

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin

**Charakterisierung von Herpesviren bei Spendertieren für die
Xenotransplantation: Identifikation von funktionalen Regulator-
proteinen des porcinen lymphotropen Herpesvirus Typ-1 (PLHV-1)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Iris Lindner aus Potsdam

Berlin 2007

Journal-Nr.:

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Ronald Gust
Erster Gutachter: Prof. Dr. Georg Pauli, Robert Koch-Institut, Berlin
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Tag der Promotion: 29. 06. 2007

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Organmangel – die Suche nach Alternativen zur Allotransplantation	2
2.2 Xenotransplantation.....	3
2.2.1 Immunologische Hürden in der Xenotransplantation.....	5
2.2.2 Viren – ein Risiko bei der Xenotransplantation.....	6
2.3 Die Familie <i>Herpesviridae</i>	9
2.3.1 Struktur und Morphologie von Herpesviren	11
2.3.2 Der herpesvirale Vermehrungszyklus	13
2.4 Porzine lymphotrope Herpesviren (PLHV).....	15
2.4.1 Genomstruktur der PLHV.....	17
2.5 Herpesvirale Proteine der <i>immediate early</i> -Genexpression.....	21
2.5.1 <i>PLHV-1 ORF50</i>	21
2.5.1.1 ORF50-homologe Proteine in EBV und HHV-8	23
2.5.2 <i>PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h</i>	24
2.5.2.1 ORFA6/BZLF1 _h -homologe Proteine in EBV und HHV-8	26
2.5.3 <i>PLHV-1 ORF57</i>	28
2.5.3.1 Herpesvirale ORF57-homologe Proteine.....	29
2.6 Ziele der Arbeit	30
3. MATERIAL.....	32
3.1 Gewebe	32
3.2 Zellen.....	32
3.3 Bakterien.....	32
3.4 Nukleinsäuren.....	33
3.5 Enzyme, DNA-Marker und Antikörper.....	36
3.5.1 <i>Enzyme</i>	36
3.5.2 <i>Marker</i>	37
3.5.3 <i>Antikörper</i>	37
3.6 Vektoren	37
3.7 Reagenziensätze (Kits).....	37
3.8 Chemikalien und Biochemikalien.....	38
3.9 Puffer und Lösungen	39

3.10 Geräte und Laborhilfsmittel.....	44
3.11 Verbrauchsmaterialien.....	46
3.12 Software.....	46
4. METHODEN.....	47
4.1 Gentechnologische Methoden.....	47
4.1.1 <i>Präparation von Nukleinsäuren</i>	47
4.1.1.1 Extraktion von DNA aus Zellkulturzellen.....	47
4.1.1.2 Präparation von RNA aus Zellkulturzellen.....	47
4.1.1.3 Isolation von Plasmid-DNA.....	48
4.1.1.3.1 Minipräparation.....	48
4.1.1.3.2 Maxipräparation.....	49
4.1.2 <i>Hybridisierung</i>	50
4.1.3 <i>Reverse Transkription</i>	50
4.1.4 <i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i>	51
4.1.4.1 Nested-PCR.....	52
4.1.4.2 RACE-PCR.....	53
4.1.4.3 Real time-PCR.....	55
4.1.4.3.1 Standardisierung.....	56
4.1.4.3.2 Normalisierung.....	57
4.1.4.3.3 Detektion von PLHV-3 und EBV.....	58
4.1.4.3.4 Normalisierung und Auswertung der TaqMan-Daten.....	59
4.1.5 <i>Agarosegelelektrophorese</i>	60
4.1.6 <i>Aufreinigung von PCR-Fragmenten</i>	61
4.1.6.1 Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit.....	61
4.1.6.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	61
4.1.7 <i>Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren</i>	62
4.1.7.1 Messung der optischen Dichte mittels Absorptionsspektrometrie.....	62
4.1.7.2 Fluorimetrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	62
4.1.8 <i>Klonierung von PCR-Produkten</i>	62
4.1.8.1 DNA-Restriktion.....	63
4.1.8.2 Dephosphorylierung.....	64
4.1.8.3 DNA-Ligation.....	64
4.1.8.4 Transformation von Bakterien.....	65
4.1.8.5 Screening nach positiven <i>E. coli</i> -Klonen.....	65
4.1.9 <i>Herstellung von Expressionsplasmiden</i>	65
4.1.10 <i>Herstellung der Reportergenplasmide</i>	66
4.1.11 <i>Lagerung von E. coli-Kulturen</i>	67
4.1.12 <i>Sequenzierung von Plasmid-DNA</i>	67

4.2	Zellbiologische Methoden	68
4.2.1	<i>Kultivierung von Zellen</i>	68
4.2.1.1	Suspensionszellen.....	68
4.2.1.2	Adhärent wachsende Zellen	68
4.2.2	<i>Zellzählung</i>	69
4.2.3	<i>Lagerung von Zellen</i>	69
4.2.4	<i>Transfektion von eukaryotischen Zellen</i>	70
4.2.4.1	Transfektion mittels nicht-liposomaler Lipide (Effectene).....	70
4.2.4.2	Liposomenvermittelte Transfektion (GenePorter TM 2)	71
4.2.4.3	Transfektion mittels Elektroporation.....	72
4.2.5	<i>Kokultivierung von L23- und B95-8-Zellen</i>	74
4.2.6	<i>Durchflusszytometrie / FACS (fluorescence activated cell sorting)</i>	74
4.2.7	<i>Luziferase-Reportergen- und β-Galactosidaseassay</i>	75
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	77
4.3.1	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	77
4.3.1.1	Herstellung von Polyacrylamidgelen	77
4.3.1.2	Probenvorbereitung und Gelelektrophorese	78
4.3.2	<i>Westernblot</i>	79
4.3.2.1	Immunologische Detektion von Proteinen	79
4.3.3	<i>Koimmunpräzipitation (Ko-IP)</i>	80
4.3.4	<i>Immunfluoreszenz (IFA)</i>	82
4.3.5	<i>Konfokale Laser-Scanmikroskopie (cLSM)</i>	83
5.	ERGEBNISSE	84
5.1	Methodische Grundlagen.....	84
5.1.1	<i>Klonierung in Expressionsvektoren</i>	84
5.1.1.1	Konstruktion von ORF50-, ORFA6/BZLF1 _n - und ORF57-Expressions- plasmiden.....	84
5.1.1.2	Konstruktion von Plasmiden zur Expression von ORF50-, ORFA6/BZLF1 _n - und ORF57-Fusionsproteinen	86
5.1.2	<i>Klonierung in Luziferase-Reportergenvektoren</i>	88
5.1.2.1	Klonierung von PLHV-1-Promotoren	88
5.1.2.2	Klonierung von EBV-Promotoren	88
5.1.3	<i>Untersuchungen zur Transkription der Expressionsplasmide</i>	91

5.2 Versuchsergebnisse	93
5.2.1 <i>Expression der PLHV-1-Proteine ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57</i>	93
5.2.2 <i>Subzelluläre Lokalisation der PLHV-1-Proteine ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57</i>	95
5.2.3 <i>Untersuchung der Transkriptionsaktivität von PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57</i>	98
5.2.3.1 Vorversuche zur Optimierung des Luziferase-Reporterassay	98
5.2.3.1.1 Einfluss der Temperatur	98
5.2.3.1.2 Einfluss der Transfektionsreagenz	99
5.2.3.2 Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1 _h und ORF57	100
5.2.3.2.1 Transkriptionsaktivität von PLHV-1 ORF50	100
5.2.3.2.2 Transkriptionsaktivität von PLHV-1 ORFA6/BZLF1 _h	102
5.2.3.2.3 Transkriptionsaktivität von PLHV-1 ORF57	105
5.2.4 <i>Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h</i>	106
5.2.4.1 Induktion der PLHV-1-Promotoraktivität durch ORF50 und ORFA6/BZLF1 _h in 293-Graham-Zellen	106
5.2.4.2 Induktion der PLHV-1-Promotoraktivität durch ORF50 und ORFA6/BZLF1 _h in PK15-Zellen	108
5.2.5 <i>Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORF57</i>	111
5.2.5.1 Induktion der PLHV-1-Promotoraktivität durch ORF50 und ORF57 in 293-Graham-Zellen	111
5.2.5.2 Induktion der PLHV-1-Promotoraktivität durch ORF50 und ORF57 in PK15-Zellen	113
5.2.6 <i>Interaktionsstudien zwischen den PLHV-1-Proteinen</i>	116
5.2.6.1 Versuche zur Interaktion zwischen ORF50 und ORFA6/BZLF1 _h	116
5.2.6.2 Versuche zur Interaktion zwischen ORF50 und ORF57.....	118
5.2.7 <i>Untersuchungen zur molekularen Wechselwirkung zwischen humanen und porzinen γ-Herpesviren</i>	120
5.2.7.1 Aktivierung von EBV-Promotoren durch EBV BRLF1 und BZLF1	121
5.2.7.2 Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch EBV BRLF1 und BZLF1	122
5.2.7.3 Aktivierung von EBV-Promotoren durch PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1 _h	125
5.2.8 <i>Versuche zur Reaktivierung von PLHV-3 und EBV</i>	127
5.2.8.1 Optimierung der Elektroporation von B-Zellen	127
5.2.8.1.1 Optimierung der Elektroporation von L23-Zellen.....	128

5.2.8.1.2	Optimierung der Elektroporation von B95-8-Zellen	131
5.2.8.2	Versuche zur Reaktivierung von EBV	134
5.2.8.3	Versuche zur Reaktivierung von PLHV-3	137
5.2.8.4	Versuche zur Virusreaktivierung mittels Kokultivierung	140
6.	DISKUSSION	142
6.1	Auswahl der Regulatorproteine und Promotoren	142
6.2	Prüfung der Funktionalität der ausgewählten PLHV-1-Regulatoren	143
6.3	Transkriptionsaktivität von PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1 _h und ORF57	145
6.4	PLHV-1 Promotoraktivität bei Koexpression von ORF50 und ORFA6/BZLF1 _h	148
6.5	PLHV-1 Promotoraktivität bei Koexpression von ORF50 und ORF57 ..	150
6.6	Interaktion zwischen PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1 _h	152
6.7	Interaktion zwischen PLHV-1 ORF50 und ORF57	153
6.8	Induktion der EBV-Promotoraktivität im homologen System	154
6.9	Induktion der EBV-Promotoraktivität durch PLHV-1-Proteine	155
6.10	Induktion der EBV-Promotoraktivität durch EBV-Proteine	155
6.11	Reaktivierung von Herpesviren	156
6.11.1	<i>Reaktivierung des lytischen Infektionszyklus von EBV</i>	157
6.11.2	<i>Reaktivierung des lytischen Infektionszyklus von PLHV-3</i>	161
6.11.3	<i>Virusreaktivierung mittels Kokultivierung</i>	162
6.12	Ausblick	163
7.	ZUSAMMENFASSUNG	165
8.	SUMMARY	167
9.	ANHANG	169
9.1	Abkürzungsverzeichnis	169
9.2	Abbildungsverzeichnis	173
9.3	Tabellenverzeichnis	175
10.	LITERATURVERZEICHNIS	177
	DANKSAGUNG	195
	LEBENS LAUF	196
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	197

1. Einleitung

In der Transplantationsmedizin besteht seit langem ein stetig wachsender Mangel an zur Verfügung stehender Spenderorgane, der dazu führt, dass viele Menschen auf der Warteliste versterben, bevor sie ein geeignetes Organ erhalten können. Eine viel versprechende Alternative ist die Xenotransplantation, bei der tierische Zellen, Gewebe oder Organe auf den Menschen übertragen werden. Als potentieller Organspender wird vor allem das Schwein favorisiert. Neben immunologischen Hürden wie verschiedenen Abstoßungsreaktionen und der möglichen physiologischen Inkompatibilität des transplantierten Organs besteht die Gefahr der Übertragung von bekannten und unbekanntem Mikroorganismen der Spendertiere auf den Menschen. Während Bakterien und Pilze durch Verabreichung von Antibiotika bzw. Antimykotika und durch spezifisch pathogenfreie (SPF) Zuchtbedingungen aus den Schweineherden in der Regel eliminiert werden können, lassen sich einige Viren nur schwer beseitigen. Vor allem die Herpesviren gelten als problematisch, da sie im Wirt lebenslang symptomlos persistieren und unter bestimmten Bedingungen reaktiviert werden können. Schon in der Allotransplantation kann die Reaktivierung von Herpesviren wie z.B. humanes Cytomegalievirus (HCMV), Epstein-Barr-Virus (EBV) oder Humanes Herpesvirus Typ-8 (HHV-8) unter Immunsuppression zu großen Komplikationen beim Patienten führen. EBV verursacht bei medikamentös immunsupprimierten Transplantatempfängern die „Posttransplantation lymphoproliferative disease“ (PTLD), eine häufig letale Erkrankung. Eine ähnliche, lymphoproliferative Erkrankung wurde in experimentell immunsupprimierten Schweinen beobachtet. Sie ist eng mit dem porzinen lymphotropen Herpesvirus Typ-1 (PLHV-1) assoziiert, eines von drei vor kurzem entdeckten, lymphotropen Herpesviren des Schweins. Einige Herpesviren sind in ihren natürlichen Wirten apathogen und können jedoch bei Spezieswechsel schwere Erkrankungen hervorrufen. Bei einer Transplantation von porzinen Organen auf den Menschen bestünde daher die Gefahr der Übertragung von PLHV, mit schwer einschätzbaren Folgen. Zur Abschätzung des Gefährdungspotentials durch diese porzinen Herpesviren sollte PLHV-1 molekular und funktional näher charakterisiert werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Organmangel - die Suche nach Alternativen zur Allotransplantation

Die Organtransplantation ist heute ein etabliertes Behandlungsverfahren der Medizin. Allein in Deutschland wurden im Jahr 2005 ca. 4000 Organverpflanzungen vorgenommen. Dabei liegt die Erfolgsrate der verschiedenen Transplantationen zwischen 75-90%. Leider kann der ständig wachsende Bedarf an menschlichen Spenderorganen nicht gedeckt werden, obwohl die Bereitschaft zur Lebendspende z.B. von Nieren in den letzten Jahren zugenommen hat. 2005 warteten in Deutschland beispielsweise ca. 9000 Patienten auf eine Niere, es konnten allerdings nur ca. 2000 Patienten tatsächlich ein Transplantat erhalten (Abb. 1). Während Nierenkranke mit Hilfe der Dialyse die Zeit bis zur Transplantation überbrücken können, ist die Situation für Patienten, die auf eine Herz-, Leber- oder Lungentransplantation warten, deutlich kritischer. Aufgrund fehlender lebenserhaltender Maßnahmen versterben ca. ein Drittel dieser Patienten auf der Warteliste, bevor ein geeignetes Transplantat zur Verfügung steht. Um den Mangel an menschlichen Organen zu kompensieren, wird intensiv nach Alternativen zur Allotransplantation gesucht. Die Möglichkeit der Gewinnung komplexer, vaskularisierter Organe aus Stammzellen (Malchesky, 2004) wird in naher Zukunft wohl kaum klinische Realität werden können.

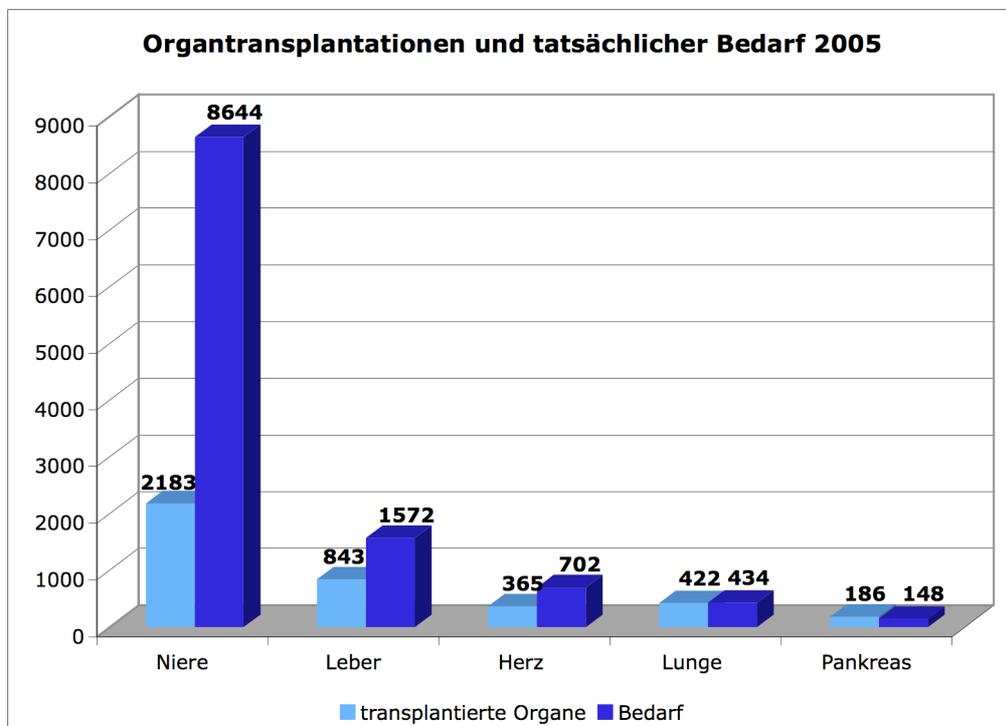


Abb. 1 Darstellung der durchgeführten Organtransplantationen in Deutschland im Vergleich zum tatsächlichen Bedarf.

Quelle: Eurotransplant <http://www.eurotransplant.nl/>

Neben dem Tissue-Engineering (Tanczos et al., 1999), der Anzucht von Geweben und Organen auf einer artifiziellen Matrix, wird die Xenotransplantation als mögliche Alternative favorisiert.

2.2 Xenotransplantation

Bei der Xenotransplantation (XT; xenos (griech.) = fremd) werden Zellen, Gewebe bzw. Organe von einer Spezies auf eine andere übertragen. In Erweiterung der Definition wird auch der *ex vivo* Kontakt von Körperflüssigkeiten, Zellen, Geweben und Organen einer Spezies mit denen einer anderen Spezies als XT bezeichnet. Die Idee, Organe von Tieren zu verpflanzen ist nicht neu, und die ersten Bluttransfusionen vom Tier auf den Menschen reichen bis ins 17. Jahrhundert zurück (Deschamps et al., 2005). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden dann die ersten Transplantationen von tierischen Geweben auf den Menschen durchgeführt. 1905 pflanzte Princeteau (Princeteau, 1905) in Paris einem an Urämie leidenden Mädchen Teile von Kaninchennieren ein. 1909 übertrug Ernst Unger (Unger, 1910) in Berlin die Niere eines Rhesusaffen. 1923 transplantierte Harold Neuhof (Neuhof, 1923) in New York die Niere eines Schafs. Aufgrund der hyperakuten Abstoßungsreaktion bzw. der Unfunktionalität des transplantierten Organs war keine dieser Operationen erfolgreich. Erst durch die Entwicklung von Immunsuppressiva wie den Thiopurinen in den 60er Jahren wurden erste Erfolge in der Transplantationsmedizin erreicht. 1963 verpflanzte Keith Reemtsma (Reemtsma, 1964) die Niere eines Schimpansen unter erstmaliger Verwendung von Immunsuppressiva. Die Patientin überlebte neun Monate. Die Entwicklung von Cyclosporin A, das aus dem Bodenpilz *Tolypocladium inflatum* isoliert wurde, führte in den 80er Jahren zu weiteren Erfolgen. Leonard Bailey (Bailey et al., 1985) übertrug 1984 das Herz eines Pavians auf einen 12 Tage alten Säugling, genannt „Baby Fae“, der 20 Tage nach der Operation an den Folgen von Abstoßungsreaktionen verstarb. Im Gegensatz zur Übertragung von Organen ist die Transplantation von Zellen und Zellverbänden wesentlich erfolgreicher. Zur Überbrückung lebensbedrohender Situationen bei Patienten mit Nieren- oder Leberversagen werden extrakorporale Unterstützungssysteme mit porzinen Zellen bereits erfolgreich genutzt. Dabei wird das Blut des Patienten durch einen Bioreaktor geleitet, in dem metabolisch aktive Schweineleberzellen die Leberfunktion übernehmen (Kamohara et al., 1998; Boneva et al., 2001). Die Transplantation von porzinen, embryonalen Nervenzellen in das Gehirn von Parkinson-Kranken führte zu einer deutlichen Linderung der durch Dopamin-Mangel ausgelösten Symptome (Deacon et al., 1997). Zur Behandlung von Diabetes wurden porzine Inselzellen des Pankreas erfolgreich implantiert (Groth et al., 1998). Ein weiterer Ansatz besteht in der Verkapselung von porzinen Langerhansinseln mit Alginaten, wodurch die Bindung von Antikörpern unterdrückt wird und die Gabe von Immunsuppressiva deutlich eingeschränkt wird (Aebischer et al., 1996).

Die Implantation von Herzklappen des Schweins in den Menschen und die Verwendung von Schweinehaut bei Verbrennungen sind schon seit längerem gängige Verfahren.

Aufgrund der nahen Verwandtschaft zum Menschen wurden zunächst nicht-humane Primaten wie z.B. Schimpansen als Organspender in Betracht gezogen, da sie in Bezug auf den Menschen eine hohe Kompatibilität in der Anatomie und Physiologie ihrer Organe erwarten ließen. Eine Transplantation zwischen phylogenetisch nah verwandten (konkordanten) Spezies führt zu einer weniger heftigen Transplantatabstoßung, die durch die Entwicklung effektiverer Immunsuppressiva kontrolliert werden könnte. Primaten zeichnen sich allerdings durch eine lange Gestationszeit und geringe Nachkommenschaft aus, so dass nicht genügend Spendertiere zur Verfügung stehen würden (Fishman, 1994). Neben der kostenintensiven Haltung sind viele Primaten vom Aussterben bedroht und daher geschützt. Aufgrund der engen genetischen Verwandtschaft besteht außerdem ein erhebliches Infektionsrisiko für den Menschen (Allan, 1998; Denner, 2000). So verliefen Infektionen des Menschen mit Ebola Virus, Marburg Virus oder dem Simianen Herpesvirus B mit hoher Mortalität (Smith et al., 1967; Johnson et al., 1996). Ein weiteres Beispiel für eine Transspeziesübertragung vom Affen auf den Menschen ist das Simiane Immundefizienzvirus (SIV), das sich nach Adaptation im Menschen zum humanen Immundefizienzvirus (HIV) entwickelte (Gao et al., 1999).

Als Alternative zu den nicht-humanen Primaten wurde deshalb das Schwein als Organspender favorisiert (Sachs, 1994; Auchincloss & Sachs, 1998). Schweine lassen sich kostengünstig züchten, werden früh geschlechtsreif, haben eine hohe Reproduktionsrate und ihre Organe ähneln denen des Menschen in Größe, Anatomie und Funktionalität. Zudem werden Schweine als Organspender in der Bevölkerung ethisch erheblich besser akzeptiert, da sie schon lange als Nutztiere etabliert sind. Die seit Jahrtausenden bestehende enge Koexistenz von Mensch und Schwein könnte dafür sprechen, dass Schweine als Organspender ein geringeres Infektionsrisiko darstellen als nicht-humane Primaten. Dennoch könnte die Verpflanzung von horizontal liegenden, porzinen Organen in die Vertikallage im Menschen zu Beeinträchtigungen in der Funktionalität des Organs führen. Das unterschiedliche Altern von Tier und Mensch, die unterschiedliche Stoffwechselphysiologie z.B. von Leber und Niere oder die Synthese von porzinen Proteinen, die im menschlichen Organismus nicht physiologisch wirken, sind zudem als problematisch zu bewerten (Soin et al., 2001; Hammer & Thein, 2002).

Die XT bietet einige unbestreitbare Vorteile, wie die unbegrenzte Verfügbarkeit von Organen und die damit verbundene Verkürzung der Wartezeiten. Dies würde eine kontrollierbare Planung der Operation erlauben, indem der Patient gezielt auf das Transplantat vorbereitet wird. Schließlich bietet die XT die Chance, den illegalen Handel mit menschlichen Organen zu mindern.

