient determinant of transactivation by ORF50 protein. *Virology*, 398, 38-48.
- CHANG, P. J., SHEDD, D., GRADOVILLE, L., CHO, M. S., CHEN, L. W., CHANG, J. & MILLER, G. 2002. Open reading frame 50 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus directly activates the viral PAN and K12 genes by binding to related response elements. *Journal of virology*, 76, 3168-78.
- CHANG, P. J., SHEDD, D. & MILLER, G. 2005d. Two subclasses of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic cycle promoters distinguished by open reading frame 50 mutant proteins that are deficient in binding to DNA. *Journal of virology*, 79, 8750-63.
- CHANG, Y., CESARMAN, E., PESSIN, M. S., LEE, F., CULPEPPER, J., KNOWLES, D. M. & MOORE, P. S. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, 266, 1865-9.
- CHEN, J., UEDA, K., SAKAKIBARA, S., OKUNO, T. & YAMANISHI, K. 2000. Transcriptional regulation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor gene. *J Virol*, 74, 8623-34.
- CHEN, J., YE, F., XIE, J., KUHNE, K. & GAO, S. J. 2009. Genome-wide identification of binding sites for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein, RTA. *Virology*, 386, 290-302.
- CHEN, L. & LAGUNOFF, M. 2005. Establishment and maintenance of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency in B cells. *Journal of virology*, 79, 14383-91.
- CHUNG, C. N., HAMAGUCHI, Y., HONJO, T. & KAWAICHI, M. 1994. Site-directed mutagenesis study on DNA binding regions of the mouse homologue of Suppressor of Hairless, RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res*, 22, 2938-44.
- CIUFO, D. M., CANNON, J. S., POOLE, L. J., WU, F. Y., MURRAY, P., AMBINDER, R. F. & HAYWARD, G. S. 2001. 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. *Journal of virology*, 75, 5614-26.
- CULLEN, B. R. 2006. Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments. *Nature methods*, 3, 677-81.
- CURRY, C. L., REED, L. L., GOLDE, T. E., MIELE, L., NICKOLOFF, B. J. & FOREMAN, K. E. 2005. Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells. *Oncogene*, 24, 6333-44.
- DAVIS, D. A., RINDERKNECHT, A. S., ZOETEWIJ, J. P., AOKI, Y., READ-CONNOLLE, E. L., TOSATO, G., BLAUVELT, A. & YARCHOAN, R. 2001. Hypoxia induces lytic replication of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Blood*, 97, 3244-50.
- DEL BIANCO, C., ASTER, J. C. & BLACKLOW, S. C. 2008. Mutational and energetic studies of Notch 1 transcription complexes. *Journal of molecular biology*, 376, 131-40.
- DENG, H., SONG, M. J., CHU, J. T. & SUN, R. 2002. Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). *Journal of virology*, 76, 8252-64.
- DENG, H., YOUNG, A. & SUN, R. 2000. Auto-activation of the rta gene of human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *The Journal of general virology*, 81, 3043-8.
- DEZUBE, B. J., ZAMBELA, M., SAGE, D. R., WANG, J. F. & FINGEROTH, J. D. 2002. Characterization of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 infection of human vascular endothelial cells: early events. *Blood*, 100, 888-96.

- DOU, S., ZENG, X., CORTES, P., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., HONJO, T. & VALES, L. D. 1994. The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. *Molecular and cellular biology*, 14, 3310-9.
- DOURMISHEV, L. A., DOURMISHEV, A. L., PALMERI, D., SCHWARTZ, R. A. & LUKAC, D. M. 2003. Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67, 175-212, table of contents.
- DUAN, W., WANG, S., LIU, S. & WOOD, C. 2001. Characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 ORF57 promoter. *Archives of virology*, 146, 403-13.
- ELLISON, T. J., IZUMIYA, Y., IZUMIYA, C., LUCIW, P. A. & KUNG, H. J. 2009. A comprehensive analysis of recruitment and transactivation potential of K-Rta and K-bZIP during reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology*, 387, 76-88.
- ENGELS, E. A., BIGGAR, R. J., MARSHALL, V. A., WALTERS, M. A., GAMACHE, C. J., WHITBY, D. & GOEDERT, J. J. 2003. Detection and quantification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus to predict AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *AIDS*, 17, 1847-51.
- FAKHARI, F. D. & DITTMER, D. P. 2002. Charting latency transcripts in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by whole-genome real-time quantitative PCR. *Journal of virology*, 76, 6213-23.
- FRIED, M. & CROTHERS, D. M. 1981. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic acids research*, 9, 6505-25.