2.2.1 Immunologische Hürden in der Xenotransplantation

Die größten Hürden in der XT bestehen in der bisher nicht kontrollierbaren Abstoßungsreaktion des Transplantates, der physiologischen Inkompatibilität des Transplantates und der Gefahr der Übertragung von Mikroorganismen. Die Abstoßung des Xenotransplantates ist umso stärker, je größer die phylogenetische Entfernung zwischen dem Spendertier und dem humanen Rezipienten ist. Alle Säuger außer Menschen und Primaten besitzen auf der Endotheloberfläche das Zuckerepitop Galactose- α -1,3-Galactose (Gal- α -1,3-Gal). Die hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR) beginnt bereits Minuten bis Stunden nach der Transplantation und beruht auf der Reaktion präformierter, xenoreaktiver Antikörper gegen Gal- α -1,3-Gal auf dem Gefäßendothel des porzinen Transplantates (Beckmann, 2000). Durch die Antikörperreaktion sowie durch die Aktivierung des Komplementsystems kommt es zu Schädigungen des endothelialen Gewebes der Blutgefäße im Xenotransplantat und damit letztendlich zu dessen Abstoßung. Um die HAR zu umgehen, wurden verschiedene Strategien entwickelt. Durch Verwendung von porzinen Oligosacchariden, die Antikörper gegen Gal- α -1,3-Gal binden, versucht man deren Zytotoxizität zu vermindern (Li et al., 1996). In einem anderen Ansatz wurden die präformierten Antikörper durch Plasmapherese aus dem Serum entfernt (Brenner et al., 2000). Mit der Zucht von transgenen Schweinen, in denen das Gen für das Enzym α -1,3-Galactosyltransferase ausgeschaltet ist, konnte die HAR deutlich unterdrückt werden, da keine Expression von Gal- α -1,3-Gal auf der Endotheloberfläche erfolgte (Lai et al., 2002; Phelps et al., 2003). Die Abstoßungsreaktion bei der XT wird außerdem durch die physiologische Inkompatibilität zwischen den Spezies verstärkt, da die Komplementkaskade normalerweise durch artspezifische Komplement-Regulatorproteine reguliert wird. So kommt es, im Gegensatz zu Primaten als Organspender (konkordante XT), bei der Verwendung von porzinen Organen in der Xenotransplantation (diskordante XT) zu einer Zerstörung des Transplantates innerhalb weniger Minuten. Zur Inhibierung der Komplementkaskade wurden transgene Schweine gezüchtet, die humane Komplement-regulierende Faktoren wie z.B. hDAF (*decay-accelerating factor*, CD55; Schmoeckel et al., 1997; Lavitrano et al., 2002), MCP (*Membran-Cofaktor-Protein*, CD46) oder Protectin (CD59; Byrne et al., 1997; Costa et al., 2002) auf den Endothelzellen exprimieren. Bei Transplantation solcher porziner Organe in Primaten konnte die HAR verzögert werden (Cozzi et al., 2000; Schuurman et al., 2002). Der Nutzen dieser genetischen Veränderung ist jedoch umstritten, da die Moleküle CD55 und CD46 auch als zelluläre Rezeptoren für Masern- und Morbilliviren bzw. Echo- und Coxsackie B-Viren dienen (Bergelson et al., 1994; Shafren et al., 1995). Dadurch könnten CD46- und CD55-transgene Schweine empfänglich für diese humanen Erreger werden. Es besteht damit die Möglichkeit, dass virale Zoonosen eher in Folge einer XT von Geweben transgener als von unmodifizierten Schweinen auftreten. Trotz großer Fortschritte in der

Überwindung der HAR treten in Folge weitere Abstoßungsreaktionen auf, die noch nicht vollständig verstanden sind. Dazu gehören die akute, vaskuläre Abstoßung, die T-Zell-vermittelte Abstoßung und die chronische Abstoßung (Logan, 2000; Dooldeniya & Warrens, 2003).

2.2.2 Viren - ein Risiko bei der Xenotransplantation

Neben den immunologischen Hürden bei der Transplantation porziner Organe besteht das Risiko der Übertragung von bekannten und unbekannt pathogenen Erregern auf den menschlichen Transplantatempfänger und deren Adaptation an humane Zellen (Gunzburg & Salmons, 2000; Boneva & Folks, 2004; Fishman & Patience, 2004). Damit besteht die Gefahr der Entstehung von Xenozoonosen (Michaels & Simmons, 1994; Onions et al., 2000; Ludwig et al., 2003). Das Risiko einer Übertragung kann zum einen durch die Verabreichung von Immunsuppressiva (Cyclosporin, Cyclophosphamid, Prednisolon etc.) erhöht sein, da so die Immunabwehr von Krankheitserregern eingeschränkt ist und es in Folge zu einer Reaktivierung und Replikation von pathogenen Mikroorganismen kommen kann. Zum anderen werden unter den Bedingungen der XT die Organe und Gewebe unter Umgehung mukosaler o.a. antimikrobieller Abwehrmechanismen direkt in den Menschen eingeführt. Das Übertragungsrisiko für Mikroorganismen kann jedoch durch spezifiziert und qualifiziert pathogenfreie (SPF) Zuchtbedingungen der Spendertiere und durch die Anwendung von Antibiotika, Antimykotika und Impfstoffen reduziert werden (Fishman, 1998). Die Aufzucht und Haltung der Spendertiere erfolgt dabei unter hohen Hygienestandards, wie die Geburt der Nachkommen durch Kaiserschnitt und die Trennung der Ferkel von der Mutter durch Barrierehaltung. Die meisten porzinen nicht-viralen und viralen Erreger können durch diese Vorsorgemaßnahmen eliminiert werden. Viren, deren Genom sich in das Erbmaterial der Wirtszelle integriert (z.B. Retroviren) oder solche, die lebenslang im Wirt latent persistieren (z.B. Herpesviren), lassen sich allerdings nur schwer durch Impfung oder durch genetische Knock-out-Technologien eliminieren. Retroviren können zu Tumor- und/oder Immunschwächeerkrankungen führen. Beim Schwein wurden bisher drei Klassen der porzinen endogenen Retroviren (PERV-A, PERV-B, PERV-C) identifiziert, die im Schweinegenom integriert vorliegen (Patience et al., 2001). Die Infektion von humanen Zellen durch PERV und deren erfolgreiche Replikation in diesen Zellen birgt das Risiko der Übertragung von PERV auf den Xenotransplantatempfänger (Patience et al., 1997; Specke et al., 2001). Die Untersuchung von Patienten, die entweder Nervenzellen zur Behandlung von Parkinson oder porzine Pankreaszellen zur Behandlung von Diabetes erhielten, zeigten allerdings keine Anzeichen einer PERV-Infektion (Patience et al., 1998; Paradis et al., 1999; Irgang et al., 2003).

Einige der porzinen Virusinfektionen sind zoonotisch, wie das jüngst beschriebene Nipah-Virus des Schweins (Meng et al., 1998; Farrar, 1999). Schweine stellen in Kontakt mit Vögeln ein Reservoir für Influzaviren dar, die durch Neuordnung ihres Genoms zur Entstehung neuer Virusstämme führen. Die Influenza-Pandemie von 1918 mit 20 Mio. Todesopfern geht mit großer Wahrscheinlichkeit auf den Vogel-Influenza-Virus Subtyp H1N1 zurück (Taubenberger et al., 1997). Auch andere porzine Viren, wie z.B. das porzine Hepatitis E Virus (Meng et al., 1997), das porzine Cytomegalievirus (Clark et al., 2003) oder die porzinen Circoviren Typ-1 und Typ-2 (Mankertz et al., 1997, 2000) stellen mögliche Risiken für eine Zoonose dar.

Herpesviren können in ihrem Wirt lebenslang persistieren und unter bestimmten Bedingungen reaktiviert werden. In der Allotransplantation kann die Übertragung und Reaktivierung von Herpesviren wie z.B. HCMV, Humanes Herpesvirus Typ-6 (HHV-6), Humanes Herpesvirus Typ-7 (HHV-7), EBV und HHV-8 unter Immunsuppression zu großen Komplikationen führen, da diese Erreger zur Entwicklung lebensbedrohender, opportunistischer Infektionen wie z.B. Hepatitis, Lungen- und Hirnhautentzündung beitragen können (Feranchak et al., 1998; Griffiths et al., 1999; Tolkoff-Rubin, 1998; Kotton & Fishman, 2005). Besonders gefürchtet ist HCMV, das bei ca. 80% der Transplantatempfänger übertragen wird und unter bestimmten Voraussetzungen zu Grippe- und Mononukleose-ähnlichen Erkrankungen, Gastritis, Ösophagitis oder Leukopenie sowie Transplantatabstoßung führen kann (Reinke et al., 1999). Die EBV-assoziierte *post-transplantation lymphoproliferative disease* (PTLD) tritt nach der Allotransplantation bei ca. 10% der Transplantatempfänger auf, häufig mit tödlichem Verlauf (Ferry et al., 1998). Ein vermehrtes Auftreten des HHV-8-assoziierten Kaposi Sarkoms wurde in ca. 5% der Transplantatempfänger beobachtet (Singh, 2000; Vieira et al., 2001). Zudem ist bekannt, dass Herpesviren, die beim natürlichen Wirt apathogen sind, bei Spezieswechsel ein hohes pathogenes Potential entwickeln können (Tab.1; Reid & Buxton, 1989; Fleckenstein & Desrosiers, 1982). Das Herpes B Virus verursacht in seinem Hauptwirt, dem Rhesusaffen eine asymptomatisch verlaufende Infektion, führt jedoch bei Infektion des Menschen zu einer schweren Enzephalitis mit letalem Ausgang (Holmes et al., 1995).

Bei Koinfektionen mit Herpesviruspezies kann es zur Reaktivierung der Viren durch gegenseitige Stimulation kommen. Außerdem könnten durch Rekombinationsereignisse neue Viruspezies entstehen. So ist vorstellbar, dass die porzinen Herpesviren mit verwandten humanen Herpesviren wie EBV, HHV-6, HHV-7 oder HCMV, die eine hohe Prävalenz in der menschlichen Bevölkerung haben, rekombinieren und Viren mit neuen Eigenschaften hervorbringen. Virale Koinfektionen können das Krankheitsbild modulieren, die Pathogenität der Viren verstärken und zu einer gesteigerten, kumulativen Immunsuppression im Wirt führen (Singh, 2005). HHV-6, ein Vertreter der humanen

β -Herpesviren, führt beispielsweise durch Induktion der Expression des EBV BZLF1-Proteins zur Reaktivierung von EBV, einem γ -Herpesvirus (Flamand et al., 1993). Infolge wurde in immunsupprimierten Patienten verstärkt das Auftreten von EBV-positiven *non-Hodgkin*-Lymphomen beobachtet (Hanto et al., 1985). HHV-6 induziert außerdem den lytischen Infektionszyklus von HHV-8 und scheint ein wichtiger Kofaktor bei der Entwicklung des Kaposi Sarkoms zu sein (Lu et al., 2005). Das humane CMV führt ebenfalls zur Stimulation der HHV-8-Replikation und beeinflusst damit die HHV-8-assoziierte Pathogenese maßgeblich (Vieira et al., 2001). Innerhalb der β -Herpesviren induziert HHV-6 den lytischen Vermehrungszyklus von HCMV, was zu einem Funktionsverlust und zu einer vorzeitigen Abstoßung des transplantierten Organs führen kann (Ljungman et al., 2002). Die Interaktion von HCMV mit HHV-6 beeinflusst außerdem die Infektiosität der Virionen und den Krankheitsverlauf.

Tabelle 1: Transspeziesübertragungen bei Herpesviren

Subfamilie	Spezies	Natürlicher Wirt	Erkrankung/ Infektionsverlauf im natürlichen Wirt	Fremdwirt	Erkrankung/ Infektionsverlauf im Fremdwirt
α -Herpesviren	Herpes B Virus	Rhesusaffe	apathogen	Mensch	Enzephalitis, fatal
	Herpes-Simplex-Virus	Mensch	Hautaffektionen	Gibbon	Enzephalitis, fatal
	Pseudorabiesvirus	Schwein	Aujezky'sche Krankheit	Rind, Hund, Katze,	Enzephalitis, fatal Aujezky'sche Krankheit
β -Herpesviren	Elefantenherpesvirus	Afrikanischer Elefant	apathogen	Asiatischer Elefant	Systemische Hämorrhagien, fatal
γ -Herpesviren	Epstein-Barr-Virus	Mensch	Infektiöse Mononukleose, Lymphome, maligne	Krallenaaffe, Eulenaaffe	Lymphom, maligne
	Herpesvirus saimiri	Totenkopfaaffe	apathogen	Grüne Meerkatze, Krallenaaffe, Eulenaaffe	T-Zell-Lymphom, maligne
	Ovines Herpesvirus Typ-2	Schaf	apathogen	Rind, Schwein	Bösartiges Katarrhalfieber, fatal
	Alcephalines Herpesvirus Typ-1	Gnu	apathogen	Rind	Bösartiges Katarrhalfieber, fatal

Die Bildung von Komplexen zwischen den Glykoproteinen gH und gL von HCMV und HHV-6 spielt eine große Rolle in der Virus-induzierten Zellfusion und fördert die Ausbreitung der Viren von Zelle zu Zelle durch die Bildung von Syncytien (Anderson et al., 1996; Campadelli-Fiume et al., 1999). Virusreaktivierungen treten nicht nur zwischen Herpesviren auf, sondern betreffen auch Vertreter unterschiedlicher Virusfamilien. Hepatitis C Virus (HCV)-infizierte Lebertransplantatempfänger trugen beispielsweise ein größeres Risiko für die Entstehung einer Fibrose und Zirrhose, wenn eine Koinfektion mit HCMV vorlag (Burak et al., 2002; Razonable et al., 2002). Herpesviren scheinen allgemein die Replikation von HIV zu modulieren, in dem sie den *HIV long terminal repeat* (LTR) transaktivieren (Davis et al., 1987; Mosca et al., 1987; Caselli et al., 2001). Die Aktivierung des HIV LTR wurde für EBV BRLF1 gezeigt (Quinlivan et al., 1990). Während HHV-6 die HIV-Infektion beschleunigt (Knox & Carrigan 1992), induziert HHV-8 die HIV-Replikation *in vitro* und *in vivo* (Mercader et al., 2001; Caselli et al., 2005). Umgekehrt stimuliert HIV den lytischen Infektionszyklus von HHV-8, indem es die Expression von HHV-8 ORF50 stimuliert (Varthakavi et al., 1999, 2002). Daher wird HIV als wichtiger Kofaktor bei der Entwicklung des Kaposi Sarkoms diskutiert (Varthakavi et al., 2002).

2.3 Die Familie Herpesviridae

Der Name Herpesvirus leitet sich vom griechischen Wort *herpein* „kriechen“ ab und weist auf die kriechende Ausbreitung des durch das Herpes-Simplex-Virus verursachten Hautausschlages hin. Die Gruppe der Herpesviren gehört mit über 100 Spezies zu den größten Virusfamilien. Ihr Wirtsspektrum umfasst die unterschiedlichsten Wirbeltiergruppen, von Fischen, Fröschen und Katzen bis hin zu den Affen und Menschen. Die Familie der *Herpesviridae* unterteilt sich in drei Subfamilien, die sich in ihrer Pathogenität, dem Zelltyp, den sie infizieren, und ihren Vermehrungseigenschaften sowie ihrer Phylogenie unterscheiden. Die α -Herpesviren infizieren ein breites Spektrum von Zellen, vermehren sich *in vitro* mit kurzen Replikationszeiten und zeigen eine schnelle Ausbreitung in der Zellkultur. Vertreter dieser humanen α -Herpesviren sind die Herpes-Simplex-Viren HSV-1 und -2, sowie das Varizella-Zoster-Virus (VZV), die in den Nervenzellen persistieren und einen blässchenartigen Hautausschlag verursachen (Tab. 2). VZV verursacht als Erstmanifestation die Windpocken und kann nach Reaktivierung zur Entwicklung einer Gürtelrose führen. Die β -Herpesviren, wie z.B. HHV-6, HHV-7 und HCMV besitzen ein enges Spektrum an infizierbaren Zellen, die in der Zellkultur deutlich vergrößert erscheinen. Die Vermehrung und Ausbreitung *in vitro* erfolgt nur langsam. HHV-6 ist die infektiöse Ursache des Drei-Tage-Fiebers bei Kleinkindern. Nach dem Fieber tritt außerdem ein feinfleckiges Exanthem im Bereich des Nackens auf, das sich auf Gesicht und Extremitäten weiter ausbreiten kann. Bei Organrezipienten kann eine HHV-6 Reaktivierung Pneumonien sowie Enzephalitiden zur

Folge haben (Knox & Carrigan, 1994; Gentile, 2000; MacLean & Douen, 2002). HHV-7 ist ebenso wie HHV-6 in der Bevölkerung weit verbreitet und kann ebenfalls das Drei-Tage-Fieber und *Exanthema subitum* bei Kindern verursachen. HCMV verursacht beim Menschen die Zytomegalie. Prä- oder perinatale HCMV-Infektionen können zu Schädigungen der Embryonen oder neugeborener Kinder führen. Ca. 10% der pränatal infizierten Kinder entwickeln die *Cytomegale Einschlusskörperchenkrankheit*, die sich in Thrombocytopenie, Hörschäden und Entwicklungsdefekten aufgrund der Infektion des zentralen Nervensystems äußert (Modrow, 2003). Unter Immunsuppression kann eine HCMV-Infektion zu schweren Komplikationen im Transplantatempfänger führen (Tab. 2). Die Symptome reichen von Grippe- bzw. Mononukleose-ähnlichen Erkrankungen bis hin zu Pneumonien, Hepatitis, Retinitis, Gastritis bzw. Enzephalitis oder auch zur Abstoßung des Transplantates (Reinke et al., 1999). HCMV wird als wichtigste, infektiöse Ursache für die Morbidität und Mortalität nach einer Allotransplantation gesehen.

Die γ -Herpesviren zeichnen sich durch ein sehr enges Wirtszellspektrum mit unterschiedlichen Replikationszyklen aus und persistieren lebenslang entweder in B- oder T-Lymphocyten.

Tabelle 2: Humane Herpesviren und ihre Erkrankungen

Subfamilie	Spezies	Erkrankung im Menschen
α -Herpesviren	Herpes-Simplex-Typ-1 (HSV-1)	Herpes labiales; Herpesinfektion im Bereich der Lippen; selten Enzephalitis
	Herpes-Simplex-Typ-2 (HSV-2)	Herpes genitalis; Herpesinfektion im Bereich der Geschlechtsorgane
	Varizella-Zoster-Virus (VZV)	Herpes zoster; Windpocken (Primärinfektion), Gürtelrose (Sekundärinfektion); selten Enzephalitis
β -Herpesviren	Humanes Zytomegalievirus (HCMV)	Zytomegalie (Speicheldrüsenerkrankung); CMV-Pneumonie, CMV-Sialoadenitis, Kolitis pränatal: Cytomegale Einschlusskörperchenkrankheit (zerebrale Schäden, Augendefekte, Taubheit)
	Humanes Herpesvirus Typ-6 (HHV-6)	Drei-Tage-Fieber, Exanthema subitum bei Kindern; Pneumonien, Enzephalitis
	Humanes Herpesvirus Typ-7 (HHV-7)	Drei-Tage-Fieber, Exanthema subitum bei Kindern; Infektiöse Mononukleose u. ähnliche Erkrankungen
γ -Herpesviren	Epstein-Barr-Virus (EBV)	Infektiöse Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber), Hodgkin-Lymphom, Non-Hodgkin-Lymphome (u.a. Burkitt-Lymphom), Nasopharynxkarzinom, PTLD
	Humanes Herpesvirus Typ-8 (HHV-8)	Kaposi Sarkom, primäres Effusionslymphom, Castelman'sche Erkrankung

Die lytische Infektion verläuft in Epithel- oder Fibroblastenzellen. γ -Herpesviren besitzen ein onkogenes Potential und sind häufig mit Tumorerkrankungen assoziiert (Reid & Buxton, 1989; Knecht et al., 1997; Whitby & Boshoff, 1998). EBV ist der Erreger der infektiösen Mononukleose (Niedobitek et al., 1997) und ist an der Entstehung einiger Tumorerkrankungen in Afrika und Asien ursächlich beteiligt, wie z.B. dem Burkitt-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom und dem Nasopharynxkarzinom (Epstein et al., 1964; Herbst, 1996; Raab-Traub, 1987). In Transplantationspatienten kann unter Immunsuppression eine lymphoproliferative Erkrankung (*posttransplantation lymphoproliferative disease*, PTL) auftreten, die bei ca. 50% der Erkrankten zum Tode führt (Hsieh et al., 1999; Huang et al., 2001). Die PTLD äußert sich durch eine Expansion der B-Lymphozyten, die von einer polymorphen Proliferation bis hin zu einem monoklonalen Lymphom reichen kann (Hopwood & Crawford, 2000). 90-95% der proliferierenden B-Lymphozyten sind EBV-positiv (Huang et al., 2001; McInnes et al., 2002). Die Pathogenese der EBV-assoziierten B-Zell-Tumoren nach der Transplantation ist bislang nur unzureichend geklärt. Vermutlich ermöglicht ein Mangel an zytotoxischen T-Zellen die Proliferation transformierter Lymphozyten (Quaia et al., 2000). Ein weiterer Vertreter der humanen γ -Herpesviren ist HHV-8 oder KSHV (Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus), das infektiöse Agens des Kaposi Sarkoms (Schulz, 2000; Verma & Robertson, 2003). Das Kaposi Sarkom ist eine vor allem bei AIDS-Patienten auftretende Krebserkrankung der Haut und mit Abstand der häufigste Krebs in Afrika (Chang et al., 1994). Bei Transplantationen besteht außerdem ein erhöhtes Erkrankungsrisiko aufgrund der Verabreichung von Immunsuppressiva. Außerdem ist HHV-8 an der Entstehung weiterer Karzinome wie dem primären Effusionslymphom (*primary effusion lymphoma*) und der Castleman'schen Erkrankung (*multicentric Castleman's disease*) beteiligt (Soulier et al., 1995; Cesarman et al., 1995).

Tierpathogene Herpesviren verursachen zum Teil schwere und wirtschaftlich bedeutende Infektionskrankheiten. Dazu zählen z.B. die equinen Herpesviren Typ 1-5 (EHV-1 bis EHV-5), die bovinen Herpesviren Typ 1-2 (BoHV-1 bis BoHV-2) und das Pseudorabiesvirus (PRV) des Schweins. Beim Geflügel sind das Infektiöse-Laryngotracheitis-Virus (ILT) und das Marek-Disease-Virus (MDV) zu nennen.

2.3.1 Struktur und Morphologie von Herpesviren

Herpesviren sind behüllte DNA-Viren mit einem Durchmesser von 150-200 nm. Das ikosaedrische Kapsid mit einem Durchmesser von 100 nm besteht aus 162 Capsomeren und umschließt das Virus-Core (Abb. 2). Darin liegt das doppelsträngige, lineare DNA-Molekül mit einem Molekulargewicht von 120-230 kbp assoziiert an eine fibrilläre Proteinmatrix vor. Die Varianz im Molekulargewicht wird teilweise durch eine unterschiedliche Anzahl von Sequenzwiederholungen (*repeats*) bestimmt, die sich innerhalb des Genoms (*IR=internal*

repeat) oder an den Genomenden (TR=*terminal repeat*) befinden. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der IR bzw. TR und ihrer Position auf dem Genom werden die Herpesviren in sechs Gruppen (A-F) unterteilt.

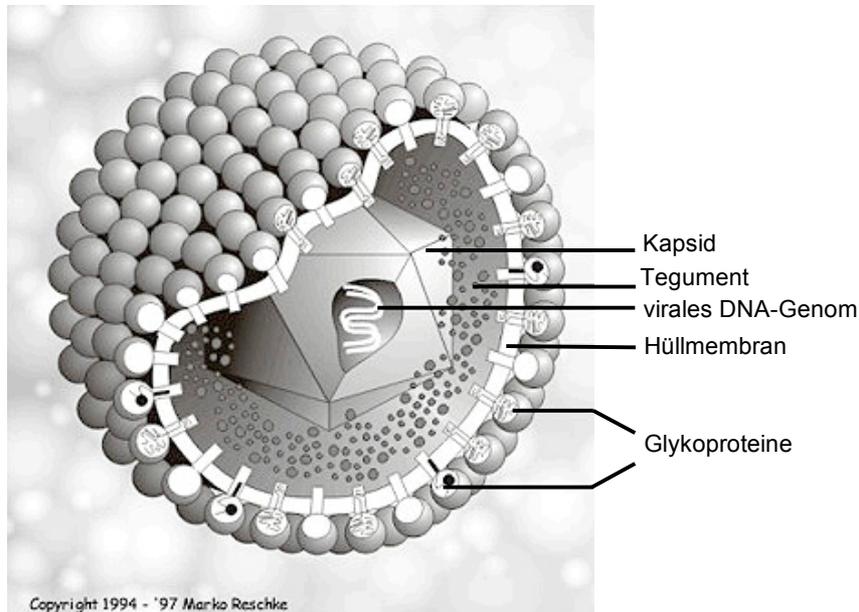


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Herpesvirus.

Quelle: The Big Picture Book of viruses
www.virology.net; modifiziert

Das herpesvirale Genom kodiert auf beiden Strängen für ca. 100 Genprodukte, beim HCMV sogar für ca. 200 Genprodukte. Die herpesvirale Hüllmembran leitet sich primär von der inneren Kernmembran der Wirtszelle ab, wird allerdings später entfernt und durch die Membran der trans-Golgi-Vesikel ersetzt. Sie enthält bis zu 12 virale Glykoproteine sowie 2 nicht-glykosylierte Polypeptide, die wichtige Funktionen bei der Adsorption der Partikel an Zellrezeptoren, bei der Penetration und Aufnahme sowie bei der Induktion einer schützenden, neutralisierenden Antikörperantwort erfüllen (Modrow et al., 2003). Der zwischen dem Kapsid und der Hülle liegende Bereich wird als Tegument bezeichnet, das eine morphologisch unstrukturierte Proteinmatrix mit ca. 20 verschiedenen Virusproteinen darstellt. Die Tegumentproteine gelangen bei der Infektion in die Zelle und erfüllen wichtige regulatorische Funktionen in der Frühphase des Replikationszyklus. Der α -TIF-Faktor (α -*trans-inducing factor*) des HSV aktiviert beispielsweise zusammen mit dem zellulären Transkriptionsfaktor Oct-1 die Transkription viraler *immediate early*-Genpromotoren.

2.3.2 Der herpesvirale Vermehrungszyklus

Die Infektion einer Zelle geschieht über die Adsorption der Viruspartikel an Rezeptoren der Oberfläche der Zielzelle (*attachement*). Epstein-Barr-Viren adsorbieren beispielsweise über den gp350/220-Komplex an den CD21/CR2-Rezeptor der Zellmembran. Vertreter der α -Herpesviren binden unter anderem über die Glykoproteine gB und/oder gC an Heparansulfat-Proteoglykan auf der Oberfläche eukaryoter Zellen. Anschließend fusioniert die Virushülle mit der Zellmembran (*penetration*) und das Nukleokapsid gelangt zusammen mit dem Tegument in das Zytoplasma der Zelle. Das Kapsid wird mit Hilfe von Mikrotubuli zu den Kernporen transportiert, durch die das virale Genom in das Nukleoplasma entlassen wird (*uncoating*). Die lineare Virus-DNA zirkularisiert und liegt als Episom im Kernplasma vor. Die Expression des viralen Genoms erfolgt in einer zeitlich geordneten Reihenfolge, die man als sehr frühe (*immediate early*), frühe (*early*) und späte (*late*) Genexpression bezeichnet (Modrow, 2003). Die *immediate early*-Gene kodieren gewöhnlich für Regulatorproteine, die die Expression der viralen *early*-Gene regulieren und die virale Replikation einleiten. Die Transkription der *immediate early*-Proteine verläuft mit Hilfe der RNA-Polymerase II der Wirtszelle, wobei die viralen Tegumentproteine als Transaktivatoren wirken. Die *immediate early*-Proteine werden im Zellkern angereichert und regulieren dort die weiteren Schritte der Virusvermehrung, indem sie die Aktivität viraler und zellulärer Promotoren beeinflussen. Die Proteine der *early*-Phase vermitteln die Expression der *late*-Gene und kodieren häufig für Enzyme, die an der viralen Replikation beteiligt sind (z.B. DNA-Polymerase, Thymidinkinase, Helikase, Primase). Die herpesvirale lytische DNA-Replikation findet im Gegensatz zu den meisten anderen Viren in Zellen statt, die sich nicht in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Bestimmte virale Proteine (z.B. EBV BZLF1) blockieren den Zellzyklus in der G1/G0-Phase und verhindern den Übergang in die S-Phase (Flemington, 2001). Dies ist vorteilhaft, da das Virus nicht um freie Nukleotide mit der zellulären DNA-Polymerase konkurrieren muss. Die Replikation der Virus-DNA beginnt am lytischen Replikationsursprung (Ori_{Lyt}) und verläuft nach dem Mechanismus der σ -Replikation bzw. des *rolling circle* über die virale DNA-Polymerase. Durch Bindung bestimmter Proteine an den Ori_{Lyt} (z.B. BZLF1 bei EBV) wird die Anlagerung des Komplexes aus viraler DNA-Polymerase, Helikase und Primase ermöglicht. Eine bisher unbekannte, virale Endonuklease schneidet den DNA-Strang, so dass ein freies 3'-OH- und ein freies 5'-Phosphatende entstehen. Die Nukleotide werden mit dem 3'-OH-Ende als Primer und unter Verwendung des geschlossenen DNA-Stranges als Matrize kontinuierlich ansynthetisiert. Das 5'-Ende wird fortlaufend vom Matrizenstrang gelöst und durch Bildung von kurzen RNA-Primern bzw. Okazaki-Elementen zum Doppelstrang ergänzt. So bildet sich ein DNA-Strang, der vielfache Einheiten des Virusgenoms in konkatermer Anordnung enthält (Modrow, 2003). Ungefähr zeitgleich mit der viralen Replikation erfolgt die Expression der *late*-Gene, die vorwiegend für Strukturproteine (z.B. Glykoproteine,

Kapsidproteine, Tegumentproteine) kodieren. Ein Teil der Glykoproteine wird zur Zelloberfläche transportiert und in die Zytoplasmamembran integriert. Gegen diese Proteine richtet sich die antikörpervermittelte, zytotoxische T-Zell-Antwort, die zur Lyse der damit als infiziert erkennbaren Zellen führt. Der Zusammenbau der verschiedenen Strukturproteine erfolgt im Zellkern und führt zunächst zu Partikelvorläufern, die keine DNA enthalten (*assembly*). Die aus der DNA-Replikation hervorgegangenen DNA-Konkatemere werden in lineare Monomere zerschnitten und in die Kapside verpackt. An die nun DNA-haltigen Kapside binden Tegumentproteine, die zuvor mit der inneren Kernmembran assoziieren. Die Membran stülpt sich an diesen Stellen aus und umhüllt die Kapside, die sich zwischen innerer und äußerer Kernmembran angesammelt haben (*budding*). Nach dem Transport der Kapside durch das Endoplasmatische Retikulum zum Golgi-Apparat erfolgt die Freisetzung infektiöser Partikel durch Verschmelzung mit der Zellmembran (*lysis*). Das Virus kann sich jedoch auch durch Zell-Zell-Kontakt oder Zellfusion ausbreiten.

Neben dem lytischen Replikationszyklus haben Herpesviren die Fähigkeit latent in der Zelle zu persistieren. Die virale DNA liegt als extrachromosomales Episom im Zellkern der infizierten Zelle vor. Die Produktion infektiöser Viruspartikel unterbleibt. Nur eine begrenzte Anzahl von Genen wird exprimiert, die zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz notwendig sind. Bei EBV sind beispielsweise die EBNA (*Epstein-Barr virus nuclear antigen*)-, EBER (*EBV-encoded RNA*)- und LMP (*latent membrane protein*)-Gene bekannt (Kieff & Rickinson, 2001), deren Expression zur Immortalisierung der B-Zellen führt. Vor allem die EBNA-Proteine (EBNA-LP, EBNA-2) induzieren den Übergang von der G₀- in die G₁-Phase des Zellzyklus und leiten damit die kontinuierliche Teilung der Zellen ein. Die Replikation der viralen DNA in der latenten Phase beginnt am latenten Replikationsursprung (Ori_P) und erfolgt parallel mit der Replikation der Wirtszell-DNA durch zelluläre DNA-Polymerasen. EBV EBNA-1 wird in allen latent infizierten Zellen exprimiert und ist über seine Bindung an den Ori_P verantwortlich für die episomale Virusreplikation (Modrow, 2003). Durch die zusätzliche Interaktion von EBNA-1 mit der chromosomalen DNA wird gewährleistet, dass das virale Episom während der Mitose zusammen mit den Chromosomen auf die Tochterzellen verteilt wird. Diese Form der latenten Replikation ist allerdings spezifisch für EBV und einige andere Vertreter der γ -Herpesviren. Dagegen persistieren α -Herpesviren in Zellen, die sich nicht teilen. Trotz der Expression von Latenz-Genen entkommt das Virus der humanen Immunantwort. Spezielle Proteine wie z.B. EBV EBNA-1 unterdrücken ihren proteasomalen Abbau, so dass die MHC-Klasse I-abhängige Präsentation von EBNA-1 unterbleibt (Levitskaya et al., 1995). Diese Zellen werden von den zytotoxischen T-Zellen nicht als fremd erkannt und das Virus entgeht der Eliminierung. EBV LMP-1 wirkt über die Induktion der Expression des zellulären Protoonkogens c-bcl-2 der Apoptose der EBV-infizierten Zelle entgegen. Der zelluläre Faktor NF- κ B führt in latent Virus-infizierten Lymphozyten zur

Hemmung der lytischen Virusreplikation, indem er die Transkription von *immediate early*-Genen unterdrückt (Brown et al., 2003). Damit etabliert sich der virale Latenzzustand. Durch bestimmte Umweltbedingungen wie z.B. Stress oder medikamentöse Immunsuppression können ruhende Herpesviren reaktiviert werden und der lytische Replikationszyklus beginnt.

2.4 Porzine lymphotrope Herpesviren (PLHV)

Bis 1999 waren beim Schwein nur zwei Herpesviren bekannt: das Pseudorabies-Virus (PRV) (Wittmann & Rziha, 1989), ein Vertreter der α -Herpesviren, und das porcine Cytomegalievirus (PCMV) (Tucker et al., 1999; Goltz et al., 2000), das zu den β -Herpesviren gehört. Das PRV verursacht die Aujeszky'sche Krankheit im Schwein, die vor allem in Ferkeln mit ausgeprägten, zentralnervösen Erscheinungen und Entzündungen des Respirationstraktes einhergeht (Plonait & Bickhardt, 1997; Sawitzky, 1997). Inzwischen steht ein Impfstoff zur Verfügung, der zwar eine Infektion mit PRV nicht verhindert, jedoch den Ausbruch der Erkrankung unterdrückt. PRV infiziert nahezu alle Säuger, wobei Primaten und Einhufer eine hohe natürliche Unempfindlichkeit haben. Eine Infektion von Hunden oder Katzen endet dagegen schon nach wenigen Tagen letal. Für den Menschen gilt PRV als nicht infektiös.

Eine Infektion mit PCMV verläuft im Schwein normalerweise symptomlos, obwohl das Virus auch Totgeburten, Rhinitis und Pneumonien auslösen kann (Clark et al., 2003). Kritisch verlaufende Infektionen der Atemwege betreffen vor allem junge Tiere (Plonait & Bickhardt, 1997). PCMV ist in den Schweineherden weit verbreitet und die plazentare Übertragung des Virus ist für die Virussicherheit in der XT problematisch (Clark et al., 2003).

Nach der Entwicklung einer Konsensus-PCR auf Basis des viralen DNA-Polymerase-Gens wurden zwischen 1999-2003 erstmals drei neue porcine γ -Herpesviren identifiziert (Ehlers et al., 1999a; Chmielewicz et al., 2003). Der Nachweis von neuen γ -Herpesviren beim Schwein war deshalb so bedeutend, weil γ -Herpesviren häufig mit Tumorerkrankungen assoziiert sind (Reid & Buxton, 1989; Knecht et al., 1997) und ihre pathogenen Eigenschaften nicht selten erst bei Spezieswechsel zum Tragen kommen (Loken et al., 1998; Albin et al., 2003). Aufgrund ihres Tropismus für B-Lymphozyten des Blutes sowie lymphoide Organe wie der Milz wurden die drei neu identifizierten, porcinen γ -Herpesviren als „Porzine lymphotrope Herpesviren“ (PLHV-1, PLHV-2, PLHV-3) bezeichnet. Die PCR-Analyse ergab, dass die PLHV in Haus- und Wildschweinen weit verbreitet sind. Die Prävalenz in den Schweineherden liegt bei 80-100% (Ehlers et al., 1999b; Chmielewicz et al., 2003). Während die Homologie in konservierten Genen von PLHV-1 und PLHV-2 bei ca. 90% liegt (Ulrich et al., 1999), ist die Ähnlichkeit von PLHV-1 zu PLHV-3 mit ca. 70% etwas geringer (Chmielewicz et al., 2003). Die phylogenetische Analyse erbrachte eine besonders enge Verwandtschaft der PLHV zu den γ -Herpesviren der Wiederkäuer, wie dem Alcephalinen

Herpesvirus-1 (AIHV-1), dem Ovinen Herpesvirus-2 (OvHV-2) und dem Bovinen lymphotropen Herpesvirus (BLHV) (Abb. 3; Ehlers et al., 1999b). Diese wurden zusammen mit den PLHV dem neuen Genus *Macavirus* zugeordnet (McGeoch et al., 2006). OvHV-2 und AIHV-1 sind in ihren Hauptwirten Schaf und Gnu apathogen, verursachen allerdings bei Wirtswechsel das bösartige Katarrhalfieber bei Rindern (AIHV-1, OvHV-2; Reid & Buxton, 1989) bzw. Schweinen (OvHV-2; Loken et al., 1998; Albini et al., 2003). Diese zumeist tödlich verlaufende Erkrankung äußert sich durch hohes Fieber, eitrigem Nasenausfluss, wässrig-blutigen Durchfall und Augenentzündungen (Dahme & Weiss, 1988).

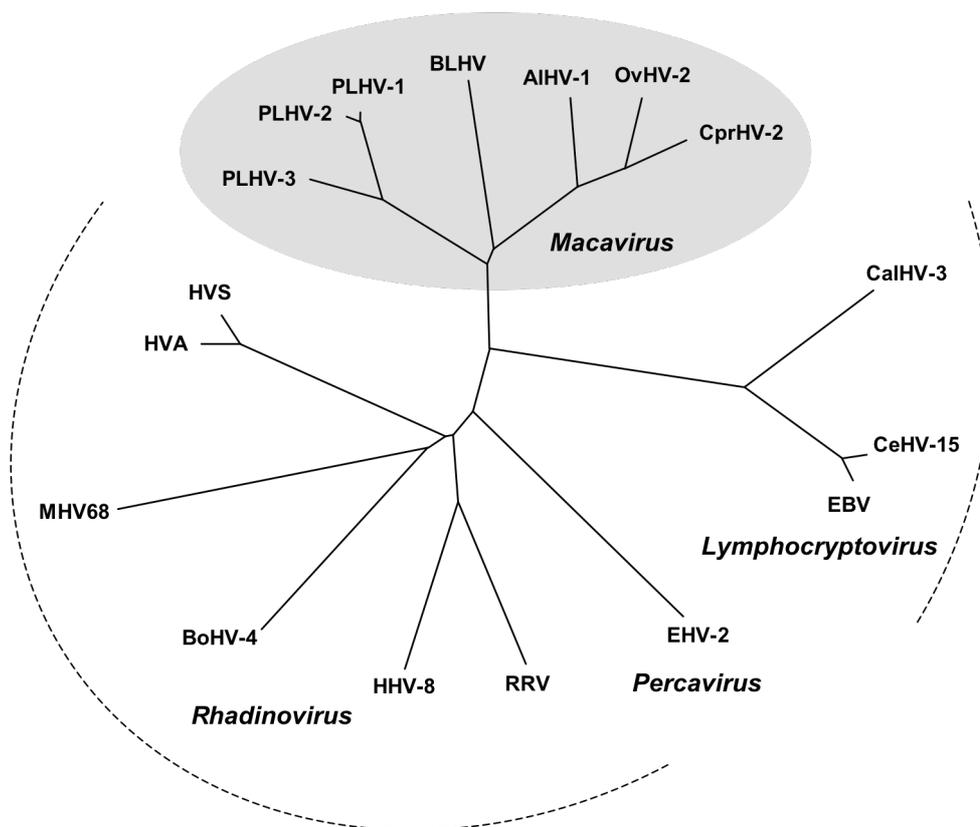


Abb. 3: Phylogenetische Analyse von PLHV-1, -2 und -3 innerhalb der γ -Herpesviren.

Mit Hilfe der PHYLIP Software wurde unter Verwendung von konservierten Sequenzbereichen der DNA-Polymerase und des Glykoprotein B eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Die mit den PLHV am nächsten verwandten Herpesviren sind grau unterlegt.

Quelle: Chmielewicz et al., 2003; modifiziert

Bisher konnten die PLHV in gesunden Schweinen keiner natürlich auftretenden Erkrankung zugeordnet werden. Allerdings wurde in immunsupprimierten Schweinen nach einer experimentellen Transplantation von peripheren Blutstammzellen eine lymphoproliferative Erkrankung beobachtet, die mit hoher Mortalität einhergeht und der Epstein-Barr-Virus assoziierten PTLD in der Allotransplantation vergleichbar ist (Huang et al., 2001). Die in den erkrankten Tieren beobachtete Hyperplasie und Expansion der B-Zellpopulation äußerte sich

durch eine Vergrößerung der Milz und der Körperlymphknoten. Die betroffenen Schweine waren außerdem durch Lethargie, Gewichtsverlust und eine erhöhte Leukozytenzahl gekennzeichnet. Die spätere Analyse von Lymphknoten erkrankter Schweine mittels PCR identifizierte PLHV-1 in großer Kopienzahl sowie Transkripte sehr früher und später Gene, die bei gesunden Schweinen nicht detektiert wurden (Huang et al., 2001; Goltz et al., 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass PLHV-1 an der porzinen PTLD ursächlich beteiligt ist. Unter den Bedingungen der XT könnten die weit verbreiteten porzinen Gammaherpesviren auf immunsupprimierte Menschen übertragen werden und möglicherweise eine lymphoproliferative Erkrankung auslösen. Neben der Infektion des Transplantatempfängers mit PLHV bestünde die Gefahr einer theoretisch möglichen Rekombination mit humanen Herpesviren, wie z.B. HCMV, HHV-8 oder EBV, die bei Immunsupprimierten verstärkt reaktiviert werden (Abschnitt 2.2.2). Außerdem könnte die durch PLHV-Antigene ausgelöste Immunantwort zu einer frühzeitigen Abstoßung des Transplantates führen. Aus diesen Gründen ist es wichtig, die PLHV aus den Spendertieren zu eliminieren. Untersuchungen von Mueller et al., (2005) ergaben, dass die Zucht von PLHV-freien Schweinen bisher nicht möglich ist. Ferkel, die bereits fünf Tage nach der Geburt von der Mutter getrennt wurden und unter SPF-Bedingungen in Einzelhaltung aufgezogen wurden, waren immer noch zu 66% PLHV-positiv. Im Gegensatz dazu waren die Tiere frei von PCMV. Bei zusätzlicher Anwendung des Kaiserschnittes konnte die PLHV-Infektion der Ferkel zwar weiter reduziert werden (Tucker et al., 2003), aber ein völliger Ausschluss der Virusübertragung war bisher nicht möglich. Bei Transplantation von porzinen Organen auf Paviane konnte allerdings keine Reaktivierung der PLHV unter Immunsuppression nachgewiesen werden (Mueller et al., 2004). Die Übertragung der PLHV erfolgt wahrscheinlich auf prä- bzw. postnatalem Wege. Die erfolgreiche Zucht PCMV-, aber nicht PLHV-freier Tiere deutet auf die unterschiedlichen Übertragungswege dieser Herpesviren hin. Aus diesen Gründen ist es wichtig, Schlüsselgene der PLHV-Replikation funktionell zu untersuchen, um nachfolgend Einblicke in die Pathogenese dieser Viren zu erhalten.

2.4.1 Genomstruktur der PLHV

Bisher gelang es unserer Arbeitsgruppe ca. 100 kb des Genoms von PLHV-1 zu sequenzieren (Goltz et al., 2002). In Abbildung 4 ist der Teil des Genoms von PLHV-1 dargestellt, der die für Herpesviren typische Einteilung in drei konservierte Genblöcke zeigt. Die Sequenzierung des Bereiches von orf03 bis orf69 ist abgeschlossen, was den 1. und 2. Genblock und den Beginn des 3. Genblocks widerspiegelt (Abb. 4).

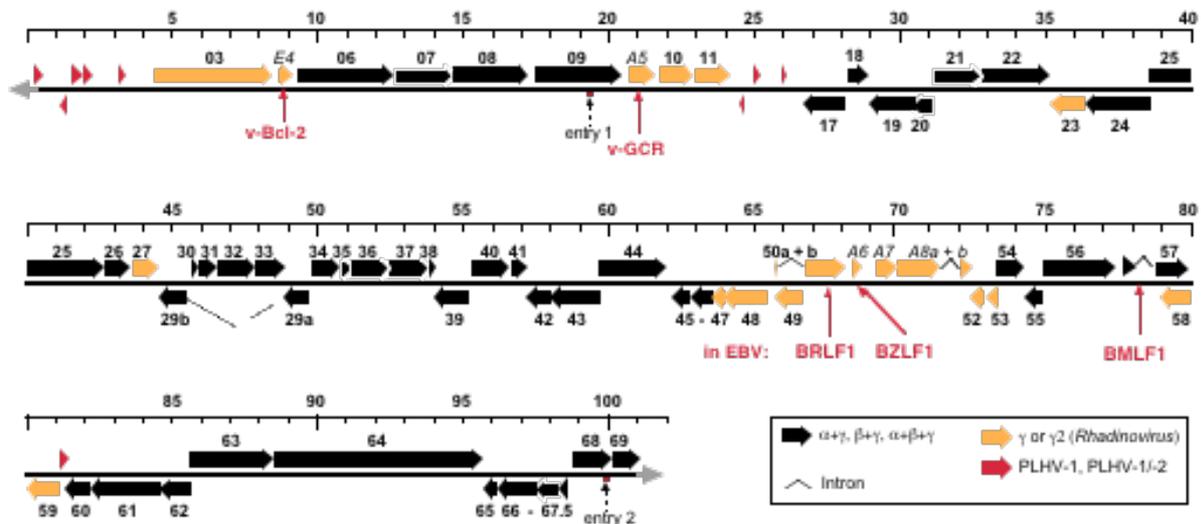


Abb. 4: Genomstruktur von PLHV-1

Dargestellt ist der bisher sequenzierte Genombereich von 100 kb von PLHV-1. Die Leserahmen sind als Pfeile dargestellt, deren Orientierung die Transkriptionsrichtung angibt. Die schwarzen Pfeile symbolisieren Leserahmen, die in allen drei Subfamilien (α -, β -, γ - Herpesviren) beschrieben wurden. Die orange unterlegten Pfeile stellen die nur in γ -Herpesviren charakterisierten Leserahmen dar, während die roten Pfeile PLHV-1-spezifische Leserahmen repräsentieren. Die Leserahmen für potentielle Virulenzfaktoren und Regulatorproteine sind mit schmalen roten Pfeilen gekennzeichnet, entsprechende homologe Proteine aus EBV sind angegeben. Mit der Bezeichnung A6 ist der orfA6/BZLF1_h gemeint, dessen zwei Introns nicht dargestellt sind. Quelle: Lindner et al., 2007

Der 1. Genblock umfasst die Leserahmen orf03 bis orf11 und beinhaltet neben konservierten Genen wie z.B. das Glykoprotein B (gB; orf08) und die DNA-Polymerase (orf09) auch zwei nicht konservierte Leserahmen, die nur in einigen γ -Herpesviren vorhanden sind. Es handelt sich um die Leserahmen orfE4/BALF1_h und orfA5/BILF1_h, die für potentielle Virulenzfaktoren kodieren. Der orfE4/BALF1_h ist homolog zu E4 von EHV-2 und orfBALF1 von EBV. EBV BALF1 (v-Bcl-2) ist homolog zum zellulären Bcl-2-Protein und wirkt antiapoptotisch (Marshall et al., 1999). Der orfA5/BILF1 besitzt Homologie zu ALHV-1 A5 und orfBILF1 von EBV und kodiert vermutlich für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (v-GCR). Eine geringe Ähnlichkeit besitzt er zu orf74 von HHV-8, dessen Proteinprodukt Homologie zum humanen IL-8 Rezeptor zeigt und an der Transformation der Wirtszelle beteiligt ist (Bais et al., 1998; Arvanitakis et al., 1997). Inwieweit das ORFA5/BILF1_h-Protein von PLHV eine ähnliche Funktion hat, muss noch geklärt werden. Der 2. Genblock umfasst die Leserahmen orf17 bis orf50 und beinhaltet u.a. zwei Vertreter der *immediate early*-Gene, orf45 und orf50. HHV-8 ORF45 hemmt die Virus-vermittelte Induktion von INF α und INF β , indem es die Phosphorylierung und die Translokation von IRF-7 (*interferon regulatory factor*) in den Zellkern blockiert (Zhu et al., 2002). ORF50 zeigt Homologie zu EBV BRLF1 und HHV-8 ORF50. In allen bisher untersuchten γ -Herpesviren vermittelt es als Transkriptionsaktivator die Reaktivierung der Viren aus der Latenz (Zalani et al., 1996; Lukac et al., 1998). Im Anschluss an orf50 folgen drei nicht-konservierte Leserahmen, orfA6/BZLF1_h, orfA7/BZLF2_h und orfA8/BLLF1_h. Das ORFA6/BZLF1_h-Protein zeigt geringe Homologie zu EBV BZLF1 und HHV-8 K-bzip. Während EBV BZLF1 den lytischen Zyklus induziert, konnte für HHV-8 K-bzip

keine transaktivierende Funktion nachgewiesen werden (Ragoczy et al., 1998; Lukac et al., 1998). Der orfA7/BZLF2_h zeigt Homologie zum orfA7 von AIHV-1 und orfBZLF2 von EBV. EBV orfBZLF2 kodiert für ein Glykoprotein, das für die Adsorption der Viruspartikel an die Zelloberfläche wichtig ist (Wang & Hutt-Fletcher, 1998). Ein weiteres Glykoprotein wird von orfA8/BLLF1_h kodiert, das große Ähnlichkeit zu orfA8 von ALHV-1 und orfBLLF1 (gp 350/220) von EBV zeigt. EBV BLLF1 vermittelt die Anheftung von EBV über den CD21/CR2-Rezeptor von B-Zellen und induziert Apoptose in T-Zellen (Tanner et al., 1987; Tanner & Alfieri, 1999). Vom dritten Genblock wurden bisher orf52-69 sequenziert. Der orf57 zeigt Homologie zu orfBMLF1 von EBV und HHV-8 orf57. In EBV und HHV-8 wirkt ORF57 vorrangig als post-transkriptionaler Regulator der Genexpression. Der orf59 besitzt Homologie zu EBV orfBMRF1 und HHV-8 orf59. EBV BMRF1 und HHV-8 ORF59 sind eine essentielle Komponente der aktiven viralen DNA-Polymerase (*viral polymerase processivity factor*; Chan & Chandran, 2000). Tabelle 3 zeigt einen Überblick über die Leserahmen orf50-59 mit deren zugehörigen Proteinprodukten sowie deren Homologien zu anderen bekannten γ -herpesviralen Proteinen. Die vergleichende Analyse konservierter Gene von PLHV-1 zeigt, dass die PLHV am nächsten mit den Rhadinoviren verwandt sind. Die beschriebenen fünf nicht-konservierten Gene zeigen jedoch Ähnlichkeit zu den Lymphocryptoviren. Die Ähnlichkeit zwischen der EBV-vermittelten PTLD im Menschen und der PLHV-1 assoziierten PTLD im Schwein deutet ebenfalls auf eine Zugehörigkeit der PLHV zu den Lymphocryptoviren. Mittlerweile sind die PLHV zusammen mit AIHV-1 und OvHV-2 in den neuen Genus Macavirus eingeordnet worden (McGeoch et al., 2006; Abschnitt 2.4).