- GABAY, C., BEN-BASSAT, H., SCHLESINGER, M. & LASKOV, R. 1999. Somatic mutations and intraclonal variations in the rearranged V κ genes of B-non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *European journal of haematology*, 63, 180-91.
- GARDELLA, T., MEDVECZKY, P., SAIRENJI, T. & MULDER, C. 1984. Detection of circular and linear herpesvirus DNA molecules in mammalian cells by gel electrophoresis. *Journal of virology*, 50, 248-54.
- GIRALDO, G., BETH, E. & HAGUENAU, F. 1972. Herpes-type virus particles in tissue culture of Kaposi's sarcoma from different geographic regions. *Journal of the National Cancer Institute*, 49, 1509-26.
- GORDADZE, A. V., PENG, R., TAN, J., LIU, G., SUTTON, R., KEMPKES, B., BORNKAMM, G. W. & LING, P. D. 2001. Notch1IC partially replaces EBNA2 function in B cells immortalized by Epstein-Barr virus. *Journal of virology*, 75, 5899-912.
- GRADOVILLE, L., GERLACH, J., GROGAN, E., SHEDD, D., NIKIFOROW, S., METROKA, C. & MILLER, G. 2000. 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. *Journal of virology*, 74, 6207-12.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. & NAIRN, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- GWACK, Y., BAEK, H. J., NAKAMURA, H., LEE, S. H., MEISTERERNST, M., ROEDER, R. G. & JUNG, J. U. 2003. Principal role of TRAP/mediator and SWI/SNF complexes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA-mediated lytic reactivation. *Molecular and cellular biology*, 23, 2055-67.
- GWACK, Y., BYUN, H., HWANG, S., LIM, C. & CHOE, J. 2001. CREB-binding protein and histone deacetylase regulate the transcriptional activity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50. *Journal of virology*, 75, 1909-17.
- HAQUE, M., DAVIS, D. A., WANG, V., WIDMER, I. & YARCHOAN, R. 2003. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) contains hypoxia response elements: relevance to lytic induction by hypoxia. *J Virol*, 77, 6761-8.
- HASSMAN, L. M., ELLISON, T. J. & KEDES, D. H. 2011. KSHV infects a subset of human tonsillar B cells, driving proliferation and plasmablast differentiation. *The Journal of clinical investigation*, 121, 752-68.
- HAYWARD, S. D., LIU, J. & FUJIMURO, M. 2006. Notch and Wnt signaling: mimicry and manipulation by gamma herpesviruses. *Sci STKE*, 2006, re4.
- HEINZELMANN, K., SCHOLZ, B. A., NOWAK, A., FOSSUM, E., KREMMER, E., HAAS, J., FRANK, R. & KEMPKES, B. 2010. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon

- regulatory factor 4 (vIRF4/K10) is a novel interaction partner of CSL/CBF1, the major downstream effector of Notch signaling. *Journal of virology*, 84, 12255-64.
- HENRY, M., UTHMAN, A., GEUSAU, A., RIEGER, A., FURCI, L., LAZZARIN, A., LUSSO, P. & TSCHACHLER, E. 1999. Infection of circulating CD34+ cells by HHV-8 in patients with Kaposi's sarcoma. *The Journal of investigative dermatology*, 113, 613-6.
- ISHIDO, S., WANG, C., LEE, B. S., COHEN, G. B. & JUNG, J. U. 2000. Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins. *Journal of virology*, 74, 5300-9.
- IZUMIYA, Y., LIN, S. F., ELLISON, T., CHEN, L. Y., IZUMIYA, C., LUCIW, P. & KUNG, H. J. 2003. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP is a coregulator of K-Rta: physical association and promoter-dependent transcriptional repression. *Journal of virology*, 77, 1441-51.
- JARVILUOMA, A. & OJALA, P. M. 2006. Cell signaling pathways engaged by KSHV. *Biochim Biophys Acta*, 1766, 140-58.
- JENNER, R. G. & BOSHOFF, C. 2002. The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochim Biophys Acta*, 1602, 1-22.
- JEONG, J. H., ORVIS, J., KIM, J. W., MCMURTREY, C. P., RENNE, R. & DITTMER, D. P. 2004. Regulation and autoregulation of the promoter for the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *The Journal of biological chemistry*, 279, 16822-31.
- JOCHNER, N., EICK, D., ZIMBER-STROBL, U., PAWLITA, M., BORNKAMM, G. W. & KEMPKES, B. 1996. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the immunoglobulin mu gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells. *Embo J*, 15, 375-82.