Tabelle 3: Putative Leserahmen orf50 - 59 in PLHV-1, -2 und -3 und homologe Leserahmen orf50 - 59 in AIHV-1, HHV-8 und EBV

Pol.	PLHV-1			PLHV-2			PLHV-3			AIHV-1			HHV-8			EBV			Funktion
	orf	Größe (AS)	%id	orf	Größe (AS)	%id	orf	Größe (AS)	%id	orf	Größe (AS)	%id	orf	Größe (AS)	%id	orf	Größe (AS)	%id	
+	50	510	95.3	50	509	71.3	50	515	37.5	50	619	29.1	50	668	24.6	BRLF1	605	-	Transaktivatorprotein
	50a	14		50a	14		50a	14		50a	26		50a	6		-			
	50b	496		50b	495		50b	501		50b	593		50b	662		-			
+	A6/BZLF1	172	91.3	A6/BZLF1	174	60.4	A6/BZLF1	183	33.9	A6	280	28.8	K-bZIP	237	23.1	BZLF1	245	-	Transaktivatorprotein
	A6/BZLF1 a	101		A6/BZLF1 a*	103		A6/BZLF1 a	108		A6 a*	204		K-bZIP a	158		BZLF1 a	167		
	A6/BZLF1 b	35		A6/BZLF1 b*	35		A6/BZLF1 b	35		A6 b*	35		K-bZIP b	31		BZLF1 b	36		
	A6/BZLF1 c	36		A6/BZLF1 c*	36		A6/BZLF1 c	40		A6 c*	41		K-bZIP c	48		BZLF1 c	43		
+	A7/BZLF2	234	92.8	A7/BZLF2	234	69.4	A7/BZLF2	254	32.0	A7	244				BZLF2	223	32.0	Zellfusionprotein	
+	A8/BLLF1	530 ^s	91.2	A8/BLLF1	525	51.0	A8/BLLF1	518	25.3	A8	623	32.3	K8.1A	228	23.3	BLLF1/ gp220	658	-	Zellattachmentprotein
	A8/BLLF1 a	422		A8/BLLF1 a*	422		A8/BLLF1 a*	416		A8 a*	603		K8.1A a	141		gp220 a	503		
	A8/BLLF1 b	108		A8/BLLF1 b*	103		A8/BLLF1 b*	102		A8 b*	20		K8.1A b	87		gp220 b	155		
-	52	136	92.7	52	136	70.9	52	133	37.7	52	125	27.8	52	131	28.8	BLRF2	162	28.8	Kapsidprotein
-	53	112				59.8	53	111	45.0	53	103	37.3	53	110	41.2	BLRF1	102	41.2	unbekannt
+	54	294				69.7	54	294	43.2	54	298	30.9	54	318	34.3	BLLF3	278	34.3	dUTPase
-	55	213				80.8	55	213	65.0	55	220	48.3	55	227	48.3	BSRF1	218	48.3	unbekannt
+	56	834				71.2	56	838	46.7	56	837	41.1	56	843	38.0	BSLF1	874	38.0	DNA-Replikationsfaktor
+	57	431				78.0	57	432	44.4	57	436	30.5	57	455	28.3	BMLF1	479	-	post-transkriptionaler Aktivator
	57 a	17	57 a*	17	57 a*	17	57 a	17	57 a	16	BMLF1 a	42							
	57 b	413	57 b*	415	57 b*	415	57 b	419	57 b	438	BMLF1 b	438							
-	58	351				71.2	58	351	44.9	58	351	31.1	58	357	29.9	BMRF2	357	29.9	unbekannt
-	59	374				79.1	59	401	47.2	59	411	31.5	59	396	31.5	BMRF1	404	31.5	DNA-Replikationsfaktor

- (Pol.) Polarität, orf-Orientierung
 (%id) prozentuale Homologiewerte zwischen PLHV-1/ PLHV-2; PLHV-1/PLHV-3; PLHV-1/AIHV-1; PLHV-1/HHV-8 und PLHV-1/EBV
 (*) ermittelt *in silico* durch Identifikation von Spleißsequenzen, die positional konserviert sind zu denen in PLHV-1

Nähere Angaben zur Berechnung der Homologiewerte sind der Veröffentlichung Lindner et al., 2006 zu entnehmen.

2.5 Herpesvirale Proteine der immediate early-Genexpression

Bei der herpesviralen Primärinfektion einer Zelle erfolgt zunächst die lytische DNA-Replikation mit nachfolgender Freisetzung von Nachkommenviren. Die Transkription des viralen Genoms wird durch verschiedene Tegumentproteine (z. B. α -TIF-Faktor) initiiert, die das Virus mit in die Zelle bringt. Mit Hilfe von weiteren zellulären Proteinen (Oct-1 u.a.) wird die Expression der *immediate early*-Gene stimuliert, für die keine virale DNA-Synthese notwendig ist. Die *immediate early*-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die die Expression der *early*- und *late*-Gene regulieren (Abschnitt 2.3.2). Für die vorliegende Arbeit waren die Proteine der *immediate early*-Genexpression von besonderer Bedeutung, da diese eine Schlüsselrolle bei der Reaktivierung von Herpesviren aus der Latenz spielen. Wichtige Vertreter dieser herpesviralen Proteine sind z. B. EBV BZLF1, EBV BRLF1, HHV-8 ORF50, MHV-68 (murines Herpesvirus Typ-68) ORF50 und HVS ORF50. Ein Charakteristikum für solche *immediate early*-Proteine ist das sehr frühe Erscheinen ihrer mRNAs 1-4 h nach Induktion des lytischen Zyklus. Die *immediate early*-Genprodukte sind neben der Regulation der Transkription in weitere zelluläre und virale Prozesse involviert, wie der Kontrolle des Zellzyklus und der DNA-Replikation mit nachfolgender Produktion reifer Viruspartikel. Diese Proteine besitzen eine DNA-Bindedomäne, die oft ein Dimerisierungsmotiv (z.B. Leucizipper) beinhaltet, und eine Transaktivierungsdomäne.

2.5.1 PLHV-1 ORF50

Das ORF50-Protein von PLHV-1 wurde als putativer Transkriptionsaktivator identifiziert, da Ähnlichkeiten zu den homologen Proteinen AIHV-1 ORF50, EBV BRLF1 und HHV-8 ORF50 bestehen (Abschnitt 2.4.1; Tab. 3). Mit 37,5% zeigt PLHV-1 ORF50 die größte Übereinstimmung mit ORF50 aus AIHV-1, gefolgt von HHV-8 ORF50 (29,1% Übereinstimmung) und EBV BRLF1 (24,6% Übereinstimmung). Innerhalb der PLHV besteht die größte Homologie mit 95,3% zwischen PLHV-1 und PLHV-2. Etwas geringer ist die Übereinstimmung mit 71,3% zu PLHV-3. Die größten Homologien wurden im N-terminalen Teil des ORF50-Proteins verwandter γ -Herpesviren gefunden (Abb. 5). Neben zahlreichen Phosphorylierungssignalen wurden potentielle Kernlokalisierungssignale (NLS) im N-Terminus (NLS I AS 8-16) und an vier weiteren Positionen (NLS II-V) lokalisiert (Abb. 5). Während die NLS I-III besonders innerhalb der hier verglichenen γ -Herpesviren konserviert

sind, zeigen die NLS IV-V Homologien innerhalb der PLHV. Das Transkript von orf50 ist einfach gespleißt und besteht aus zwei Exons (50a, 50b). Während des Spleißprozesses wird der orf49 als Teil eines Introns entfernt. Dieser Vorgang ist innerhalb der γ -Herpesviren konserviert. Das translatierte Protein von PLHV-1 hat eine Größe von 510 AS.

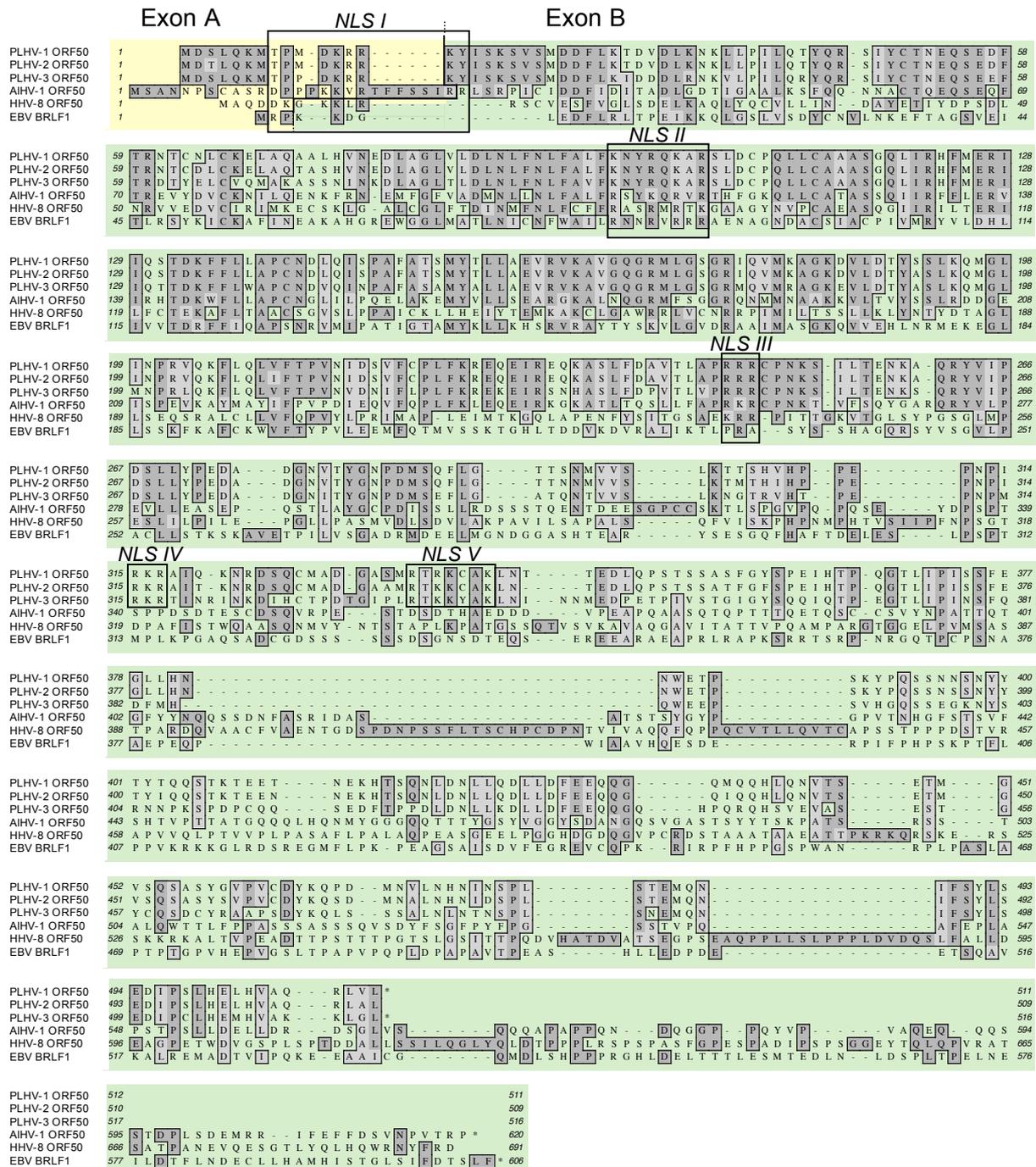


Abb. 5: Aminosäuresequenzvergleich der ORF50-Proteine von PLHV-1, -2, -3 und ORF50-homologer Proteine verwandter γ -Herpesviren. Mit Hilfe einer ClustalW-Analyse wurde ein Aminosäurealignment des ORF50-Proteins erstellt. Gelb unterlegt ist Exon A (50a) und grün ist Exon B (50b). Grau unterlegte, eingerahmte Aminosäuren deuten auf mehrheitlich konservierte (dunkelgrau) oder funktionsähnliche (hellgrau) Aminosäuren hin. Die potentiellen Kernlokalisierungssignale (NLS I-V) sind eingerahmt.

Eine zweite Spleißvariante wurde gefunden, deren Spleißakzeptorsequenz sich 829 bp stromabwärts von Exon B befindet. Für den Beginn der Translation wurde ein internes ATG postuliert, das sich 14 bp stromabwärts von der Spleißakzeptorsite befindet und ein verkürztes ORF50-Protein generieren würde (Lindner et al., 2007).

2.5.1.1 ORF50-homologe Proteine in EBV und HHV-8

Der *orf50* ist ein hoch konserviertes Gen in allen bekannten γ -Herpesviren und sein Genprodukt fungiert als Haupttransaktivator beim Übergang von der Latenz in die lytische Phase. Bei EBV wird der lytische Zyklus von zwei unabhängigen Proteinen induziert: dem ORF50-Homolog BRLF1 sowie von BZLF1. BRLF1 wird zusammen mit BZLF1 von einer bicistronischen mRNA translatiert (Manet et al., 1989). Beide Proteine aktivieren sich gegenseitig und wirken synergistisch bei der Aktivierung lytischer Gene (Sinclair et al., 1991; Schwarzmann et al., 1998; Adamson et al., 2000). Der *orfBRLF1* ist ein *immediate early*-Gen, dessen Expression zur Einleitung des lytischen Zyklus bei EBV führt (Hardwick et al., 1988; Ragoczy et al., 1998; Feederle et al., 2000). Das BRLF1-Protein ist hauptsächlich im Zellkern, aber auch im Zytoplasma lokalisiert (Darr et al., 2001). Die ersten 280 N-terminalen AS sind wichtig für die DNA-Bindung und für die Homodimerisierung von BRLF1 (Lukac et al., 2001). Für die transkriptionale Aktivierung ist der AS-Bereich von 352-605 im C-Terminus notwendig (Manet et al., 1991; Hardwick et al., 1992). Die Aktivierung von Promotoren früherer Gene durch BRLF1 erfolgt entweder direkt durch Bindung an GC-reiche Motive, die als *Rta response elements* (RRE) bezeichnet werden (Gruffat & Sergeant, 1994), oder indirekt über Signalkaskaden unter Nutzung zellulärer Faktoren wie z.B. Sp1, Zif, YY1 (Darr et al., 2001; Ragoczy & Miller, 2001). Der Promotor von *orfBRLF1* wird beispielsweise indirekt über Sp1 autostimuliert (Liu & Speck, 2003). Außerdem enthält er zwei weitere Bindemotive für den Faktor BZLF1 (Ragoczy & Miller, 2001). Die Aktivierung der EBV-Gene *orfBZLF1* und der *orfBALF5* (DNA-Polymerase) erfolgt ebenfalls über indirekte Mechanismen (Liu et al., 1996; Adamson et al., 2000; Ragoczy & Miller, 1999). Eine direkte Bindung von BRLF1 an RRE konnte für die Promotoren der Gene *orfBMRF1* (Quinlivan et al., 1993) und *orfBMLF1* (Kenney et al., 1989; Gruffat et al., 1992) gezeigt werden. Zur Initiation der Transkription interagiert EBV BRLF1 mit zellulären Transkriptionsfaktoren (Manet et al., 1993).

Bei HHV-8 tritt die *orf50*-mRNA bereits 1-4 h nach der Induktion des lytischen Zyklus auf (Saveliev et al., 2002). HHV-8 *orf50* wird als polycistronische RNA transkribiert, die außerdem die kodierenden Regionen für *orfK-bzip* (K8) und *orfK8.1* trägt (Yamanegi et al., 2005). Die *orf50*-mRNA von HHV-8 ist ebenfalls einfach gespleißt und besteht aus zwei Exons. Die Expression von ORF50 in latent HHV-8-infizierten Zellen führt zur Induktion des lytischen Replikationszyklus von HHV-8 (Gradoville et al., 2000; Sun et al., 1998; Lukac et al., 1998). Das ORF50-Protein von HHV-8 besitzt eine ähnliche Domänenstruktur wie EBV

BRLF1. Es besteht aus einer N-terminalen, basischen DNA-Bindedomäne, einer zentralen Dimerisierungsdomäne und einer C-terminalen, sauren Aktivierungsdomäne (Lacoste et al., 2004). Die Aktivierungsdomäne trägt außerdem vier stark hydrophobe Regionen, die als Aktivierungsdomänen 1-4 bezeichnet werden und Homologie zu anderen Transkriptionsfaktoren zeigen (Lukac et al., 1999). Die AS-Region 300-592 ist besonders reich an Threonin- und Serinresten, die durch Phosphorylierung die Transkriptionsaktivität von ORF50 regulieren (Gwack et al., 2003). Die Aktivierung von frühen Genen durch HHV-8 ORF50 erfolgt wie bei EBV BRLF1 über direkte oder indirekte Mechanismen. Eine direkte Bindung von ORF50 an RRE konnte für die Promotoren der Gene orfK-bzip (Liao et al., 2003), orf57 (Duan et al., 2001; Lukac et al., 2001), orfK12/Kaposin (Chang et al., 2002; Song et al., 2003), orf59, orfK2/vIL-6 (Deng et al., 2002) und orfnut-1 (PAN RNA; Chang et al., 2002; Song et al., 2002) gezeigt werden. Die Sequenzmotive der RRE können sich beträchtlich unterscheiden.

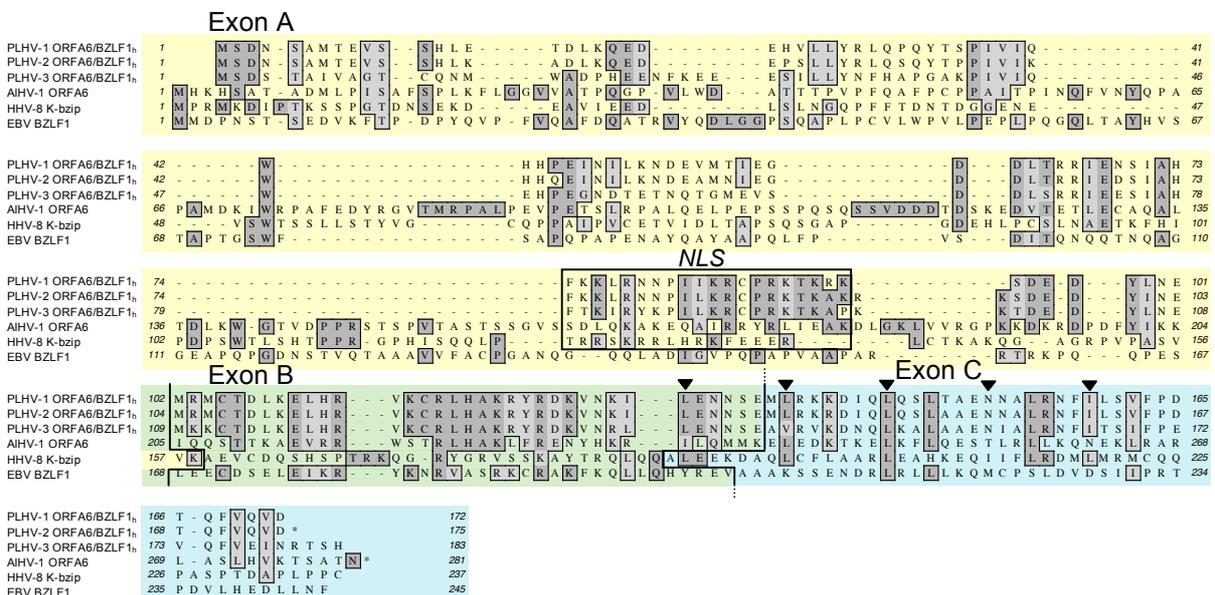
Bei der indirekten Aktivierung interagiert ORF50 mit zellulären Proteinen wie MGC2663 (Wang et al., 2001), C/EBP α (*CCAAT enhancer binding protein α* ; Wang et al., 2003), Stat3 (*signal transducers and activators of transcription*; Gwack et al., 2002) oder RBP-J κ (*recombination signal binding protein*; Liang et al., 2002), die im Komplex mit ORF50 an verschiedene Sequenzmotive im Promotor binden. Unter Beteiligung des zellulären C/EBP α werden beispielsweise die Promotoren der HHV-8-Gene orfK-bzip, orf50 und orf57 aktiviert (Wang et al., 2003, 2004a). Eine indirekte Aktivierung wurde auch für die HHV-8-Gene Thymidinkinase (Zhang et al., 1998; Liang et al., 2002), orf74/vGCR (Jeong et al., 2001) und orfK9/vIRF1 (Chen et al., 2000) gezeigt. Die Autoaktivierung von orf50 wird über Sequenzmotive für die zellulären Faktoren Oct-1 und Sp1/Sp3 vermittelt (Sakakibara et al., 2001; Deng et al., 2000). Die Transkription viraler Gene wird in der Regel über direkte und indirekte Mechanismen reguliert. Zur Vermittlung der viralen Transkription interagiert ORF50 mit zellulären Koaktivatoren wie z.B. CREB (*cAMP responsive element binding protein*), das zur Acetylierung von Histonen und somit zur Auflockerung der Nucleosomenstruktur führt (Gwack et al., 2001a). Die negative Regulation der Transkriptionsaktivität von ORF50 wird durch die Bindung von HDAC-1 (*Histone deacetylase 1*) erreicht (Gwack et al., 2001a). HHV-8 ORF50 blockiert außerdem die p53-vermittelte Apoptose (Gwack et al., 2001b).