- KAISER, C., LAUX, G., EICK, D., JOCHNER, N., BORNKAMM, G. W. & KEMPKES, B. 1999. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol*, 73, 4481-4.
- KALEEBA, J. A. & BERGER, E. A. 2006. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus fusion-entry receptor: cystine transporter xCT. *Science*, 311, 1921-4.
- KIRSHNER, J. R., STASKUS, K., HAASE, A., LAGUNOFF, M. & GANEM, D. 1999. Expression of the open reading frame 74 (G-protein-coupled receptor) gene of Kaposi's sarcoma (KS)-associated herpesvirus: implications for KS pathogenesis. *Journal of virology*, 73, 6006-14.
- KLICHE, S., KREMMER, E., HAMMERSCHMIDT, W., KOSZINOWSKI, U. & HAAS, J. 1998. Persistent infection of Epstein-Barr virus-positive B lymphocytes by human herpesvirus 8. *J Virol*, 72, 8143-9.
- KOMANDURI, K. V., LUCE, J. A., MCGRATH, M. S., HERNDIER, B. G. & NG, V. L. 1996. The natural history and molecular heterogeneity of HIV-associated primary malignant lymphomatous effusions. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*, 13, 215-26.
- KOVALL, R. A. & HENDRICKSON, W. A. 2004. Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *Embo J*, 23, 3441-51.
- KRISHNAN, H. H., NARANATT, P. P., SMITH, M. S., ZENG, L., BLOOMER, C. & CHANDRAN, B. 2004. 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. *Journal of virology*, 78, 3601-20.
- LAGUNOFF, M., BECHTEL, J., VENETSANAKOS, E., ROY, A. M., ABBEY, N., HERNDIER, B., MCMAHON, M. & GANEM, D. 2002. De novo infection and serial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured endothelial cells. *Journal of virology*, 76, 2440-8.
- LAN, K., KUPPERS, D. A. & ROBERTSON, E. S. 2005a. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation is regulated by interaction of latency-associated nuclear antigen with recombination signal sequence-binding protein Jkappa, the major downstream effector of the Notch signaling pathway. *J Virol*, 79, 3468-78.
- LAN, K., KUPPERS, D. A., VERMA, S. C. & ROBERTSON, E. S. 2004. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen inhibits lytic replication by

- targeting Rta: a potential mechanism for virus-mediated control of latency. *Journal of virology*, 78, 6585-94.
- LAN, K., KUPPERS, D. A., VERMA, S. C., SHARMA, N., MURAKAMI, M. & ROBERTSON, E. S. 2005b. Induction of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen by the lytic transactivator RTA: a novel mechanism for establishment of latency. *J Virol*, 79, 7453-65.
- LAN, K., KUPPERS, D. A., VERMA, S. C., SHARMA, N., MURAKAMI, M. & ROBERTSON, E. S. 2005c. Induction of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen by the lytic transactivator RTA: a novel mechanism for establishment of latency. *Journal of virology*, 79, 7453-65.
- LAN, K., MURAKAMI, M., CHOUDHURI, T., KUPPERS, D. A. & ROBERTSON, E. S. 2006. Intracellular-activated Notch1 can reactivate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency. *Virology*, 351, 393-403.
- LEI, X., BAI, Z., YE, F., HUANG, Y. & GAO, S. J. 2010. Regulation of herpesvirus lifecycle by viral microRNAs. *Virulence*, 1, 433-5.
- LIANG, Y., CHANG, J., LYNCH, S. J., LUKAC, D. M. & GANEM, D. 2002. The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes & development*, 16, 1977-89.
- LIANG, Y. & GANEM, D. 2003. Lytic but not latent infection by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus requires host CSL protein, the mediator of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8490-5.
- LIANG, Y. & GANEM, D. 2004. RBP-J (CSL) is essential for activation of the K14/vGPCR promoter of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by the lytic switch protein RTA. *Journal of virology*, 78, 6818-26.
- LIAO, W., TANG, Y., LIN, S. F., KUNG, H. J. & GIAM, C. Z. 2003. K-bZIP of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 (KSHV/HHV-8) binds KSHV/HHV-8 Rta and represses Rta-mediated transactivation. *Journal of virology*, 77, 3809-15.
- LING, P. D. & HAYWARD, S. D. 1995. Contribution of conserved amino acids in mediating the interaction between EBNA2 and CBF1/RBPJk. *J Virol*, 69, 1944-50.
- LIU, Y., CAO, Y., LIANG, D., GAO, Y., XIA, T., ROBERTSON, E. S. & LAN, K. 2008. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA activates the processivity factor ORF59 through interaction with RBP-Jkappa and a cis-acting RTA responsive element. *Virology*, 380, 264-75.
- LO, P., YU, X., ATANASOV, I., CHANDRAN, B. & ZHOU, Z. H. 2003. Three-dimensional localization of pORF65 in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus capsid. *Journal of virology*, 77, 4291-7.
- LONGNECKER, R. & NEIPEL, F. 2007. Introduction to the human gamma-herpesviruses. In: ARVIN, A., CAMPADELLI-FIUME, G., MOCARSKI, E., MOORE, P. S., ROIZMAN, B., WHITLEY, R. & YAMANISHI, K. (eds.) *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge.
- LU, F., ZHOU, J., WIEDMER, A., MADDEN, K., YUAN, Y. & LIEBERMAN, P. M. 2003. Chromatin remodeling of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50 promoter correlates with reactivation from latency. *Journal of virology*, 77, 11425-35.
- LU, J., VERMA, S. C., CAI, Q. & ROBERTSON, E. S. 2011. The single RBP-J{kappa} Site within the LANA promoter is crucial for establishing KSHV latency during primary infection. *Journal of virology*.
- LUKAC, D. M., GARIBYAN, L., KIRSHNER, J. R., PALMERI, D. & GANEM, D. 2001. DNA binding by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein is necessary for transcriptional activation of two viral delayed early promoters. *Journal of virology*, 75, 6786-99.
- LUKAC, D. M., KIRSHNER, J. R. & GANEM, D. 1999. 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. *Journal of virology*, 73, 9348-61.
- LUKAC, D. M., RENNE, R., KIRSHNER, J. R. & GANEM, D. 1998. Reactivation of Escherichia coli 's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology*, 252, 304-12.

- LUPPI, M., BAROZZI, P., SCHULZ, T. F., SETTI, G., STASKUS, K., TROVATO, R., NARNI, F., DONELLI, A., MAIORANA, A., MARASCA, R., SANDRINI, S. & TORELLI, G. 2000. Bone marrow failure associated with human herpesvirus 8 infection after transplantation. *The New England journal of medicine*, 343, 1378-85.
- MAIER, S., SANTAK, M., MANTIK, A., GRABUSIC, K., KREMMER, E., HAMMERSCHMIDT, W. & KEMPKE, B. 2005. A somatic knockout of CBF1 in a human B-cell line reveals that induction of CD21 and CCR7 by EBNA-2 is strictly CBF1 dependent and that downregulation of immunoglobulin M is partially CBF1 independent. *J Virol*, 79, 8784-92.
- MARCELIN, A. G., CALVEZ, V. & DUSSAIX, E. 2007. KSHV after an organ transplant: should we screen? *Current topics in microbiology and immunology*, 312, 245-62.
- MARTIN, D. F., KUPPERMANN, B. D., WOLITZ, R. A., PALESTINE, A. G., LI, H. & ROBINSON, C. A. 1999. Oral ganciclovir for patients with cytomegalovirus retinitis treated with a ganciclovir implant. Roche Ganciclovir Study Group. *The New England journal of medicine*, 340, 1063-70.
- MATSUMURA, S., FUJITA, Y., GOMEZ, E., TANESE, N. & WILSON, A. C. 2005. Activation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus major latency locus by the lytic switch protein RTA (ORF50). *Journal of virology*, 79, 8493-505.
- MESRI, E. A., CESARMAN, E. & BOSHOFF, C. 2010. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nature reviews. Cancer*, 10, 707-19.
- MILLER, G., HESTON, L., GROGAN, E., GRADOVILLE, L., RIGSBY, M., SUN, R., SHEDD, D., KUSHNARYOV, V. M., GROSSBERG, S. & CHANG, Y. 1997. Selective switch between latency and lytic replication of Kaposi's sarcoma herpesvirus and Epstein-Barr virus in dually infected body cavity lymphoma cells. *Journal of virology*, 71, 314-24.
- MOORE, P. S., BOSHOFF, C., WEISS, R. A. & CHANG, Y. 1996a. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science*, 274, 1739-44.
- MOORE, P. S., GAO, S. J., DOMINGUEZ, G., CESARMAN, E., LUNGU, O., KNOWLES, D. M., GARBER, R., PELLETT, P. E., MCGEOCH, D. J. & CHANG, Y. 1996b. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *Journal of virology*, 70, 549-58.