2.5.2 PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h

Im Genom von PLHV-1 wurde der ORFA6/BZLF1_h als potentieller Transkriptionsaktivator identifiziert, da Homologien zu ALHV-1 ORFA6, EBV BZLF1 und HHV-8 K-bzip bestehen (Abschnitt 2.4.1; Tab. 3). Dabei ist die Verwandtschaft zu AIHV-1 ORFA6 mit 33,9% Übereinstimmung am größten. Die Homologien von PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h zu HHV-8 K-bzip (28,8% Übereinstimmung) und EBV BZLF1 (23,1% Übereinstimmung) sind etwas

geringer. Die größten Homologien in der AS-Sequenz bestehen mit 91,3% zwischen PLHV-1 und PLHV-2. Mit 60,4% fällt die Homologie zu PLHV-3 ORFA6/BZLF1_h geringer aus. Die orfA6/BZLF1_h-mRNA ist doppelt gespleißt und besteht aus drei Exons, A6/BZLF1_h a+b+c (Abb. 6 A). Die Analyse der PLHV-1-Transkripte mittels RACE-PCR identifizierte die vollständig gespleißte Variante, von der ein Protein mit einer Größe von 172 AS translatiert wird. Außerdem wurde eine weitere Spleißvariante identifiziert, in der nur das 2. Intron entfernt war. Da jedes der drei Exons von orfA6/BZLF1_h in PLHV-1 mit einem eigenen ATG-Startcodon beginnt und mit einem Stopcodon endet, könnte theoretisch jedes Exon für eine kurze Variante des ORFA6/BZLF1_h-Proteins kodieren. Im Exon A wurde ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS) gefunden (Abb. 6 A).

A



B

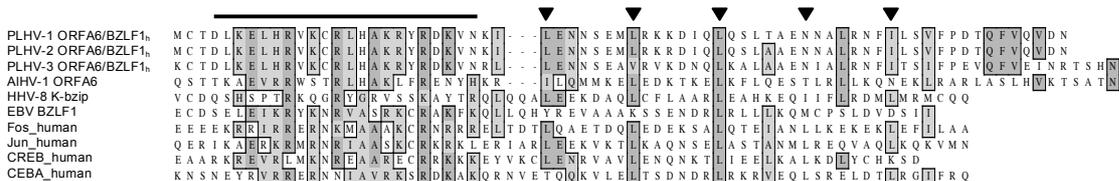


Abb. 6: Aminosäuresequenzvergleich der ORFA6/BZLF1_h-Proteine von PLHV-1, -2, -3 und Homologie zu γ -herpesviralen A6/BZLF1_h-Proteinen bzw. humanen Transkriptionsfaktoren.

A. Aminosäurealignment der ORFA6/BZLF1_h-Proteine von PLHV-1, -2, -3 und homologer Proteine verwandter γ -Herpesviren. Unter Verwendung einer ClustalW-Analyse wurde ein Aminosäuresequenzvergleich der ORFA6/BZLF1_h-Proteine vorgenommen. Gelb unterlegt ist Exon A (A6a/BZLF1_h), grün ist Exon B (A6b/BZLF1_h) und hellblau ist Exon C (A6c/BZLF1_h). Grau unterlegte, eingerahmte Aminosäuren deuten auf mehrheitlich konservierte (dunkelgrau) oder funktionsähnliche (hellgrau) Aminosäuren hin. Das potentielle Kernlokalisierungssignal (NLS) ist eingerahmt. Schwarze Pfeile deuten auf ein Leucinzippermotiv.

B. Partielles Aminosäurealignment ausgewählter Leucinzipper-Proteine im Vergleich zu PLHV ORFA6/BZLF1_h.

Der mit dem schwarzen Balken markierte Bereich repräsentiert eine Region hauptsächlich basischer Aminosäuren des Exon B, die dem eigentlichen Leucinzippermotiv vorausgehen. Die schwarzen Pfeile markieren Leucine oder andere hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren, die sich an jeder 7. Position im Leucinzippermotiv wiederholen.

Die größte Homologie innerhalb der PLHV findet man im Exon B. Der AS-Vergleich bekannter, homologer ORFA6/BZLF1_n-Proteine identifizierte ein Leucinzippermotiv (L¹³⁸ bis L¹⁵⁹) im C-terminalen Bereich (Exon C) von PLHV-1 ORFA6/BZLF1_n. Dieses Motiv ist durch die Abfolge von 22 hauptsächlich basischen AS gekennzeichnet und trägt an jeder 7. Position ein Leucin (Abb. 6 B). Diese Leucinzipperdomäne ist ebenfalls struktureller Bestandteil von EBV BZLF1, HHV-8 K-bzip oder zellulärer Vertreter der Familie der Leucinzipperproteine wie Fos, Jun, CREB oder CEBA (Flemington & Speck, 1990a; Lin et al., 1999; Sinclair, 2003). Sie dient zum einen der Dimerisierung des Proteins, zum anderen wird die DNA-Bindung gewährleistet, in dem die basischen Regionen der monomeren Proteine in die richtige Lage zur DNA gebracht werden. Eine zweite Region mit vorwiegend basischen AS wurde bei Position R⁶⁷ und R⁸⁵ identifiziert, die zumindest in HHV-8 K-bzip Bestandteil einer NLS ist (Portes-Sentis et al., 2001).

2.5.2.1 ORFA6/BZLF1_n-homologe Proteine in EBV und HHV-8

Das Transkript von EBV orfBZLF1 ist ebenfalls doppelt gespleißt und besteht aus drei Exons. Die Transkription steht unter Kontrolle von zwei Promotoren Zp und Rp. Die Aktivierung des Zp-Promotors führt zur Transkription einer monocistronischen RNA, die nur für BZLF1 kodiert. Dagegen wird vom Rp-Promotor eine bicistronische RNA transkribiert, die sowohl für BRLF1 als auch für BZLF1 kodiert (Speck et al., 1997). EBV orfBZLF1 ist ein *immediate early*-Gen (Countryman & Miller, 1985; Wen et al., 2007). Das Genprodukt wirkt als Transkriptionsaktivator (Speck et al., 1997) und besitzt drei funktionale Proteindomänen. Während die Transaktivierungsdomäne (AS 1-167; Exon A) am N-Terminus des Proteins lokalisiert ist (Chi et al., 1993), befindet sich die Dimerisierungsdomäne in Form eines Leucinzippers (AS 204-245; Exon C) am C-Terminus. Eine Folge basischer AS im zentralen Bereich (AS 168-203; Exon B) zeigt Sequenzhomologie zu anderen Proteinen der AP-1 Familie wie Jun und Fos (Farrel et al., 1989) und vermittelt die Bindung an die DNA. BZLF1 bindet als Homodimer an AP1-ähnliche Bindemotive, sogenannte *Zta response elements* (ZRE; Miller, 1989; Lieberman et al., 1990; Speck et al., 1997), in den Promotoren vieler Gene wie z.B. orfBZLF1 (Flemington & Speck, 1990a; Kraus et al., 2001), orfBRLF1 (Liu & Speck 2003), orfBMRF1 und orfBMLF1 (Kenney et al., 1989a; Holley-Guthrie et al., 1990). BZLF1 autostimuliert seinen eigenen Promotor durch Bindung an die ZRE ZIIIA und ZIIIB (Flemington & Speck, 1990a). Die indirekte Aktivierung von EBV-Promotoren wird über zelluläre Proteine wie z.B. MEF-2D (*myocyte enhancer factor*), Sp1/Sp3, ATF (*activating transcription factor*) oder CREB realisiert (Yin et al. 2004; Adamson & Kenney, 1999). In den allermeisten Fällen werden die Promotoren sowohl direkt als auch indirekt durch BZLF1 reguliert. Schließlich führt die Expression von BZLF1 in latent EBV-infizierten Zellen zur Induktion des lytischen Infektionszyklus (Countryman & Miller, 1985; Rooney et al., 1989;

Miller et al., 1989). EBV BZLF1 ist an verschiedenen Serin- und Threoninresten phosphoryliert (Daibata et al., 1992; Baumann et al., 1998). Diese Modifikationen könnten die Transkriptionsaktivität des Proteins regulieren (El-Guindy & Miller, 2004). Neben der Funktion als Transkriptionsfaktor ist BZLF1 auch ein essentieller Replikationsfaktor (Fixman et al., 1995). Der lytische Replikationsursprung (Ori_{Lyt}) von EBV trägt sieben ZRE, an die BZLF1 mit unterschiedlicher Affinität bindet (Schepers et al., 1993; Hammerschmidt & Sugden, 1988). Die Mutagenese dieser ZREs zerstörte die lytische Replikationsfähigkeit völlig (Schepers et al., 1996). Außerdem interagiert BZLF1 mit viralen Replikationsenzymen wie der DNA-Polymerase (Baumann et al., 1999), BMRF1 (*viral processivity factor*; Zhang et al., 1996) und dem Helikase-Primase-Komplex (Gao et al., 1998). EBV BZLF1 besitzt außerdem antiapoptotische Funktionen. Die Interaktion von BZLF1 mit dem zellulären C/EBP α stimuliert dessen Fähigkeit, die Expression von p21 zu induzieren. Dieser negative Regulator führt zur Hemmung von Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) und nachfolgend zur Blockade des Zellzyklus in der G1-Phase (Cayrol & Flemington, 1996). Über die Interaktion von BZLF1 mit p53 wird ebenfalls die Einleitung der Apoptose verhindert (Zhang et al., 1994; Mauser et al., 2002). Des Weiteren hemmt EBV BZLF1 die Expression des IFN- γ -Rezeptors (Morrison et al., 2001). BZLF1 unterbricht damit möglicherweise den IFN- γ Signaltransduktionsweg, der die Zellen vor den Viren schützen soll.

In HHV-8 ist K-bzip das homologe Protein zu PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h. Aufgrund der Spleißereignisse (3 Exons) und struktureller Ähnlichkeiten wie der Leucinzipperdomäne wird es als äquivalentes Pendant zu EBV BZLF1 gesehen (Lin et al. 1999; Gruffat et al., 1999). Der orfK-bzip von HHV-8 wird zusammen mit orf50 und orfK8.1, der für ein virales Glykoprotein kodiert, als polycistronische RNA transkribiert (Seaman et al., 1999; Yamanegi et al., 2005). Aufgrund alternativer Spleißereignisse treten drei verschiedene mRNAs für K-bzip auf, von denen das vollständig gespleißte Transkript am häufigsten vorliegt (Zhu et al., 1999). Das K-bzip-Protein bindet wie EBV BZLF1 an den lytischen Replikationsursprung (Lin et al., 2003; Wang et al., 2004b) von HHV-8, aber eine Funktion als direkter Transkriptionsaktivator konnte nicht gezeigt werden (Lacoste et al., 2004). Dafür bindet K-bzip zelluläre Faktoren wie C/EBP α und induziert als Proteinkomplex die Transkription seines eigenen Promotors (Wang et al., 2003). Die Expression von K-bzip in latent HHV-8-infizierten Zellen führt allerdings nicht zur Einleitung des lytischen Replikationszyklus von HHV-8 (Sun et al., 1998; Polson et al., 2001). K-bzip interagiert mit HHV-8 ORF50 und beeinflusst dessen Transaktivierungspotential in Abhängigkeit des Promotors (Liao et al., 2003; Izumiya et al., 2003a). K-bzip wirkt wie BZLF1 dem programmierten Zelltod entgegen. So interagiert es mit p53 über seine Leucinzipperdomäne und hemmt die p53-vermittelte Apoptose (Park et al., 2000). K-bzip blockiert außerdem den Zellzyklus in der G1-Phase, in

dem es wie BZLF1 die Expression von C/EBP α und p21 induziert (Wu et al., 2003; Izumiya et al., 2003a).

2.5.3 PLHV-1 ORF57

Der orf57 ist ein in α -, β - und γ -Herpesviren hoch konserviertes Gen. Dies weist auf seine Bedeutung für den Infektionszyklus der Viren hin (Boyne & Whitehouse, 2006). Im Aminosäuresequenzvergleich mit anderen γ -Herpesviren zeigt das ORF57-Protein von PLHV-1 die größte Homologie zu AIHV-1 ORF57 (44,4%) (Abschnitt 2.4.1; Tab. 3). Die Übereinstimmungen zu HHV-8 ORF57 und EBV BMLF1 sind mit 30,5% und 28,3% etwas geringer. Innerhalb der PLHV kann von der größten Homologie zwischen PLHV-1 und PLHV-2 ausgegangen werden, obwohl entsprechende Sequenzdaten für PLHV-2 fehlen. Die Übereinstimmung zu PLHV-3 ORF57 liegt bei 78%. Das orf57-Transkript der PLHV und anderer γ -Herpesviren wie z.B. HHV-8, AIHV-1 und EBV ist einfach gespleißt und besteht aus zwei Exons, 57a und 57b (Abb. 7). Das translatierte Protein von PLHV-1 hat eine Größe von 431 AS. Die Analyse der AS-Sequenz bekannter, homologer ORF57-Proteine identifizierte ein potentiellies Kernlokalisierungssignal (NLS) an der Position AS 67-70 (Abb. 7). Im C-terminalen Bereich von PLHV-1 und PLHV-3 ORF57 wurde außerdem ein Leucinzippermotiv zwischen L³¹⁵ und L³³⁶ gefunden (Abb. 7). An vergleichbarer Position wurde ein Leucinzipper auch in HHV-8 ORF57 identifiziert (Gupta et al., 2000). Am C-Terminus konnte ebenfalls ein hydrophobes GLFF-Motiv (AS 421-424) lokalisiert werden, das auch in anderen γ -Herpesviren wie AIHV-1, HHV-8, EBV und HVS hochkonserviert ist. In HVS ORF57 ist diese AS-Region in die Regulation der Genexpression involviert (Goodwin et al., 2000).

die Stabilität und den Transport von viralen und zellulären mRNAs zwischen Zellkern und Zytoplasma (Hardy et al., 1994; Buisson et al., 1999; Malik et al., 2004b; Nicewonger et al., 2004). Es bindet RNA *in vitro* und *in vivo* (Ruvolo et al., 2001; Mears et al., 1996) und transportiert diese unter Beteiligung von zellulären Proteinen des Kernexportweges wie REF (*RNA export factor*) und TAP (*transport activating protein*) ins Zytoplasma (Sandri-Goldin, 1998; Koffa et al., 2001; Hiriart et al., 2003; Malik et al., 2004b). Der EBV BMLF1-vermittelte Export von viralen mRNAs führt vor allem zur zytoplasmatischen Akkumulation solcher EBV-Transkripte, die für die EBV-Replikation bzw. die Reifung der infektiösen Viruspartikel wichtig sind (Farjot et al., 2000; Semmes et al., 1998; Batisse et al., 2005). Somit wird die Expression dieser viralen Proteine verstärkt. Für den zytoplasmatischen Export besitzt EBV BMLF1 ein leucinreiches Kernexportsignal (NES), an das die Exportfaktoren binden (Boyle et al., 1999; Chen et al., 2001). In HHV-8 führt die Expression von ORF57 zur Akkumulation einiger viraler Transkripte wie *nut-1* (PAN RNA) oder *orf59* (Kirshner et al., 2000). In Abhängigkeit von der Struktur der mRNA reguliert somit ORF57 differentiell die zelluläre und virale Genexpression. Neben der Funktion als post-transkriptionaler Regulator konnte die Interaktion von ORF57 mit ORF50 in HHV-8 (Malik et al., 2004a), VZV (Spengler et al., 2000) und HSV-1 (Panagiotidis et al., 1997) gezeigt werden. Die ORF57-homologen Proteine aus HSV-1 (ICP27) und HCMV (UL69) besitzen außerdem antiapoptotische Funktionen. Beide Proteine blockieren den Zellzyklus in der G1-Phase (Lu & Shenk, 1999; Flemington, 2001).

2.6 Ziele der Arbeit

Bei der Nutzung des Schweins als Spendertier für die Xenotransplantation besteht die Gefahr der Übertragung von porzinen Herpesviren auf den Organrezipienten. PLHV-1 ist ursächlich an einer lymphoproliferativen Erkrankung in experimentell immunsupprimierten, transplantierten Schweinen beteiligt, die der EBV-assoziierten PTLD des Menschen ähnelt. Über ein porzines Transplantat könnte PLHV-1 auf den Menschen übertragen werden und in diesem eine PTLD-ähnliche Erkrankung hervorrufen. Darüber hinaus ist eine Reaktivierung von persistierenden Herpesviren im Rezipienten möglich, die bedingt durch die Immunsuppression zu ernsthaften Sekundärinfektionen im Patienten und zur vorzeitigen Abstoßung des Transplantates führen könnten.

Zur Abschätzung des Gefährdungspotentials von PLHV-1 in Bezug auf die Xenotransplantation sollten putative *immediate early*-Proteine untersucht werden. Diese regulieren in Herpesviren den Infektionszyklus und induzieren bei einer latenten Infektion den lytischen Vermehrungszyklus. Im Genom von PLHV-1 wurden drei Gene identifiziert, deren Proteinprodukte (ORF50, ORFA6/BZLF1_h, ORF57) Homologien zu den Regulatorproteinen des EBV (BRLF1, BZLF1, BMLF1) und HHV-8 (ORF50, K-bzip, ORF57)

zeigen. Während BZLF1 und BRLF1 in EBV als Transkriptionsaktivatoren für den Übergang von der latenten in die lytische Infektionsphase fungieren, übernimmt in HHV-8 der ORF50 diese Funktion. ORF57 wirkt dagegen vorrangig auf posttranskriptionaler Ebene und ist essentiell für die lytische Replikation der Viren.

Ein Aspekt dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57 als Transkriptionsaktivatoren für PLHV-1-Promotoren wirken. Dazu sollte die Induktion von verschiedenen *immediate early*- (orf50, orfA6/BZLF1), *early*- (orf57, orf59, orf09/DNA-Polymerase) und *late*-Promotoren (orf08/Glykoprotein B) durch die PLHV-1-Proteine in einem Luziferase-Reportergenassay untersucht werden. Durch Transfektion von latent PLHV-infizierten B-Zellen mit PLHV-1 ORF50- bzw. ORFA6/BZLF1_h-Expressionsplasmiden sollte dann geklärt werden, ob diese Proteine den Übergang der PLHV von der Latenz in die lytische Phase induzieren. Bei erfolgreicher Reaktivierung der PLHV würde damit ein Zellkultursystem zur Anzucht der Viren zur Verfügung stehen, die Infektionsstudien an humanen Zellen oder virusnegativen Tieren ermöglichen würden. In einem weiteren Ansatz sollten EBV-positive B-Zellen mit PLHV-positiven B-Zellen kokultiviert werden, um eine Virusreaktivierung zu erreichen. Ziel weitergehender Untersuchungen war es, eine mögliche synergistische oder antagonistische Wirkung der PLHV-1-Proteine ORF50 und ORFA6/BZLF1_h bzw. ORF50 und ORF57 auf die Aktivität verschiedener PLHV-1-Promotoren zu prüfen. Eventuelle Interaktionen zwischen den PLHV-1-Proteinen sollten anschließend mittels Koimmunpräzipitation belegt werden. Um eine synergistische Wechselwirkung zwischen PLHV-1 und EBV auf molekularer Ebene zu untersuchen, sollten Experimente zur Transaktivierung von EBV-Promotoren durch PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h erfolgen, sowie die Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch EBV BZLF1 und BRLF1 studiert werden. Durch Transfektion von PLHV-1 ORF50- bzw. ORFA6/BZLF1_h-Expressionsplasmiden in latent EBV-infizierte B-Zellen war zu prüfen, ob die Induktion der lytischen EBV-Replikation stattfindet. Entsprechend sollte die Reaktivierung von PLHV durch EBV BZLF1 bzw. BRLF1 in PLHV-positiven B-Zellen erfolgen.

3. Material

3.1. Gewebe

Die Lymphknotenpräparate stammten von einem experimentell transplantierten Miniaturschwein (Tier-Nr. 13432), welches an PTLD erkrankt war. Das Material diente zur Isolierung von PLHV-1 RNA, die nachfolgend in cDNA (1776) umgeschrieben wurde. Die Lymphknoten wurden freundlicherweise von Dr. Christine Huang vom Massachusetts General Hospital in Boston/USA zur Verfügung gestellt. Aus der Milz eines PLHV-1-positiven Schweines wurde DNA (56a) präpariert und diente für Klonierungszwecke. Das Material wurde freundlicherweise von Dr. M. Domingo, Universität Barcelona, Spanien zur Verfügung gestellt.

3.2. Zellen

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

	Zellen	Zelltyp	Herkunft
adhärent	PK15	Schweineniere	Stammsammlung, Robert Koch-Institut (RKI)
	293-Graham	humane embryonale Niere	Stammsammlung, RKI
	IPAM 3D4/2	porzine alveolare Makrophagen	Stammsammlung, RKI
Suspension	L23	porzine B-Zellen	Europäische Zellbank (ECACC)
	B95-8	Krallenaffen-B-Zellen	ECACC

Die in Suspension wachsenden L23-Zellen sind mit PLHV-3 infiziert. Die Virus-Replikation dieser Zellen wurde durch verschiedene Chemikalien stimuliert (Chmielewicz, 2002). Die B95-8-Zellen sind latent mit dem humanen Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert.

3.3 Bakterien

verwendete *E. coli*-Stämme

DH5 α Herkunft: Invitrogen, Carlsbad/USA
TOP10' Herkunft: Invitrogen, Carlsbad/USA

3.4 Nukleinsäuren und Nukleotide

-DNA aus PLHV-1-positiven Proben

Für die Klonierung von PLHV-1-Genen in Expressionsvektoren wurde DNA (56a) aus der Milz eines PLHV-1 positiven Schweines verwendet (Herkunft; siehe 3.1 Gewebe). Die RNA wurde aus dem Lymphknotenpräparat eines PLHV-1 positiven Schweines isoliert und in cDNA umgeschrieben (Herkunft; siehe 3.1 Gewebe).

- DNA aus Kalbsthymus (c=120 ng/μl), Herkunft: Boehringer, Mannheim/D

Tabelle 5: PCR - Primer zur Klonierung in pCR3.1-uni

Primer	Sequenz (5'→3')	Zielgen/ PLHV-1	Produktgröße	nested PCR
1911 s 1911 as	TTGATGGTTAAACTTGTTAGACA AAAACCCTAGGTAACAGATTTAG	orfA6/BZLF1g	743 bp	1. Runde
1912 s-P 1912 as	P-TTAGACAACACTATGAGTGATAACTCTGCTA AACCCCTAGGTAACAGATTTAGTCTACTT	orfA6/BZLF1g	725 bp	2. Runde
1911 s 1911 as	TTGATGGTTAAACTTGTTAGACA AAAACCCTAGGTAACAGATTTAG	orfA6/BZLF1sp	564 bp	1. Runde
1912 s-P 1912 as	P-TTAGACAACACTATGAGTGATAACTCTGCTA AACCCCTAGGTAACAGATTTAGTCTACTT	orfA6/BZLF1sp	546 bp	2. Runde
1821 s 1821 as	TCCTGACTGCAATTCAATCCA CAAACCACAAAATCATGAAGC	orf50sp	1605 bp	1. Runde
1733 s-P 1733 as	P-CATCAATATGGATAGCCTAC ATCTATTTACAGAACCAGTC	orf50sp	1546 bp	2. Runde
2897 s 2897 as	TTGGTTTTGACTTTTATGAGCCAG GCATGTCTTAGTTTTATTTACTATTTCC	orf57g	1631 bp	1. Runde
1734 s-P 1734 as	P-CAAATGCAACAATAACAGAC TTTACTATTTCTTTTTTACA	orf57g	1580 bp	2. Runde
1993 s-P 1993 as	P-TAACTGAGTAG TCGACTAGGATCCT ATTTCAA AATTGACTCAT CAGCTGATCCTAGG ATAAAGT	-	32 bp	-

(fett hervorgehoben sind die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *SalI* und *BamHI*
P: phosphorylierter Primer; g-genomisch; sp-gespleißt)

Tabelle 6: PCR - Primer zur Klonierung von Fusionsproteinen

Primer	Sequenz (5'→ 3')	Zielgen/ PLHV-1	Produktgröße	Markierung
2232 s-P 2232 as	P-ATGATGGAATATCCTTATGACGTTCTGACTAT <u>GCCACGAGTGATAACTCTGCTATGACAG</u> CTATTTAGTCTACTTGAACAAATTGAGTATCTGGA	orfA6/BZLF1g	738 bp	HA N-terminal
2233 s-P 2233 as	P-ATGATGGGTGATAACTCTGCTATGACAG <u>TCAGGCATAGTCAGGAACGTCATAAGGATAGTAG</u> TCTACTTGAACAAATTGAGTATCTGGA	orfA6/BZLF1g	731 bp	HA C-terminal

Primer	Sequenz (5'→ 3')	Zielgen/ PLHV-1	Produktgröße	Markierung
2232 s-P 2232 as	P-ATGATGGAATATCCTTATGACGTTCTGACTAT <u>GCCACGAGTGATAACTCTGCTATGACAG</u> CTATTTAGTCTACTTGAACAAATTGAGTATCTGGA	orfA6/BZLF1sp	559 bp	HA N-terminal
2233 s-P 2233 as	P-ATGATGGGTGATAACTCTGCTATGACAG <u>TCAGGCATAGTCAGGAACGTCATAAGGATAGTAG</u> TCTACTTGAACAAATTGAGTATCTGGA	orfA6/BZLF1sp	552 bp	HA C-terminal
2840 s-P 2840 as	P-ATGATGGTTTATCCTTATGACGTTCTGACTATG <u>CCACCACGGCACAAGAGGCAATA</u> GAGCATGTCTTAGTTTTATTACTATTTTC	orf57g	1447 bp	HA N-terminal
2841 s-P 2841 as	P-ACCATGGCACAAGAGGCAATA <u>TTAGGCATAGTCAGGAACGTCATAAGGATATTTCC</u> TTTTTACAAGGGGAAA	orf57g	1416 bp	HA C-terminal
2989 s 2989 as	CGGAATTC GGATGGATAGCCTACAAAAAATGA CAC TCCGCTCGAG TTACAGAACCAGTCTTTGGGCTAC	orf50g	2505 bp	c-Myc N-terminal
2989 s 2989 as	CGGAATTC GGATGGATAGCCTACAAAAAATGA CAC TCCGCTCGAG TTACAGAACCAGTCTTTGGGCTAC	orf50sp	1553 bp	c-Myc N-terminal
2919 s-P 2280 as	P-AGCATGGTTGACTACAAGGACGACGACGACAA <u>GGATAGCCTACAAAAAATGACA</u> TTACAGAACCAGTCTTTGGGCTAC	orf50sp	1563 bp	FLAG N-terminal
2920 s-P 2921 as	P-ATGGATAGCCTACAAAAAATGACA <u>TTACTTGTCTCGTCTGTCCTTGTAGTCCAGAACC</u> AGTCTTTGGGCTAC	orf50sp	1557 bp	FLAG C-terminal

(HA=Hämagglutinin; unterstrichen hervorgehoben ist die HA-tag- bzw. FLAG-tag Sequenz; fett hervorgehoben sind die Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *XhoI*; P: phosphorylierter Primer; g-genomisch; sp-gespleißt)

Tabelle 7: PCR-Primer zur Klonierung in pGL3-basic

Primer	Sequenz (5'→ 3')	Zielpromotor/ Virus	Produktgröße	nested PCR
2051 s 2051 as	TAACCCGGG TTTCAGGTTTCAGTTTCAGGACA TAACCCGGG CTTCTTTTATCCATGGGTGTCA	orf50/ PLHV-1	1217 bp	1. Runde
2052 s 2052 as	TAACCCGGG AGGTTTCAGTTTCAGGACACTGG TAACCCGGG CCCTTCTTTTATCCATGGGTGT	orf50/ PLHV-1	1215 bp	2. Runde
2054 s 2053 as	TAACCCGGG GTCTCCATAACTCTTGCCGTATT TAACCCGGG TTTTGTTCAGGATACTCCTATGGAC	orf59/ PLHV-1	1312 bp	1. Runde
2053 s 2054 as	TAACCCGGG AACTCTTGCCGTATTTACCCC TAACCCGGG TAACATGTCATCCTTTCAGTGTCTAA	orf59/ PLHV-1	1240 bp	2. Runde
2056 s 2056 as	TAACCCGGG CCGAAGTCAGAGTCAAAGCTG TAACCCGGG CATAGTTGTCTAACAAGTTTAACCATC	orfA6/BZLF1 _h PLHV-1	1309 bp	1. Runde
2055 s 2055 as	TAACCCGGG GAGCCGAAGTCAGAGTCAAAGC TAACCCGGG TGTCTAACAAGTTTAACCATCAAGG	orfA6/BZLF1 _h PLHV-1	1305 bp	2. Runde
2057 s 2057 as	TAACCCGGG AGGAATGTCCTACAGATGAGGC TAACCCGGG ATAGAAGAGCATACAGGTCTTTAAATAT	orf08/gB PLHV-1	1305 bp	1. Runde

Primer	Sequenz (5' → 3')	Zielpromotor/ Virus	Produkt- größe	nested PCR
2058 s 2058 as	TAACCCGGG GAATGTCCTACAGATGAGGCACC TAACCCGGGAAGAGCATAACAGGTCTTTAAATATCC	orf08/gB PLHV-1	1299 bp	2. Runde
2059 s 2060 as	TAACCCGGG ACTTATTCCAGGAGATCACGACG TAACCCGGGAATACGGGTTAAAGAACGACATAT	orf09/DPol PLHV-1	1501 bp	1. Runde
2060 s 2059 as	TAACCCGGG GACGTCAGGCAGAATCTACTACTG TAACCCGGGCGGGTTAAAGAACGACATATTCAA	orf09/DPol PLHV-1	1478 bp	2. Runde
2061 s 2061 as	TAACCCGGG GAGACTCCCACCAGGTTTACTTT TAACCCGGGAATTCTATGCTCTATCTGCTGTAG	orf57/ PLHV-1	-	1. Runde
2062 s 2062 as	TAACCCGGG GAGACTCCCACCAGGTTTACTTT TAACCCGGGGTTACAACCTGAATTCCTATGCTC	orf57/ PLHV-1	1043 bp	2. Runde
2552 s 2552 as	CAGAAGGAGGAAGCAGCCATAT CGAGTTTGGGTCCATCATCTTC	orfBZLF1/ EBV	462 bp	1. Runde
2553 s 2553 as	TAAGCTAGC GGACGAACTGACCACAACACT TAA AGCTT CTTCAGCAAAGATAGCAAAGG	orfBZLF1/ EBV	397 bp	2. Runde
2554 s 2554 as	TGCCTCCCTGTTATAACAATAGC CATGGTCATAGCACTTGGACA	orfBMRF1/ EBV	488 bp	1. Runde
2555 s 2555 as	TAAGCTAGC TATAACAATAGCATGACAGCCAAGG TAA AGCTT ATCACAAGCAGCAGCAGAAGC	orfBMRF1/ EBV	424 bp	2. Runde
2556 s 2556 as	TTTGGAGACCCGTCACGATA TGCGCTGAATACATAGACCTACT	orfBRLF1/ EBV	632 bp	1. Runde
2557 s 2557 as	TAAGAGCTC GTCTCACCTGGAATAACACCCA TA AGCTAGC TGTTCTGCCATGCAATACAAAT	orfBRLF1/ EBV	543 bp	2. Runde
2558 s 2558 as	AACCTTCTGCTACCACATCG TCTGTGGAGTGTTCTTCGCT	orfBMLF1/ EBV	776 bp	1. Runde
2559 s 2559 as	TAAGTACC CGGATGATGGGCGTGACTA TAA AGCTT TGTCTGAGACCGCTTCGAGTT	orfBMLF1/ EBV	719 bp	2. Runde

(fett hervorgehoben sind die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Xma*I, *Sac*I, *Nhe*I, *Hind*III, *Kpn*I)

Tabelle 8: Primer für quantitative real time-PCR

Primer	Sequenz (5' → 3')	Zielgen/ Organismus	Produktgröße
1156 s 1156 as	AAGGACCCCAAAGAGGAAA CTGAGGCACTGCATACTCTGT	orf08/gB PLHV-3	74 bp
1156-Sonde	FAM-CTGGTCTACTGAAGCGCTGCCAATAG-TAMRA		
059 s 059 as	CGTTTCATCTGTCTTTCCCTTGATG AAGACAGGTCTGACTGCTCCG	β2-Microglobulin Schwein	139 bp
059-Sonde	FAM-TTCAGGTTTACTCACGCCACCCAGC-TAMRA		
2816 s 2816 as	GGCCTTGCGAACAAATTATTAGT GGCGTGTTTACACCAACTTGAT	intergenisch EBV	223 bp
2816-Sonde	FAM-CTACCAACAAGGGCCCCCAGATGCC-TAMRA		
3351 s 3351 as	CATCTGCACTGCCAAGACTGAG TGCAATCCAGCTAGGCATG	Cyclophilin A Krallenne	325 bp
3351-Sonde	FAM- TTCTTGCTGGTCTTGCCATXCCTGGA X=TAMRA		

Tabelle 9: PCR - Primer für 3'RACE-PCR

Primer	Sequenz (5'→ 3')	Zielgen/ Virus	Produktgröße
2410 s	GACGACCTCACCAGACGAAT	Exon 1-3 orfA6/BZLF1g PLHV-1	774 bp
2498 s	AATGCAGACTTCATGCCAAGA	Exon 2-3 orfA6/BZLF1g PLHV-1	530 bp
2500 s	GTCCCTGACTGCCGAAAATAA	Exon 3 orfA6/BZLF1g PLHV-1	338 bp
2410 s	GACGACCTCACCAGACGAAT	Exon 1-3 orfA6/BZLF1sp PLHV-1	595 bp
2498 s	AATGCAGACTTCATGCCAAGA	Exon 2-3 orfA6/BZLF1sp PLHV-1	432 bp
2500 s	GTCCCTGACTGCCGAAAATAA	Exon 3 orfA6/BZLF1sp PLHV-1	338 bp
2464 s	TACTGGACTTTGAAGAACAGCAGG	orf50sp PLHV-1	495 bp
2842 s	TAAAGCAGTATGAGCCTGGTATGG	orf57g PLHV-1	409 bp

(g-genomisch; sp-gespleißt)

3.5 Enzyme, DNA-Marker und Antikörper

3.5.1 Enzyme

AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City/USA
Expand High Fidelity DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Carlsbad/USA
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Groningen/NL
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Eco</i> RI	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Hind</i> III	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Nhe</i> I	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Sal</i> I	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Sac</i> I	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Hpa</i> I	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Kpn</i> I	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Nco</i> I	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Xma</i> I	New England Biolabs, Beverly/USA
<i>Psp</i> AI	Stratagene
<i>Xho</i> I	New England Biolabs, Beverly/USA
Proteinkinase K	Qiagen, Valencia/USA
Complete Mini (Protease-Inhibitor Cocktail)	

Tabletten)	Roche Diagnostics, Mannheim/D
RNase	Qiagen, Valencia/USA
DNaseI	Roche Diagnostics, Mannheim/D
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Beverly/USA
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Beverly/USA

3.5.2 Marker

ϕ X174 DNA- <i>Hae</i> III Digest	New England Biolabs, Beverly/USA
λ DNA- <i>Hind</i> III Digest	New England Biolabs, Beverly/USA
λ DNA- <i>Bst</i> EII Digest	New England Biolabs, Beverly/USA
100 bp DNA ladder	New England Biolabs, Beverly/USA
Pager Ruler TM , Protein ladder	Fermentas, Vilnius/Litauen

3.5.3 Antikörper

Maus anti-c-Myc, monoklonal	Sigma, St. Louis/USA
Maus anti-c-Myc, clone 9E10, monoklonal	Covance, Berkeley/USA
Maus anti-HA, clone 16B12, monoklonal	Covance, Berkeley/USA
Kaninchen anti-HA, polyklonal	Covance, Berkeley/USA
Kaninchen anti-c-Myc, polyklonal	Covance, Berkeley/USA
Normales Kaninchenserum	Calbiochem, Darmstadt/D
Ziege anti-Maus IgG, Peroxidase-konjugiert	Dianova, Hamburg/D
Ziege anti-Maus IgG, Rhodamin-Red-konjugiert	Dianova, Hamburg/D

3.6 Vektoren

pGL3-basic	Promega, Madison/USA
pCR3.1-uni	Invitrogen, Groningen/NL
pCMV-myc	BD Biosciences, Palo Alto/USA
pCMV-HA	BD Biosciences, Palo Alto/USA
pEGFP-N3	BD Biosciences, Palo Alto/USA
pRSV- β gal	Mac Gregor et al., 1987

3.7 Reagenziensätze (Kits)

ABI Prism TM BigDyeTerminators v 3.0 CycleSequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City/USA
AmpliTaq Gold TM	Applied Biosystems, Foster City/USA
DNeasy TM Tissue Kit	Qiagen, Valencia/USA

Dual Light Kit	Applied Biosystems, Foster City/USA
ECL Western blotting detection reagents and analysis system	Amersham, Buckinghamshire/UK
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden/D
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Valencia/USA
Eukaryotic TA Cloning Kit (unidirectional)	Invitrogen, Groningen/NL
Expand™ High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim/D
First Choice™ RLM-RACE Kit	Ambion, Austin/USA
GenePorter™ 2 Transfection Reagent	Peqlab, Erlangen/D
PerfectPrep Gel Cleanup Kit	Eppendorf, Hamburg/D
Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Carlsbad/USA
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Valencia/USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden/D

3.8 Chemikalien und Biochemikalien

Alle allgemein verwendeten Chemikalien / Biochemikalien sind in dieser Liste vertreten. Methoden-spezifische Chemikalien / Biochemikalien sind im Abschnitt 3.9 unter der jeweiligen Methode aufgeführt.

Bidestilliertes Wasser (ddH ₂ O)	Fluka, Buchs/CH
Bisbenzimid-Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258)	Molecular Probes, Eugene/USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Beverly/USA
Ethanol	Merck, Darmstadt/D
Ethylendiamintetracetylsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt/D
Formamid	Merck, Darmstadt/D
Glycerin (87%)	Merck, Darmstadt/D
Glycin	Merck, Darmstadt/D
Hühnerei-Ovalbumin (98%)	Sigma, Steinheim/D
Hoechst H33258	Molecular Probes, Eugene/USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt/D
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell/D
Magnesiumdichlorid	Merck, Darmstadt/D
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt/D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt/D

Natriumhydroxid		Merck, Darmstadt/D
Salzsäure, rauchend		Merck, Darmstadt/D
Stickstoff		Linde, Wiesbaden/D
Sucrose		Merck, Darmstadt/D
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)		Merck, Darmstadt/D
Triton X-100		Merck, Darmstadt/D
Tween 20		Merck-Schuchart, Hohenbrunn/D

3.9 Puffer und Lösungen

Bakterienkultur

LB-Agar	17 g/l	Bacto-Agar in LB-Flüssigmedium
LB-Flüssigmedium	10g/l	Bacto-Trypton
	5 g/l	Bacto-Yeast-Extrakt
	10 g/l	NaCl pH 7,5 sterilfiltriert
SOC-Medium		Invitrogen, Carlsbad/USA

Zellkultur

D-MEM		Life Technologies, Paisley/UK
RPMI 1640		Life Technologies, Paisley/UK
FKS (Fötales Kälberserum)		Life Technologies, Paisley/UK
Natriumpyruvat		Gibco™, UK
L-Glutamin		Sigma, St. Louis/USA
nicht-essentielle Aminosäuren		Gibco™, UK
Penicillin/Streptomycin (100x)		Gibco™, UK
Ampicillin		Sigma, St. Louis/USA
β-Mercaptoethanol		Gibco™, UK
TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat)		Sigma, St. Louis/USA
Trypsin		Life Technologies, Paisley/UK
Trypsin EDTA	0,25%	Trypsin
	3 mM	EDTA in PBS, pH 7,2
Trypanblau		Serva, Heidelberg/D
Trypanblaulösung	0,25 %	Trypanblau in PBS
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Merck, Darmstadt/D

adhärent wachsende Zellen

293-Graham-Zellen	5% (v/v)	FKS in D-MEM
	1% (v/v)	Penicillin-Streptomycin
PK15-Zellen	10% (v/v)	FKS in D-MEM
	1% (v/v)	Penicillin-Streptomycin
IPAM	10% (v/v)	FKS in RPMI 1640
	1% (v/v)	L-Glutamin
	1% (v/v)	Penicillin-Streptomycin
<i>Suspensionszellen</i> (L23, B95-8)	10% (v/v)	FKS in RPMI 1640
	2 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natriumpyruvat
	0,05 mM	Mercaptoethanol
	1% (v/v)	Penicillin-Streptomycin
Einfriermedium	50% (v/v)	D-MEM oder RPMI 1640
	40% (v/v)	FKS
	10% (v/v)	DMSO
PBS-Puffer	140 mM	NaCl
	2 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	2 mM	KH ₂ PO ₄

PCR

dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate)		Applied Biosystems, Foster City/USA
PCR-Puffer		Applied Biosystems, Foster City/USA
MgCl ₂		Applied Biosystems, Foster City/USA
ROX		Invitrogen, Carlsbad/USA

Agarosegelelektrophorese

Agarose		Life Technologies, Paisley/UK
Ethidiumbromid		Biomol, Hamburg/D
Bromphenolblau		Serva, Heidelberg/D
Laufpuffer, Standardgel	2 x oder	TBE, verdünnt mit ddH ₂ O
	0,5 x	TAE, verdünnt mit ddH ₂ O

TBE-Puffer (10x)	1 M	Tris
	0,9 M	Borsäure
	0,01 M	EDTA; pH 8,4
	0,4 µg/ml	Ethidiumbromid
TAE-Puffer	40 mM	Tris-HCL, pH 7,9
	10 mM	Natriumacetat
	2 mM	EDTA
	0,4 µg/ml	Ethidiumbromid
Ethidiumbromid-Lösung	10 g/l	Ethidiumbromid in ddH ₂ O
Probenpuffer, Standardgel	7 Teile	70% Sucrose
	5 Teile	Bromphenolblau-Lösung gesättigt in ddH ₂ O

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamid-Bis 30% (37,5:1)		Merck, Darmstadt/D
Ammoniumpersulfat (APS)		Life Technologies, Paisley/UK
Tetramethylethyldiamin (TEMED)		Roth, Karlsruhe/D
SDS (Natriumdodecylsulfat)		Merck, Darmstadt/D
NP-40 (Ipegal)		Sigma, St. Louis/USA
n-Butanol		Merck, Darmstadt/D
Roti [®] -Blue		Roth, Karlsruhe/D
β-Mercaptoethanol		Roth, Karlsruhe/D
Gelseal		Amersham, Buckinghamshire/UK
Lysispuffer	150 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	20 mM	Tris
	1 % (v/v)	NP40 (Ipegal)
	1 mM	EDTA
		frisch zugesetzt: 1 Tabl. Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche) pro 10 ml; Benzonase Nuklease (50 U / 5 ml)
Ammoniumpersulfat-Lösung	10% (w/v)	APS in ddH ₂ O

Coomassie-Blau-Lösung	20 ml	Methanol p.A.
	60 ml	ddH ₂ O
	20 ml	Roti®-Blue (5x)
Coomassie-Blau-Entfärbelösung	100 ml	Methanol p.A.
	20 ml	Essigsäure
	280 ml	ddH ₂ O
SDS-Laufpuffer	25 mM	Tris
	200 mM	Glycin
	0,1% (v/v)	SDS in ddH ₂ O, pH 8.5
SDS-Lösung	10% (w/v)	SDS in ddH ₂ O
SDS-Probenpuffer (2x)	250 mM	Tris-HCl, pH 6.8
	4 % (w/v)	SDS
	20 % (v/v)	Glycerin
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
	5% (v/v)	β-Mercaptoethanol in ddH ₂ O (frisch zugesetzt)
Sammelgelpuffer	1 M	Tris-HCl in ddH ₂ O, pH 6.8
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl in ddH ₂ O, pH 8.8
<u>Westernblot</u>		
Amidoschwarz 10 B		Serva, Heidelberg/D
Ponceau S Solution (0,1%)		Sigma, St. Louis/USA
Amidoschwarz-Entfärbelösung	90 ml	Methanol p.A.
	20 ml	Essigsäure
	90 ml	ddH ₂ O
Amidoschwarz-Lösung	0,2 g	Amidoschwarz 10 B
	90 ml	Methanol p.A.
	20 ml	Essigsäure
	90 ml	ddH ₂ O
Transferpuffer	10 ml	Methanol p.A.
	30 ml	Elektrophoresepuffer
	50 ml	ddH ₂ O

Waschpuffer		PBS
	0,05 % (v/v)	Tween 20
Blockpuffer I		Waschpuffer
	5 % (w/v)	Magermilchpulver
Blockpuffer II		Waschpuffer
	0,5 % (w/v)	Magermilchpulver

Immunfluoreszenz (IFA)

4',6-Diamidino-2'- Phenylindoldihydrochlorid (DAPI)		Merck, Darmstadt/D
Paraformaldehyd		Merck, Darmstadt/D
Immumount		Shandon, USA
Fixierlösung		PBS
	3,7 % (v/v)	Paraformaldehyd
	0,1 % (v/v)	Triton X-100
Blockpuffer III		Waschpuffer
	1 % (v/v)	BSA
DAPI	1:20000	in ddH ₂ O

Koimmunpräzipitation (Ko-IP)

Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow		Amersham Biosciences, Freiburg/D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMWS)		Sigma, St. Louis/USA
Natriumorthovanadat		AppliChem, Darmstadt/D
Natriumfluorid		Merck, Darmstadt/D
Lysispuffer	50 mM	Tris-HCl pH=7,5
	120 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
	50 mM	NaF (frisch zugesetzt)
	0,2 mM	Na ₃ VO ₄ (frisch zugesetzt)
	0,1 mM	PMSF (frisch zugesetzt)
	0,1 % (v/v)	NP40 (frisch zugesetzt)
		+ 1 Tabl. Complete Mini (Protease- Inhibitorcocktail)
Waschpuffer	20 mM	Tris-HCl pH=7,5
	120 mM	NaCl

2 mM	EDTA
50 mM	NaF (frisch zugesetzt)
0,2 mM	Na ₃ VO ₄ (frisch zugesetzt)
0,1 mM	PMSF (frisch zugesetzt)
0,1 % (v/v)	NP40 (frisch zugesetzt)
	+ 1 Tabl. Complete Mini (Protease-Inhibitorcocktail)
0,1 % (w/v)	Hühnerei-Ovalbumin

Luziferase-Reportergenassay

Dithiothreitol (DTT)		Gibco™, UK
DTT	0,1 M	Gibco™ / UK
Dual Light Puffer A		Applied Biosystems, Foster City/USA
Dual Light Puffer B		Applied Biosystems, Foster City/USA
Galacton-Plus		Applied Biosystems, Foster City/USA
Lysispuffer		Applied Biosystems, Foster City/USA
Accelerator II		Applied Biosystems, Foster City/USA

3.10 Geräte und Laborhilfsmittel

ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer		Applied Biosystems, Foster City/USA
Analysenwaage		Sartorius, Göttingen/D
Chemiluminescent Detection Film		Roche, Indianapolis/USA
cLSM (Konfokales Laserscannmikroskop)		Zeiss, Jena/D
Elektroporator, GenePulser™ II		Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Entwickler für Röntgenfilme, Curix 60		Agfa, Köln/D
Fluorometer (TD-360 Mini)		Turner Designs, Sunnyvale/USA
Fotodokumentationssystem		INTAS, Göttingen/D
Gefrierschränke		Heraeus, Osterode/D
	-80°C	Liebherr, Biberach an der Riß/D
	-20°C	Bosch, Stuttgart/D
Gelelektrophoresekammer		Biometra, Göttingen/D
Gelgießapparatur		Hoefer Scientific Instrument, San Fransico/USA
Glaswaren (Kolben, Pipetten etc.)		Brand, Wertheim/D
Kühlschränke		Bosch, Stuttgart/D
		Liebherr, Biberach an der Riß/D