- MOSES, A. V., FISH, K. N., RUHL, R., SMITH, P. P., STRUSSENBERG, J. G., ZHU, L., CHANDRAN, B. & NELSON, J. A. 1999. Long-term infection and transformation of dermal microvascular endothelial cells by human herpesvirus 8. *Journal of virology*, 73, 6892-902.
- MYOUNG, J. & GANEM, D. 2011a. Active lytic infection of human primary tonsillar B cells by KSHV and its noncytolytic control by activated CD4+ T cells. *The Journal of clinical investigation*, 121, 1130-40.
- MYOUNG, J. & GANEM, D. 2011b. Infection of primary human tonsillar lymphoid cells by KSHV reveals frequent but abortive infection of T cells. *Virology*, 413, 1-11.
- NAKAMURA, H., LU, M., GWACK, Y., SOUVLIS, J., ZEICHNER, S. L. & JUNG, J. U. 2003. Global changes in Kaposi's sarcoma-associated virus gene expression patterns following expression of a tetracycline-inducible Rta transactivator. *Journal of virology*, 77, 4205-20.
- NAM, Y., SLIZ, P., SONG, L., ASTER, J. C. & BLACKLOW, S. C. 2006. Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell*, 124, 973-83.
- NAM, Y., WENG, A. P., ASTER, J. C. & BLACKLOW, S. C. 2003. Structural requirements for assembly of the CSL-intracellular Notch1-Mastermind-like 1 transcriptional activation complex. *J Biol Chem*, 278, 21232-9.
- NARANATT, P. P., AKULA, S. M., ZIEN, C. A., KRISHNAN, H. H. & CHANDRAN, B. 2003. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC-zeta-MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: implications for infectivity. *Journal of virology*, 77, 1524-39.
- NEIPEL, F., ALBRECHT, J. C. & FLECKENSTEIN, B. 1997. Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity? *Journal of virology*, 71, 4187-92.
- NEIPEL, F., ALBRECHT, J. C. & FLECKENSTEIN, B. 1998. Human herpesvirus 8--the first human Rhadinovirus. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 73-7.

- NICHOLAS, J., RUVOLO, V. R., BURNS, W. H., SANDFORD, G., WAN, X., CIUFO, D., HENDRICKSON, S. B., GUO, H. G., HAYWARD, G. S. & REITZ, M. S. 1997. Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nature medicine*, 3, 287-92.
- OKSENHENDLER, E., BOULANGER, E., GALICIER, L., DU, M. Q., DUPIN, N., DISS, T. C., HAMOUDI, R., DANIEL, M. T., AGBALIKA, F., BOSHOFF, C., CLAUVEL, J. P., ISAACSON, P. G. & MEIGNIN, V. 2002. High incidence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-related non-Hodgkin lymphoma in patients with HIV infection and multicentric Castleman disease. *Blood*, 99, 2331-6.
- PAN, H., XIE, J., YE, F. & GAO, S. J. 2006. Modulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and replication by MEK/ERK, JNK, and p38 multiple mitogen-activated protein kinase pathways during primary infection. *Journal of virology*, 80, 5371-82.
- PAPIN, J., VAHRSON, W., HINES-BOYKIN, R. & DITTMER, D. P. 2005. Real-time quantitative PCR analysis of viral transcription. *Methods in molecular biology*, 292, 449-80.
- PARKS, A. L., KLUEG, K. M., STOUT, J. R. & MUSKAVITCH, M. A. 2000. Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development*, 127, 1373-85.
- PARRAVICINI, C., CHANDRAN, B., CORBELLINO, M., BERTI, E., PAULLI, M., MOORE, P. S. & CHANG, Y. 2000. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *The American journal of pathology*, 156, 743-9.
- PAULOSE-MURPHY, M., HA, N. K., XIANG, C., CHEN, Y., GILLIM, L., YARCHOAN, R., MELTZER, P., BITTNER, M., TRENT, J. & ZEICHNER, S. 2001. Transcription program of human herpesvirus 8 (kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). *Journal of virology*, 75, 4843-53.
- PERKINS, E. M., ANACKER, D., DAVIS, A., SANKAR, V., AMBINDER, R. F. & DESAI, P. 2008. Small capsid protein pORF65 is essential for assembly of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus capsids. *Journal of virology*, 82, 7201-11.
- PERSSON, L. M. & WILSON, A. C. 2010. Wide-scale use of Notch signaling factor CSL/RBP-Jkappa in RTA-mediated activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic genes. *Journal of virology*, 84, 1334-47.
- PULVERTAFT, J. V. 1964. Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet*, 39, 238-40.
- PURSGLOVE, S. E. & MACKAY, J. P. 2005. CSL: a notch above the rest. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 2472-7.
- PYAKUREL, P., PAK, F., MWAKIGONJA, A. R., KAYA, E. & BIBERFELD, P. 2007. KSHV/HHV-8 and HIV infection in Kaposi's sarcoma development. *Infect Agent Cancer*, 2, 4.
- QUINLIVAN, E. B., ZHANG, C., STEWART, P. W., KOMOLTRI, C., DAVIS, M. G. & WEHBIE, R. S. 2002. Elevated virus loads of Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus 8 predict Kaposi's sarcoma disease progression, but elevated levels of human immunodeficiency virus type 1 do not. *The Journal of infectious diseases*, 185, 1736-44.
- RAPPOCCIOLO, G., HENSLER, H. R., JAIS, M., REINHART, T. A., PEGU, A., JENKINS, F. J. & RINALDO, C. R. 2008. Human herpesvirus 8 infects and replicates in primary cultures of activated B lymphocytes through DC-SIGN. *Journal of virology*, 82, 4793-806.
- RAPPOCCIOLO, G., PIAZZA, P., FULLER, C. L., REINHART, T. A., WATKINS, S. C., ROWE, D. T., JAIS, M., GUPTA, P. & RINALDO, C. R. 2006. DC-SIGN on B lymphocytes is required for transmission of HIV-1 to T lymphocytes. *PLoS pathogens*, 2, e70.
- RENNE, R., BLACKBOURN, D., WHITBY, D., LEVY, J. & GANEM, D. 1998. Limited transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *Journal of virology*, 72, 5182-8.
- RENNE, R., FLEPS, U., LUCIW, P. A. & NEUMANN-HAEFELIN, D. 1996a. Transactivation of the two promoters of SFV-3 by different mechanisms. *Virology*, 221, 362-7.
- RENNE, R., ZHONG, W., HERNDIER, B., MCGRATH, M., ABBEY, N., KEDES, D. & GANEM, D. 1996b. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med*, 2, 342-6.

- RUSSO, J. J., BOHENZKY, R. A., CHIEN, M. C., CHEN, J., YAN, M., MADDALENA, D., PARRY, J. P., PERUZZI, D., EDELMAN, I. S., CHANG, Y. & MOORE, P. S. 1996a. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 14862-7.
- RUSSO, J. J., BOHENZKY, R. A., CHIEN, M. C., CHEN, J., YAN, M., MADDALENA, D., PARRY, J. P., PERUZZI, D., EDELMAN, I. S., CHANG, Y. & MOORE, P. S. 1996b. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14862-7.
- SAKAKIBARA, S., UEDA, K., CHEN, J., OKUNO, T. & YAMANISHI, K. 2001. Octamer-binding sequence is a key element for the autoregulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50/Lyta gene expression. *Journal of virology*, 75, 6894-900.
- SATHISH, N. & YUAN, Y. 2010. Functional characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus small capsid protein by bacterial artificial chromosome-based mutagenesis. *Virology*, 407, 306-18.
- SCHROETER, E. H., KISSLINGER, J. A. & KOPAN, R. 1998. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, 393, 382-6.
- SCHULZ, T. F. 2006. The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus. *J Pathol*, 208, 187-98.
- SCHULZ, T. F. & CHANG, Y. 2007. KSHV gene expression and regulation. In: ARVIN, A., CAMPADELLI-FIUME, G., MOCARSKI, E., MOORE, P. S., ROIZMAN, B., WHITLEY, R. & YAMANISHI, K. (eds.) *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge.
- SCHULZ, T. F., SHELDON, J. & GREENSILL, J. 2002. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) or human herpesvirus 8 (HHV8). *Virus research*, 82, 115-26.
- SIMPSON, G. R., SCHULZ, T. F., WHITBY, D., COOK, P. M., BOSHOF, C., RAINBOW, L., HOWARD, M. R., GAO, S. J., BOHENZKY, R. A., SIMMONDS, P., LEE, C., DE RUITER, A., HATZAKIS, A., TEDDER, R. S., WELLER, I. V., WEISS, R. A. & MOORE, P. S. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet*, 348, 1133-8.
- SONG, M. J., BROWN, H. J., WU, T. T. & SUN, R. 2001. Transcription activation of polyadenylated nuclear rna by rta in human herpesvirus 8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology*, 75, 3129-40.
- SONG, M. J., DENG, H. & SUN, R. 2003. Comparative study of regulation of RTA-responsive genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *Journal of virology*, 77, 9451-62.