Luminometer MicroLumat Plus LB96V	EG&G Berthold, Bad Wildbach/D
Magnetrührer	IKA-Werk, Staufen im Breisgau/D
Mikroskope	Zeiss, Jena/D Nikon, Tokio/J
Mikrowelle	Sharp Electronics Corp., USA
Neubauer-Zählkammer	Kühn & Bayer, Nidderau/D
NanoDrop-Spektrophotometer (ND-1000)	Peqlab, Erlangen/D
pH-Messgerät	Beckman, Palo Alto/USA
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, UK
Pipetten	Gilson, Columbus/USA Eppendorf, Hamburg/D
QIAvac 6S-Apparatur	Qiagen, Valencia/USA
Rotator	Rettberg, Göttingen/D
Schüttler	New Brunswick Scientific, New Jersey/USA
Schwenkplattform	Biometra, Göttingen/D
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen/D Hoefer Scientific Instruments San Fransico/USA Life Technologies, Paisley/UK
SpeedVaC-Zentrifuge	Savant, Hicksville/USA
Thermocycler	Biometra, Göttingen/D Applied Biosystems, Foster City/USA
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd/D
UV-Handlampe	Novodirect, Karlsruhe/D
Vortex	Roth, Karsruhe/D
Wasserbäder	GFL, Burgwedel/D Haake, Karlsruhe/D
<u>Zentrifugen</u>	
Tischzentrifuge	Heraeus, Osterode/D
Variofuge 3.0 R	Heraeus, Osterode/D
RC5C plus	Sorvall, Newtown/USA
Mikrozentrifuge	Labnet, USA

3.11 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Roth, Karlsruhe/D
Elektroporationsküvetten	Peqlab, Erlangen/D
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Einbeck/D
Immobilon™-P Transfer-Membran	Millipore, Bredford/USA
Kulturflaschen	Nunc, Roskilde/DK
Kulturplatten (6-, 24-, 48 Lochplatten)	Nunc, Roskilde/DK
Kryogefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Nunc, Roskilde/DK
Objektträger	Roth, Karlsruhe/D
PCR-96-Lochplatten,	ABgene, Epsom/UK
Thermo-Fast 96, non-skirted	Eppendorf, Hamburg/D
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Applied Biosystems, Foster City/USA
	Süd Laborbedarf, Gauting/D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg/D
Plastikküvetten	Sarstedt, Nürnberg/D
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg/D
	Falcon, Oxnard/USA
Zentrifugengefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner, Nürtingen/D

3.12 Software

ABI PRISM™ DNA Sequencing Analyzer	Applied Biosystems, FosterCity/USA
Auto Assembler 2.1.	Applied Biosystems, FosterCity/USA
Endnote X	ISI ResearchSoft, Berkeley/USA
Factura 2.2	Applied Biosystems, FosterCity/USA
FileMaker Pro 6.0	FileMaker Inc., Santa Clara/USA
LSM 510	Zeiss, Jena/D
MacVector 8.0	Symantec Corp., Cupertino/USA
MS Office 2004	Microsoft Corp., Redmond/USA
Nanodrop	PeQLA, Erlangen/D
Netscape Navigator 4.5	Netscape Communications Corp., Mountain View/USA
Photoshop 3.0	Adope Systems Inc., San Jose/USA
Primer Premier 4.0	Premier Biosoft International, Palo Alto/USA
Win Glow	EG&G Berthold, Bad Wildbach/D

4. Methoden

4.1 Gentechnologische Methoden

4.1.1 Präparation von Nukleinsäuren

4.1.1.1 Extraktion von DNA aus Zellkulturzellen

Für die Präparation von Virus-DNA aus transfizierten Suspensionszellen wurde der DNeasy™ Tissue Kit der Firma Qiagen verwendet. Dabei wird die DNA nach der Lyse der Zellen selektiv an eine Silika-Gel-Membran gebunden. Durch Zugabe von verschiedenen Waschpuffern und nachfolgender Zentrifugation werden Kontaminationen entfernt. Alle Puffer wurden dem Kit entnommen und nach Herstellerangaben verwendet.

Zunächst wurden 5×10^6 Zellen für 10 min bei 2000 Upm abzentrifugiert (RT, Mikrozentrifuge, Labnet) und das Zellpellet in 200 μ l PBS resuspendiert und gegebenenfalls bei -20°C eingefroren. Vor Extraktion der DNA wurde dem Ansatz RNase für den Verdau von RNA zugefügt. Nach Zugabe von 20 μ l Proteinkinase K und 200 μ l AL-Puffer erfolgte ein Inkubationsschritt für 10 min bei 70°C . Anschließend wurden 200 μ l Ethanol zugegeben, die Proben gemischt und die Lösung nachfolgend auf eine Silika-Gel-Membran-Säule pipettiert und für 1 min bei 8000 Upm (RT, Tischzentrifuge, Heraeus) zentrifugiert. Nach dem Waschen der Säule mit jeweils 500 μ l AW1-Puffer und 500 μ l AW2-Puffer wurde die DNA durch Zugabe von 100 μ l AE-Puffer eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Gewinnung von Virus-DNA aus Überständen transfizierter Suspensionszellen wurden die Überstände zur Abtrennung der Zellpellets zunächst 10 min bei 2000 Upm (RT, Variofuge 3.0R, Heraeus) abzentrifugiert. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei 4000 Upm wurden 2 ml Überstand in ein Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 15000 Upm für 30 min um sämtliche Zelltrümmer zu entfernen. Von diesem Überstand wurden 200 μ l abgenommen und wie oben geschildert zur Präparation von Virus-DNA genutzt.

4.1.1.2 Präparation von RNA aus Zellkulturzellen

Für die Extraktion von viraler RNA aus transfizierten Zellen wurde der RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Ernte von ca. 5×10^6 293-Graham-Zellen erfolgte durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 2500 Upm (RT, Mikrozentrifuge, Labnet). Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml PBS resuspendiert, erneut für 15 min bei 2500 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 600 μ l RLT-Puffer, dem unmittelbar zuvor 6 μ l β -Mercaptoethanol zugesetzt worden war. Dann wurde das Gemisch

auf eine QIAshredder Säule gegeben und 2 min bei 10000 g (RT, Variofuge 3.0R, Heraeus) zentrifugiert. Zur Präzipitation von RNA wurde dem Eluat 600 µl 70%iges Ethanol zugegeben, mehrmals gemischt und auf zwei RNeasy Mini-Säulen verteilt, um eine Überladung der Säulen zu vermeiden. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei 8000 g (RT, Variofuge 3.0R, Heraeus) für 15 sek an und der Durchfluss wurde verworfen. Nach Zugabe von 350 µl RW1-Puffer auf die Säule erfolgte ein Inkubationsschritt für 5 min bei Raumtemperatur mit nachfolgender Zentrifugation bei 8000 g für 15 sek. Für den DNase Verdau wurde auf jede Säule ein Gemisch aus 70 µl RDD-Puffer mit 2 µl DNase (Roche) und 10 µl DNase I-Stammlösung (Qiagen) pipettiert und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich ein Waschschrift mit 2 x 500 µl RPE-Puffer an. Die nachfolgende Zentrifugation bei 8000 g für 2 min diente der Entfernung von Ethanolresten. Die Elution der RNA in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte mit 50 µl RNase-freiem Wasser durch 2-minütige Zentrifugation bei 8000 g. Nachfolgend wurde die RNA-Konzentration mit Hilfe des NanoDrop-Spektrophotometers bestimmt und das Eluat bei -80°C eingefroren. Die isolierte RNA diente als Template für die RACE-PCR (Abschnitt 4.1.4.2).

4.1.1.3 Isolation von Plasmid-DNA

4.1.1.3.1 Minipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde mit dem QIAprep Miniprep Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Methode basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim & Doly, 1979) sowie einer anschließenden Adsorption der DNA an eine Silika-Gel-Membran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Alle verwendeten Puffer sind Bestandteile des Kits und wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Anzucht aus einer transformierten *E.coli*-Einzelkolonie erfolgte über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (200 Upm) in 5 ml LB-Flüssigmedium mit einem Antibiotikum (Ampicillin, 100 µg/ml), welches eine Selektion von Bakterien mit entsprechendem Resistenzgen gewährleistete. Die Bakterienkultur wurde abzentrifugiert (RT, 15 min, 6000 Upm, Heraeus Tischzentrifuge) und das Bakterienpellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch anschließende Zugabe von 250 µl SDS- und NaOH-haltigem Puffer P2 erfolgte die alkalische Lyse und damit die Freisetzung der Plasmid-DNA. SDS ist dabei für die Denaturierung der Phospholipid- und Protein-Komponenten der Zellmembran verantwortlich, was letztendlich die Lyse und damit einhergehend die Freisetzung der Zellinhalte nach sich zieht. Das NaOH hingegen wird für die Denaturierung sowohl chromosomaler und Plasmid-DNA als auch der Proteine benötigt. Nach Zugabe von Puffer P2 darf nur vorsichtig gemischt werden (kein Vortexen), weil ansonsten Bruchstücke von chromosomaler DNA freigesetzt würden, die die

Plasmid DNA kontaminieren würden. Durch Zugabe von 500 µl Puffer N3 wird das Zell-Lysat neutralisiert, gleichzeitig aber auch eine Umgebung hoher Salzkonzentration geschaffen, welche für eine Bindung der Plasmid-DNA an die Membran unabdingbar ist. Unter diesen Bedingungen präzipitieren denaturierte Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer als Salz-Detergenz-Komplexe. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 13000 Upm (RT, Tischzentrifuge, Heraeus) wurde der Plasmid-haltige Überstand sorgfältig abgenommen und direkt auf die QIAprep 8 Säulen pipettiert, welche zuvor in einer Vakuumapparatur (QIAvac 6S) installiert wurden. Nach Anlegen des Vakuums bindet die Plasmid-DNA beim Durchtritt der Lösung an die Membran, während RNA und zelluläre Proteine ungebunden vorliegen und die Membran passieren. Im Anschluss daran wurde die Minisäule einmal mit 1 ml PB-Puffer und zweimal mit 1 ml Ethanol-haltigem PE-Puffer gewaschen um Salze aus der Membran zu entfernen. Zur Entfernung restlichen Alkohols blieb das Vakuum nach dem letzten Waschschrift für weitere 5 min angelegt. Restliche Flüssigkeitstropfen an der Öffnung der Minisäule wurden mit Zellstoff entfernt. Nachfolgend wurde die DNA mit 120 µl EB-Puffer eluiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA für 5 min in einer SpeedVac-Zentrifuge zentrifugiert, um restlichen Alkohol zu entfernen. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration (Abschnitt 4.7.1) wurde die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.1.1.3.2 Maxipräparation

Zur Isolation größerer Mengen Endotoxin-freier DNA wurde der Endofree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Endotoxine oder Lipopolysaccharide sind Moleküle, die auf der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien (z.B. *E. coli*) vorkommen. Sie beeinträchtigen die Transfektion von DNA in sensitive Kulturzellen und bewirken bei Immunzellen unspezifische Aktivierungen. Aus diesen Gründen wurde für die Transfektion der adhären und in Suspension wachsenden Zellen nur Endotoxin-freie DNA verwendet.

Zur Präparation von DNA mit dem Endofree Plasmid Maxi Kit wurde von einer Bakterien-Glycerolkultur zunächst ein Verdünnungsausstrich auf einer Antibiotika-haltigen Agarplatte angefertigt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurde eine Bakterienkolonie in 5 ml flüssiges LB-Medium überführt und für 8 h bei 37°C geschüttelt. Im Anschluss daran wurde ein Erlmeyerkolben (mit Schikane) mit 100 ml LB-Medium und 100-200 µl dieser Vorkultur beimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler bei 200 Upm inkubiert. Die Zentrifugation der Bakterien erfolgte für 15 min bei 6000 Upm und 4°C (RC5C plus, GSA-Rotor, Sorvall). Daran schloss sich die Präparation der DNA an, die wie bereits oben beschrieben aus der alkalischen Lyse der Zellen, der Bindung der DNA an eine Silika-Gel-Membran mit nachfolgender Elution besteht. Dazu

wurde das Bakterienpellett in 10 ml P1-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 10 ml P2-Puffer lysiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 10 ml P3-Puffer, wonach das Lysat sofort auf einen QIAFilter gebracht wurde. Nach 10-minütiger Inkubation wurde das Lysat in ein 50 ml Falcon-Tube filtriert und von den denaturierten und präzipitierten Zelltrümmern gereinigt. Zur Entfernung der Endotoxine wurde nun die Lösung mit 2,5 ml ER-Puffer gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen erfolgte die Äquilibration einer Qiagen-tip 500-Säule mit 10 ml QBT-Puffer. Das Lysat wurde nun auf die Säule gegeben. Nachdem die Lösung vollständig durchgelaufen war, erfolgte ein Waschschriff mit 2 x 30 ml QC-Puffer und anschließender Elution der Plasmid-DNA mit 15 ml QN-Puffer. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert und anschließend bei 15000 g für 60 min bei 4°C zentrifugiert (RC5C plus, SS-34-Rotor, Sorvall). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet mit 5 ml 70%igen Ethanol gewaschen und erneut bei 15000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert (RC5C plus, SS-34-Rotor, Sorvall). Nach Entfernung des Alkohols wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 300 µl TE-Puffer oder Aqua bidest gelöst. Die DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

4.1.2 Hybridisierung

Zur Erzeugung des Konstruktes pCR-NS wurde ein 32 bp Fragment mit Restriktionsschnittstellen für *Sall* und *Bam*HI und zwei Stop-Codons in den Vektor pCR3.1-uni kloniert. Die Denaturierung der synthetisierten 5' und 3' Oligonukleotide erfolgte für 5 min bei 95°C. Anschließend wurde die einzelsträngige DNA für 1 h bei Raumtemperatur hybridisiert und nachfolgend in pCR3.1-uni kloniert. Die erfolgreiche Insertion des Fragmentes in den Expressionsvektor wurde durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *Sall* bzw. *Bam*H1 kontrolliert.

4.1.3. Reverse Transkription

Zunächst wurde RNA aus dem Lymphknoten eines PLHV-1-positiven und an PTLD erkrankten Miniaturschweines isoliert. Diese präparierte RNA lag zu Beginn der Arbeiten bereits vor. Nachfolgend wurde die RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase fügt einen komplementären DNA-Strang zur vorhandenen RNA hinzu. Durch Verwendung von Oligo-dT-Primern, die an den PolyA-Schwanz der mRNA binden, kann die cDNA-Synthese vom 3'-Ende in Richtung 5'-Ende erfolgen. Hierbei kamen Reagenzien der Firma Invitrogen zum Einsatz, die nach Herstellerangaben verwendet wurden. Als Ausgangskonzentration diente RNA in einer Konzentration von 0,5-2 µg. Zur Aufhebung von Sekundärstrukturen wurde folgender Ansatz für 5 min bei 65°C inkubiert:

Gesamt-RNA	1 μ l
dNTP Mix (10 mM)	1 μ l
oligo-dT-Primer	1 μ l
Nuclease-freies Wasser	9 μ l

Der Reaktionsansatz wurde sofort auf Eis abgekühlt und mit folgenden Reagenzien versetzt:

First strand buffer	4 μ l
DTT	2 μ l
Nuclease-freies Wasser	1 μ l

Daran schloss sich eine 2-minütige Inkubation des Ansatzes bei 42°C an. Anschließend erfolgte die Reverse Transkription der RNA in cDNA durch Zugabe von 1 μ l SuperScript™ III für 50 min. Zur Denaturierung des Enzyms wurde der Ansatz nachfolgend für 15 min bei 72°C inkubiert. Die cDNA wurde zur Lagerung bei -20°C eingefroren und diente nachfolgend als PCR-Template für Klonierzwecke. Zur Kontrolle unerwünschter DNA-Kontaminationen in der Ausgangs-RNA wurden Proben der gleichen Behandlung unterzogen, allerdings wurde anstelle der reversen Transkriptase lediglich Puffer bzw. Aqua Bidest zugegeben.

4.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis et al., 1986) erlaubt die gezielte Vervielfältigung einer beliebigen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und besteht aus drei elementaren Schritten - Denaturierung, Hybridisierung und Synthese. Zunächst wird die DNA bei 95°C in zwei Einzelstränge separiert (Denaturierung), an die sich sequenzspezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, binden (Hybridisierung). Eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase verlängert dann in Gegenwart freier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP) die Primer und synthetisiert den zu den Einzelsträngen komplementären Strang. Während die Denaturierung der DNA bei über 90°C erfolgt, liegt die Annealingtemperatur der Primer in der Regel zwischen 50°C und 60°C. Sie ist abhängig von der Größe und dem GC-Gehalt der ausgewählten Primer und beeinflusst entscheidend die Spezifität der PCR. Bei der Primerauswahl sollten Poly (T)-Bereiche und Haarnadelstrukturen vermieden werden, da es sonst zu unspezifischen Bindungen oder Primerdimerbildung kommen kann. Die Synthese richtet sich nach dem Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase und erfolgt zwischen 68°C und 72°C.

Mit jedem durchlaufenden Zyklus wird die Anzahl der DNA-Moleküle theoretisch exponentiell amplifiziert (2^n bei n Zyklen). Aufgrund limitierender Faktoren wie z.B. nachlassender Enzymaktivität oder Hybridisierungen der Amplifikate liegt die PCR-Effizienz jedoch unter 100%. Die neusynthetisierte DNA dient im nachfolgenden Zyklus selbst wieder als Template. Der Reaktionsansatz enthält neben der Template-DNA, den spezifischen Primern und der hitzebeständigen DNA-Polymerase einen geeigneten Puffer, $MgCl_2$, dNTP und in einigen Ansätzen auch DMSO. Die $MgCl_2$ -Konzentration beeinflusst die Denaturierung der DNA, das Primer-Annealing, die Produktspezifität und Produktausbeute, sowie die Aktivität der DNA-Polymerase. DMSO kann die Spezifität und die Amplifikation GC-reicher Sequenzen erleichtern.

Für die Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pGL3-basic und zur Generierung c-Myc-getagter Varianten von ORF50 wurden die Primer so ausgewählt, dass sie an ihren Enden Restriktionsschnittstellen trugen, die während der PCR an das zu insertierende Insert angefügt wurden, um dieses nachfolgend in die multiple Klonierungsstelle (mcs) des Vektors zu integrieren.

4.1.4.1 Nested-PCR

Bei der nested-PCR verwendet man zwei verschiedene Primerpaare zur Amplifikation eines DNA-Fragmentes. Die erste Runde wird mit den äußeren Primern durchgeführt, dessen Produkt dann als Template für die zweite Amplifikation mit den inneren Primern dient. Der Vorteil dieser Methode ist eine erhöhte Spezifität und Sensitivität der Gesamtreaktion, da das größere Amplikon der ersten Runde durch die inneren Primer in der zweiten Runde weiter amplifiziert wird und somit Nebenprodukte der ersten PCR entfallen. In der ersten Runde der PCR enthielt der Reaktionsansatz standardisiert 150 ng DNA. Als Ausgangsmenge für die zweite Reaktion wurde 1 μ l des 50 μ l Ansatzes der ersten PCR eingesetzt. Dabei wurden die Annealingtemperaturen der Primer angepasst, während die Reaktionsbedingungen konstant blieben.

Für die Amplifikation von Virus-DNA zur Klonierung in Expressions- und Reportergenvektoren wurde das ExpandTM High Fidelity PCR System der Firma Roche verwendet. Es beinhaltet ein Enzymgemisch aus der thermostabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und der Pwo-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*. Die Pwo-DNA-Polymerase besitzt eine zusätzliche 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, die eine Korrektur des neusynthetisierten DNA-Stranges erlaubt (*proofreading*). Dadurch wird der Einbau fehlerhafter Nukleotide um etwa das Dreifache verringert.

Der 50 μ l umfassende Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

10 x Puffer (ohne $MgCl_2$)	5 μ l
dNTP (2,5 mM/dNTP / 0,4 μ M final)	8 μ l
DNA-Polymerase (1 U/ μ l)	1 μ l
Template (150 ng-500 ng)	x μ l
Primer (10 μ M / 0,4 μ M final)	2 μ l
Aqua bidest	ad 50 μ l

Anschließend wurde die PCR unter folgenden Zykler-Bedingungen gestartet:

	94°C	3 min	Vordenaturierung
	96°C	30 sek	Denaturierung
40 x	50-60°C	30 sek	Primeranlagerung (Annealing)
	70°C	10 min	DNA-Synthese (Elongation)
	72°C	30 min	Elongation
	4°C	∞	Lagerung

Nach der PCR wurden 5 μ l des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese analysiert. Stimmt die Größe des Amplifikates im Gel mit der rechnerisch ermittelten Fragmentgröße überein, wurde das PCR-Produkt mittels QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und sequenziert oder zum Klonieren verwendet.

4.1.4.2 RACE-PCR

Die RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*) erlaubt die getrennte Amplifikation von 5'- und 3'- cDNA-Enden, die insbesondere bei langen mRNAs während der *in vitro*-Transkription nicht vollständig synthetisiert wurden. Dazu wurde der First Choice™ RLM-RACE Kit der Firma Ambion verwendet. Dieser wurde gegenüber der herkömmlichen RACE-Technik insofern verbessert, dass ausschließlich cDNA aus vollständiger mRNA, die eine CAP-Struktur aufweist, amplifiziert wird.

Zum Nachweis der Transkription viraler Gene nach Transfektion von Expressionsplasmiden in eukaryote Zellen wurde nur die 3'RACE-PCR durchgeführt. Zunächst erfolgte die reverse Transkription der mRNA in cDNA mit Hilfe von Oligo-dT-Primern (3'-RACE Adapter), die an den PolyA-Schwanz der mRNAs binden, und der SuperScript™ III Reverse Transkriptase von Invitrogen. Dazu wurde der Ansatz für 1 h bei 42°C im Heizblock inkubiert.

Anschließend erfolgte die Amplifikation der cDNA in einer nested-PCR mit zwei Runden unter Verwendung von transkriptspezifischen- und Adapterprimern. Die Annealingtemperatur richtete sich nach dem genspezifischen Primer.

Für die Reverse Transkription der mRNA wurde folgender Ansatz pipettiert:

Gesamt-RNA	1 µg
dNTP Mix (10 mM)	4 µl
3'-RACE-Adapter (0,3 µg/µl)	2 µl
10x RT-Puffer	2 µl
RNase Inhibitor (10 U/µl)	1 µl
SuperScript™ III (200 U/µl)	1 µl
Nuclease-freies Wasser	ad 20 µl

Folgendes Pipettierschema kam für die nested-PCR zur Anwendung:

1. Amplifikationsrunde mit äußerem Primerpaar:

cDNA	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	4 µl
10x Puffer	5 µl
3'-RACE äußerer Primer	2 µl
3'-RACE genspezifischer Primer (10 µM)	2 µl
Super Taq Plus Polymerase	0,2 µl
Nuclease-freies Wasser	ad 50 µl

2. Amplifikationsrunde mit innerem Primerpaar:

PCR-Produkt (1:10 verdünnt aus 1.Runde)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	4 µl
10x Puffer	5 µl
3'-RACE innerer Primer	2 µl
3'-RACE genspezifischer Primer (10 µM)	2 µl
Super Taq Plus Polymerase	0,2 µl
Nuclease-freies Wasser	ad 50 µl

Folgende Zykler-Bedingungen wurden gewählt:

	94°C	3 min	Vordenaturierung
	94°C	30 sek	Denaturierung
35 x	50-60°C	30 sek	Primer-Annealing
	68°C	4 min	Elongation
	68°C	10 min	Elongation
	4°C	∞	Lagerung

Anschließend wurden die PCR-Produkte über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, um die Größen der PCR-Amplifikate zu bestimmen.