- SOULIER, J., GROLLET, L., OKSENHENDLER, E., CACOUB, P., CAZALS-HATEM, D., BABINET, P., D'AGAY, M. F., CLAUVEL, J. P., RAPHAEL, M., DEGOS, L. & ET AL. 1995. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemans disease. *Blood*, 86, 1276-80.
- STASKUS, K. A., SUN, R., MILLER, G., RACZ, P., JASLOWSKI, A., METROKA, C., BRETT-SMITH, H. & HAASE, A. T. 1999. Cellular tropism and viral interleukin-6 expression distinguish human herpesvirus 8 involvement in Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castlemans disease. *Journal of virology*, 73, 4181-7.
- STAUDT, M. R. & DITTMER, D. P. 2006. Promoter switching allows simultaneous transcription of LANA and K14/vGPCR of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology*, 350, 192-205.
- STROBL, L. J., HOFELMAYR, H., MARSCHALL, G., BRIELMEIER, M., BORNKAMM, G. W. & ZIMMER-STROBL, U. 2000. Activated Notch1 modulates gene expression in B cells similarly to Epstein-Barr viral nuclear antigen 2. *J Virol*, 74, 1727-35.
- STURN, A., QUACKENBUSH, J. & TRAJANOSKI, Z. 2002. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*, 18, 207-8.
- SUN, R., LIN, S. F., GRADOVILLE, L., YUAN, Y., ZHU, F. & MILLER, G. 1998. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 10866-71.
- SUN, R., LIN, S. F., STASKUS, K., GRADOVILLE, L., GROGAN, E., HAASE, A. & MILLER, G. 1999. Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *Journal of virology*, 73, 2232-42.

- TEDESCHI, R., DILLNER, J. & DE PAOLI, P. 2002. Laboratory diagnosis of human herpesvirus 8 infection in humans. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 21, 831-44.
- TOMESCU, C., LAW, W. K. & KEDES, D. H. 2003. Surface downregulation of major histocompatibility complex class I, PE-CAM, and ICAM-1 following de novo infection of endothelial cells with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology*, 77, 9669-84.
- TOTH, Z., MAGLINTE, D. T., LEE, S. H., LEE, H. R., WONG, L. Y., BRULOIS, K. F., LEE, S., BUCKLEY, J. D., LAIRD, P. W., MARQUEZ, V. E. & JUNG, J. U. 2010. Epigenetic analysis of KSHV latent and lytic genomes. *PLoS pathogens*, 6, e1001013.
- TRUS, B. L., HEYMANN, J. B., NEALON, K., CHENG, N., NEWCOMB, W. W., BROWN, J. C., KEDES, D. H. & STEVEN, A. C. 2001. Capsid structure of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, a gammaherpesvirus, compared to those of an alphaherpesvirus, herpes simplex virus type 1, and a betaherpesvirus, cytomegalovirus. *Journal of virology*, 75, 2879-90.
- TUN, T., HAMAGUCHI, Y., MATSUNAMI, N., FURUKAWA, T., HONJO, T. & KAWAICHI, M. 1994. Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res*, 22, 965-71.
- VERMA, S. C., BORAH, S. & ROBERTSON, E. S. 2004. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus up-regulates transcription of human telomerase reverse transcriptase promoter through interaction with transcription factor Sp1. *Journal of virology*, 78, 10348-59.
- VIEIRA, J., O'HEARN, P., KIMBALL, L., CHANDRAN, B. & COREY, L. 2001. Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) lytic replication by human cytomegalovirus. *Journal of virology*, 75, 1378-86.
- VIEIRA, J. & O'HEARN, P. M. 2004. Use of the red fluorescent protein as a marker of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic gene expression. *Virology*, 325, 225-40.
- WANG, S., LIU, S., WU, M. H., GENG, Y. & WOOD, C. 2001. Identification of a cellular protein that interacts and synergizes with the RTA (ORF50) protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in transcriptional activation. *Journal of virology*, 75, 11961-73.
- WANG, S. E., WU, F. Y., CHEN, H., SHAMAY, M., ZHENG, Q. & HAYWARD, G. S. 2004a. Early activation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA, RAP, and MTA promoters by the tetradecanoyl phorbol acetate-induced AP1 pathway. *Journal of virology*, 78, 4248-67.
- WANG, S. E., WU, F. Y., FUJIMURO, M., ZONG, J., HAYWARD, S. D. & HAYWARD, G. S. 2003a. Role of CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) in activation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) lytic-cycle replication-associated protein (RAP) promoter in cooperation with the KSHV replication and transcription activator (RTA) and RAP. *Journal of virology*, 77, 600-23.
- WANG, S. E., WU, F. Y., YU, Y. & HAYWARD, G. S. 2003b. CCAAT/enhancer-binding protein-alpha is induced during the early stages of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) lytic cycle reactivation and together with the KSHV replication and transcription activator (RTA) cooperatively stimulates the viral RTA, MTA, and PAN promoters. *Journal of virology*, 77, 9590-612.
- WANG, S. S., CHEN, L. W., CHEN, L. Y., TSAI, H. H., SHIH, Y. C., YANG, C. T. & CHANG, P. J. 2010. Transcriptional regulation of the ORF61 and ORF60 genes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology*, 397, 311-21.
- WANG, Y., CHONG, O. T. & YUAN, Y. 2004b. Differential regulation of K8 gene expression in immediate-early and delayed-early stages of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology*, 325, 149-63.
- WANG, Y., TANG, Q., MAUL, G. G. & YUAN, Y. 2006. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ori-Lyt-dependent DNA replication: dual role of replication and transcription activator. *Journal of virology*, 80, 12171-86.
- WEST, J. T. & WOOD, C. 2003. The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 regulator of transcription activation (RTA) in control of gene expression. *Oncogene*, 22, 5150-63.

- WHITBY, D., HOWARD, M. R., TENANT-FLOWERS, M., BRINK, N. S., COPAS, A., BOSHOFF, C., HATZIOANNOU, T., SUGGETT, F. E., ALDAM, D. M., DENTON, A. S. & ET AL. 1995. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet*, 346, 799-802.
- WIES, E., MORI, Y., HAHN, A., KREMMER, E., STURZL, M., FLECKENSTEIN, B. & NEIPEL, F. 2008. The viral interferon-regulatory factor-3 is required for the survival of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood*, 111, 320-7.
- WONG, E. L. & DAMANIA, B. 2006. Transcriptional regulation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 gene. *Journal of virology*, 80, 1385-92.
- WU, L., LO, P., YU, X., STOOPS, J. K., FORGHANI, B. & ZHOU, Z. H. 2000. Three-dimensional structure of the human herpesvirus 8 capsid. *Journal of virology*, 74, 9646-54.
- XIE, J., AJIBADE, A. O., YE, F., KUHNE, K. & GAO, S. J. 2008. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency requires MEK/ERK, JNK and p38 multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Virology*, 371, 139-54.
- XU, Y., AUCCOIN, D. P., HUETE, A. R., CEI, S. A., HANSON, L. J. & PARI, G. S. 2005. A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 ORF50 deletion mutant is defective for reactivation of latent virus and DNA replication. *Journal of virology*, 79, 3479-87.
- YE, J., SHEDD, D. & MILLER, G. 2005. An Sp1 response element in the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50 promoter mediates lytic cycle induction by butyrate. *Journal of virology*, 79, 1397-408.
- YU, Y., BLACK, J. B., GOLDSMITH, C. S., BROWNING, P. J., BHALLA, K. & OFFERMANN, M. K. 1999. Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells. *The Journal of general virology*, 80 (Pt 1), 83-90.
- ZHANG, L., CHIU, J. & LIN, J. C. 1998. Activation of human herpesvirus 8 (HHV-8) thymidine kinase (TK) TATAA-less promoter by HHV-8 ORF50 gene product is SP1 dependent. *DNA and cell biology*, 17, 735-42.
- ZHU, F. X., CUSANO, T. & YUAN, Y. 1999. Identification of the immediate-early transcripts of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology*, 73, 5556-67.
- ZIEGELBAUER, J., GRUNDHOFF, A. & GANEM, D. 2006. Exploring the DNA binding interactions of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein by selective amplification of bound sequences in vitro. *Journal of virology*, 80, 2958-67.
- ZIMMER-STROBL, U. & STROBL, L. J. 2001. EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol*, 11, 423-34.

Bücher:

- DOERR, H.W. & WOLFRAM, H. 2010. Gerlich (Hrsg.): Medizinische Virologie; Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder; Thieme-Verlag
- GANEM, D. 2006. Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus. In: KNIPE, D. M. H., PETER M. & GRIFFIN, DIANE E. (ed.) *Fields Virology*. 5th ed.: Lippincott Williams & Wilkins
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- YASUMURA, Y. & KAWAKITA, Y. 1963, Studies on SV40 in tissue culture - preliminary step for cancer research in vitro. *Nihon Rinsho* 21: 1201-1215