4.1.4.3 Real time-PCR (TaqMan-PCR)

Die Grundlage für die heute angewandte real time-PCR wurde 1992 durch Higuchi et al. geschaffen. Mit Hilfe dieser PCR können quantitative Aussagen über die ursprünglich in der Probe vorhandenen DNA-Moleküle getroffen werden. Zum PCR-Ansatz wird neben den Primern eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde verwendet, die zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe (Reporter & Quencher) trägt und zwischen den Primern bindet (Abb. 8). Beide Fluoreszenzfarbstoffe besitzen ein charakteristisches Anregungs- und Emissionsspektrum. Dabei entspricht das Emissionsspektrum des Reporters (Fluorescein-Derivat; FAM) dem Anregungsspektrum des Quenchers (Rhodamin-Derivat; TAMRA). Solange die Sonde intakt ist, wird die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes durch die räumliche Nähe zum Quencherfarbstoff durch Frequenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Während der Elongationsphase wird die hybridisierte Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase zerschnitten und anschließend abgebaut. Damit wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, und das Fluoreszenzsignal des Reporters kann nach Anregung bei 488 nm detektiert werden. Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus in Echtzeit (*real time*) gemessen und ist proportional zur Menge des entstehenden PCR-Amplifikates im Reaktionsgefäß. Durch diese Verhältnismäßigkeit lässt sich über die Messung der Fluoreszenz auf die entstehende Menge an Produkt schließen. Unter idealen PCR-Bedingungen verdoppelt sich somit die DNA-Menge pro Zyklus. Da die Bedingungen für eine exponentielle Amplifizierung des Zielproduktes sowohl am Anfang wie auch am Ende der Reaktion nicht optimal sind, wird in der Praxis eine ca. 70-80%ige Effizienz der PCR erreicht. Die Quantifizierung der real time-PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes (C_T , „threshold cycle“). Der C_T -Wert entspricht der PCR-

Zyklenzahl, bei der ein messbarer Anstieg der Reporterfluoreszenz über der Hintergrundfluoreszenz ermittelt wird. Zu diesem Zeitpunkt ist die Amplifikation in der Regel exponentiell und die PCR-Reaktion wird nicht durch limitierende Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Synthese bestimmter Produkte gehemmt. Umso früher der Schwellenwert erreicht wird (niedriger C_T), umso größer war die Anfangskopienzahl in der Probe.

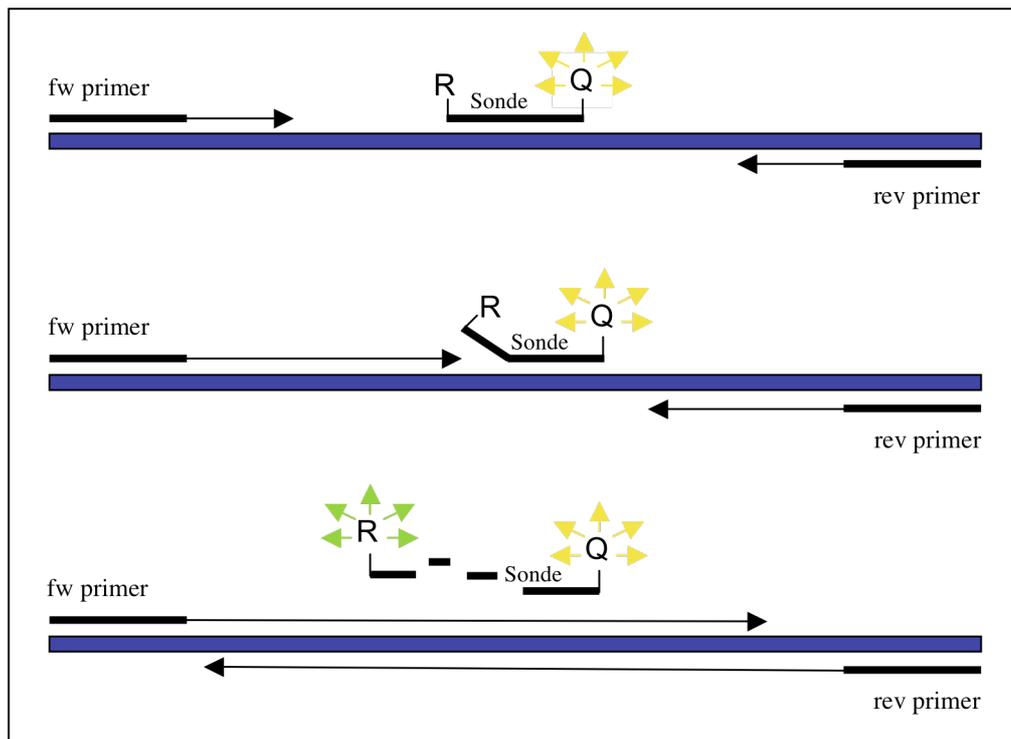


Abb. 8: Prinzip der real time-PCR. Nach Bindung der Sonde und der Primer (forward, fw; reverse, rev) an die DNA wird die Sonde bei der Strangverlängerung durch die Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut. Die Fluoreszenzfarbstoffe der Sonde (Reporter, R; Quencher, Q) werden räumlich getrennt, so dass der Energietransfer zwischen beiden unterbrochen ist. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes kann gemessen werden und ist proportional zur amplifizierten DNA-Menge.

4.1.4.3.1 Standardisierung

Die real time-PCR erlaubt die Quantifizierung von Ziel-DNA über sogenannte externe Standards. Zur Standardisierung der in der Probe vorhandenen DNA-Konzentration wurde eine 10-fach Verdünnungsreihe von Plasmiden bekannter Konzentration eingesetzt, deren Insert die Zielregion der PCR beinhaltet. Die Verdünnungsreihe enthielt Plasmide, die einer Kopienzahl der Zielsequenz von 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 entsprachen (Abb. 9). Mit Hilfe dieser Verdünnungsreihe lässt sich eine Standardkurve erstellen, mit der die Kopienzahlen der Ausgangskonzentrationen der Proben ermittelt werden können.

Die Plasmide für die PLHV-3- und β 2-Microglobulin-TaqMan-PCR wurden freundlicherweise von Frau Dr. Barbara Chmielewicz (Robert Koch-Institut) zur Verfügung gestellt. Sie

erhielten die Bezeichnung pTOPO-gB bzw. pTOPO-B2MG. Zur Ermittlung der EBV-Kopienzahl wurde der Vektor pTOPO-EBVint verwendet, der eine 223 bp umfassende, intergenische EBV Region trägt. Der Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Andreas Nitzsche (Robert Koch-Institut) zur Verfügung gestellt. Zur Ermittlung der Cyclophilin A-Kopienzahl diente der Vektor pTOPO-CycA, der freundlicherweise von Dr. Aleksandar Radonic (Charite) bereitgestellt wurde.

Mit Hilfe der Steigung m einer Standardkurve kann die Effizienz E der PCR auf folgende Weise berechnet werden:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Eine Steigung von -3,32 würde somit eine Effizienz von 100 % bedeuten.

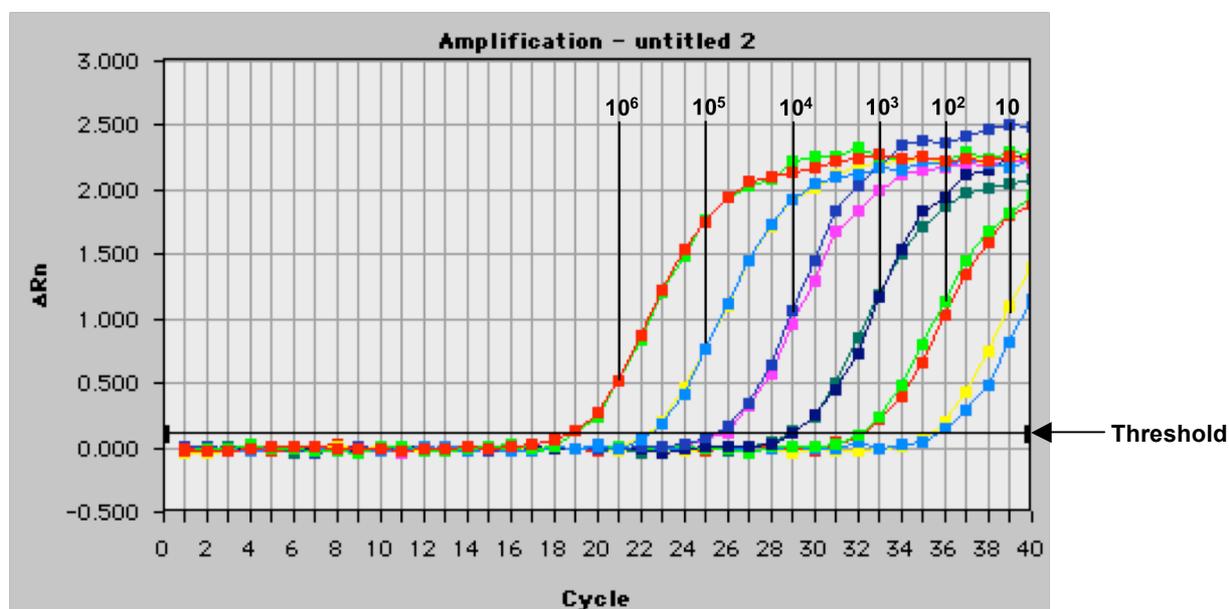


Abb. 9: Ergebnisse einer real time-PCR nach Amplifikation eines Teilfragmentes des orf08/gB von PLHV-3. Das Plasmid pTOPO-gB wurde in 10-fach Verdünnungen von 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10 Kopien in der real time-PCR eingesetzt und die Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen. Der C_T -Wert einer Probe ist der PCR-Zyklus, bei der die Reporterfluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (Threshold) überschreitet. Aus den C_T -Werten der Verdünnungsreihe wird eine Standardkurve erstellt, die zur Berechnung der Kopienzahl unbekannter Proben dient, in denen zuvor der C_T -Wert ermittelt wurde.

4.1.4.3.2 Normalisierung

Um Unterschiede in den Ausgangsmengen der eingesetzten DNA-Proben bzw. der PCR-Effizienzen auszugleichen, wurde eine interne Kontrolle eingeführt. Zur Normalisierung diente ein zelluläres *single copy*-Gen, das neben dem viralen Gen in jeder Probe quantifiziert wurde. Anschließend wurde die Kopienzahl des Zielgens auf die des Referenzgens bezogen. Diese Normalisierung wurde allerdings nur für die Virus-DNA angewandt, die aus den Zellen extrahiert wurde. Zur Normalisierung der PLHV-3-Virus-DNA wurde als Referenzgen porcines β 2-Microglobulin verwendet. Für die Quantifizierung von

β 2-Microglobulin mittels real time-PCR kamen die Primer 059 s, 059 as und die Sonde 059 zum Einsatz (Chmielewicz, 2002). Für die Quantifizierung von EBV aus Krallenaffenzellen der Linie B95-8 diente Cyclophilin A als Referenzgen, das mit den Primern 3351 s, 3351 as und der Sonde 3351 amplifiziert wurde (Radonic et al., 2004). Das Pipettierschema und die PCR-Bedingungen sind in Abschnitt 4.1.4.3.3 aufgelistet.

4.1.4.3.3 Detektion von PLHV-3 und EBV

Zur Quantifizierung von PLHV-3 und EBV wurde der Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG der Firma Invitrogen in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration in einem 25 μ l-Ansatz verwendet. Der Supermix enthält neben der Taq-DNA-Polymerase eine Uracil-DNA-Glykosylase, die vor dem Start der Reaktion kontaminierende UTP tragende PCR-Produkte abbaut. Statt dTTPs enthält der Mix dUTPs, die in die PCR-Produkte eingebaut werden und von der Uracil-DNA-Glykosylase erkannt und abgebaut werden. Somit wird das Risiko von falsch-positiven Proben drastisch reduziert. Als passiver Referenzfarbstoff wurde ROX der Reaktion zugesetzt, dessen Grundfluoreszenz Abweichungen der Probenfluoreszenz ausgleicht.

Für die PLHV-3-PCR dienten die Primer 1156 s, 1156 as und die Sonde 1156 zur Detektion eines Teilfragmentes des orf08/gB (Chmielewicz, 2002). Zur Quantifizierung von EBV wurde eine intergenische Region mit den Primern 2816 s, 2816 as und der Sonde 2816 amplifiziert (Solassol et al., 2001). Tabelle 10 gibt einen Überblick über die mittels real time-PCR amplifizierten Gene und Reaktionsbedingungen.

Tabelle 10. Überblick über die mittels TaqMan-PCR amplifizierten Gene

Primer	Ziel-Gen/ Organismus	Produktgröße (bp)	PCR-Zyklen	Annealingtemperatur (Ta)
1156 s/as	orf08/gB/ PLHV-3	74	40	55°C
059 s/as	β 2-Microglobulin/ Schwein	139	45	60°C
2816 s/as	intergenisch/ EBV	223	45	60°C
3351 s/as	Cyclophilin A/ Krallenaffe	325	45	62°C

Nach Extraktion der Virus-DNA aus Zellen wurden alle DNA-Proben auf eine DNA-Konzentration von 15 ng/ μ l eingestellt. Die DNA-Konzentration pro Reaktion betrug entweder 1,5 ng (EBV-PCR) bzw. 150 ng (PLHV-3-PCR).

Während die Endkonzentration der Primer 300 nM betrug, wurden die Sonden in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt.

Folgender real time-PCR-Ansatz wurde pipettiert:

Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG	12,5 µl
ROX	0,5 µl
s-Primer (300 nM)	0,75 µl
as-Primer (300 nM)	0,75 µl
Sonde (100 nM)	0,25 µl
Template (0,15 ng/µl; 15 ng/µl)	10 µl
MgCl ₂ (5 mM)	1 µl

Die Amplifikation erfolgte in einem ABI PRISM 7700 Sequence Detektor mit folgenden Thermozyklerbedingungen:

	50°C	2 min	Uracil-Glykosylase
	95°C	10 min	Vordenaturierung
	95°C	20 sek	Denaturierung
40-45 x	55-60°C	1 min	Primer-Annealing
	60°C	1 min	Elongation
	4°C	∞	Lagerung

4.1.4.3.4 Normalisierung und Auswertung der TaqMan-Daten

Jede Probe wurde im doppelten Ansatz mittels virusspezifischer real time-PCR analysiert. In den aus Zellen extrahierten DNA-Proben erfolgte außerdem die Amplifikation des Referenzgens. Die Abweichung der C_T-Werte bei den Doppelwerten durfte maximal einen halben Zyklus betragen, andernfalls wurde die PCR wiederholt. Ausgehend vom C_T-Wert einer Probe wurde mit Hilfe der jeweiligen Standardkurve die Kopienzahl des Ziel- bzw. Referenzgens berechnet. Zur Normalisierung wurden alle PLHV-3-Kopienzahlen auf die jeweiligen Kopienzahlen von β2-Microglobulin bezogen. In derselben Weise erfolgte der Bezug der EBV-Kopienzahlen auf die der Cyclophilin A-Kopienzahlen (Radonic et al., 2004). Die erhaltenen Viruskopien wurden auf 10⁶ Referenzgenkopien bezogen.

$$\text{Zielgenkopien}/10^6 \text{ Referenzgen-Kopien} = \text{Zielgenkopien} * 10^6 / \text{Referenzgen-Kopien}$$

Eine Normalisierung für die Virus-DNA, die aus den Überständen extrahiert wurde, wurde nicht vorgenommen, weil sich im Überstand keine zelluläre DNA befinden sollte. Die Virus-DNA aus den Überständen wurde zunächst pro ml Überstand berechnet und anschließend auf die Zellzahl bezogen. Der Bezug auf die jeweilige Zellzahl erlaubt eine präzisere Aussage über die im Überstand vorhandenen Viruskopien, da die verwendeten Stimulantien oder Effektoren das Wachstum der Zellen beeinflussen könnten.

Bei den Kokultivierungsexperimenten musste auf den Bezug der Zellzahl verzichtet werden, da die unterschiedlichen Zelllinien in einem Ansatz bei der Zellzählung nicht unterscheidbar sind. Die Viruskopien der Kokultivierungsexperimente wurden somit pro ml Überstand berechnet. Nach Berechnung der Viruskopien in den Zellen und Überständen wurde die Viruskopienzahl der Kontrollzellen dem Wert 1 gleichgesetzt und alle weiteren Kopienzahlen darauf bezogen. Die erhaltenen Faktoren geben die x-fache Virusgenomvermehrung über der Kontrolle an. Für die elektroporierten Zellen dienten Zellen als Negativkontrolle, die mit dem Vektor pCR-NS transfiziert wurden. Unbehandelte Zellen wurden als Negativkontrolle für TPA-stimulierte Zellen verwendet.

4.1.5 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden Nukleinsäuren nach ihrer Größe und Konformation in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der negativ geladenen DNA-Moleküle hängt dabei von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung, der Art des Laufpuffers sowie der Anwesenheit interkalierender Stoffe ab. Die Auftrennung der durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte in Abhängigkeit der erwarteten Fragmentgröße in 0,7-1,5%igen Agarosegelen bei einer konstanten Spannung von 80 V in einer Biometra-Gelkammer. Als Laufpuffer diente 2 x TBE-Puffer. Zunächst wurde die Agarose in kochendem Elektrophoresepuffer gelöst und nach anschließender Abkühlung auf 65°C in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach Einsetzen des Kamms in die noch flüssige Agarose bildeten sich nach dem Erkalten Geltaschen aus. Anschließend wurde das Gel mit Elektrophoresepuffer bedeckt und der Kamm gezogen. Die Proben wurden zunächst in 1/5 Volumen Probenpuffer aufgenommen und mit dem Farbmarker Bromphenolbau versetzt, um den Elektrophoreseverlauf zu verfolgen. Zur Visualisierung der DNA wurde Ethidiumbromid verwendet, das in einer Konzentration von 400 ng/ml im Elektrophoresepuffer enthalten war. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und dieser Komplex kann nach Anregung mit UV-Licht bei 590 nm sichtbar gemacht werden. Dabei ist die Detektion von bis zu 10 ng DNA pro Bande möglich.

4.1.6 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

4.1.6.1 Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit

Zur Reinigung der DNA-Fragmente aus Reaktionsansätzen (PCR, Restriktion) von Bestandteilen wie z.B. Primern, Nukleotiden, Enzymen und Salzen wurde der QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Dieser ermöglicht die Aufreinigung von einzel- und doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 100 bp bis 10 kbp über Bindung an eine Silika-Gel-Membran einer Minisäule, während alle anderen Komponenten die Membran ungehindert passieren. Nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten kann die gereinigte DNA mit Elutionspuffer oder Aqua Bidest eluiert werden. Alle nachfolgenden Puffer sind Bestandteil des Kits und wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Ein PCR-Ansatz wurde mit dem 5-fachen Volumen an PB-Puffer versetzt und auf eine QIAquick-Minisäule pipettiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 13000 Upm (RT, Tischzentrifuge, Heraeus) für 1 min und Bindung der DNA an die Silika-Gel-Membran wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Daran schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt an. Zur Entfernung des restlichen Alkohols wurde erneut zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte mit 20-50 µl EB-Puffer durch 1-minütige Zentrifugation. Anschließend wurde die DNA-Lösung für weitere 5 min in einer SpeedVac-Zentrifuge zentrifugiert, um Alkoholreste zu entfernen. Die gereinigte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.1.6.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf). Dazu wurde zuvor die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpell aus einem präparativen Agarosegel herausgeschnitten und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gewogen. Es erfolgte die Zugabe des dreifachen Volumens an Bindungspuffer zu dem Gelstück, dabei entsprach 1 mg = 1 µl. Anschließend wurde die Agarose durch Inkubation bei 50°C im Wasserbad und mehrmaliges Vortexen verflüssigt. Nach Zugabe von einem Volumen Isopropanol wurden 800 µl der Lösung auf die Membran der Minisäule pipettiert und bei 13000 Upm für 1 min abzentrifugiert (RT, Tischzentrifuge, Heraeus). Dabei erfolgte die Bindung der DNA an die Membran und der Durchfluss wurde verworfen. Nach Waschen mit 750 µl Waschpuffer und erneuter Zentrifugation wurde die DNA mit 30 µl Elutionspuffer eluiert. Um restlichen Alkohol zu entfernen, wurde die DNA-Lösung für 5 min in einer SpeedVac-Zentrifuge zentrifugiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

4.1.7 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

4.1.7.1 Messung der optischen Dichte mittels Absorptionsspektrometrie

Für die Messung von DNA- bzw. RNA- Konzentrationen wurde das NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologie) Spektrophotometer verwendet, das die optische Dichte (OD) einer Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm misst. Um die Reinheit der Nukleinsäure-Präparation zu überprüfen, wurde der Quotient A_{260}/A_{280} ermittelt, der optimal zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Zur Kalibrierung des Gerätes wurden zunächst 1 μl der Lösung, in der die DNA bzw. RNA aufgenommen wurde, im Gerät vermessen. Anschließend wurden 1 μl der DNA- oder RNA-Lösung im NanoDrop-Spektrophotometer gemessen und die Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wie folgt berechnet:

$$A_{260} = \varepsilon \times C$$

mit A_{260} = Absorption bei $\lambda = 260$ nm

C = Konzentration (ng/ μl)

ε = Extinktionskoeffizient (ng/ μl):

- ◆ einzelsträngige DNA: 33
- ◆ doppelsträngige DNA: 50
- ◆ RNA: 40

$$C_{(\text{DNA})} \text{ (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \text{ bzw. } C_{(\text{RNA})} \text{ (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 40 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

4.1.7.2 Fluorimetrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die fluorimetrische Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe von spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen, die DNA binden und bei Anregung einer bestimmten Wellenlänge (Absorption) Licht einer anderen Wellenlänge abgeben können. Die zu untersuchende DNA-Probe wurde mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258) versetzt, der in die DNA interkaliert und bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt wird. Die emittierte Fluoreszenz wurde bei 460 nm in einem Fluorometer (TD-360 Mini) gemessen.

Nach Herstellung von 100 ml Messpuffer erfolgte die Kalibrierung des Gerätes zu Beginn der Messung. Dazu wurden 2 ml des Messpuffers in eine Plastikkuvette pipettiert und als Nullwert vermessen. Als Eichwert diente 2 μl Kalbsthymus-DNA (1200 ng/ μl), die zu den 2 ml Messpuffer gegeben und anschließend gemischt und vermessen wurde. Nach mehrmaligem Spülen der Küvette mit destilliertem Wasser wurden zur Bestimmung der DNA-Konzentration 2 μl einer Probe in 2 ml Messpuffer gemischt und erneut vermessen.

4.1.8 Klonierung von PCR-Produkten

Das Prinzip der Klonierung besteht in der Integration von DNA-Fragmenten in geeignete Vektoren und deren Transformation in kompetente Wirtsbakterien. Durch die Vermehrung

der Wirtsbakterien entsteht ein Klon gleichartiger Zellen, die das rekombinante Vektor-DNA-Molekül in einer oder mehrerer Kopien enthält. Die klassische Klonierung nach Sambrook (1989) besteht aus der Restriktion und der Ligation.

4.1.8.1 DNA-Restriktion

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die fremde doppelsträngige DNA-Moleküle (z.B. Phagen-DNA) erkennen und abbauen können. Die DNA des Wirtes ist durch ein spezifisches Methylierungsmuster vor dem Abbau geschützt. Die Restriktionsenzyme spalten die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch und unterscheiden sich in der Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus. Es sind drei Typen von Restriktionsenzymen bekannt. Die Restriktionsenzyme des Typ 1 besitzen sowohl eine Restriktions- als auch Methylierungsaktivität und spalten die DNA ca. 1000 bp von der spezifischen Erkennungsstelle entfernt. Die Restriktionsenzyme des Typ 3 hingegen schneiden DNA in einem Abstand von ca. 25 bp von der Erkennungssequenz. Im Gegensatz zu diesen besitzen die Restriktionsenzyme des Typ 2 nur eine Restriktionsaktivität und spalten DNA innerhalb ihrer definierten Erkennungssequenz. Diese Sequenzen sind 4 bis 8 Nukleotide lang und meist palindromisch. Bei der Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme können entweder stumpfe Enden (*blunt ends*) oder aber kohäsive Enden (*sticky ends*) entstehen, bei denen entweder das 5'- oder das 3'-Ende der entstehenden DNA-Fragmente überhängen kann.

Für die gerichtete Klonierung von PCR-Produkten in den Reporter-genvektor pGL3-basic wurden sowohl Plasmid-DNA als auch PCR-Fragmente nacheinander mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Von einem Doppelverdau wurde nach einigen Versuchen abgesehen, da einige Kombinationen von Restriktionsenzymen zu nur unvollständig verdauten DNA-Fragmenten führten. Nach jedem Verdau wurde die DNA erneut aufgereinigt. Für die Restriktion wurden 25 µl gereinigtes PCR-Produkt bzw. 1-3 µg der Plasmid-DNA in einem 50 µl Ansatz verdaut. Dieser enthielt folgende Komponenten:

DNA	1-3 µg
10 x Puffer	5 µl
Enzym	1 U
ad 50 µl Aqua bidest	

Dabei ist 1 unit (U) als diejenige Enzymmenge definiert, die benötigt wird, um in einer Stunde bei 37°C unter optimalen Reaktionsbedingungen 1 µg Substrat-DNA zu verdauen.

Als Substratmolekül wird für die Aktivitätsbestimmung in der Regel DNA des Bakteriophagen Lambda verwendet. Der Reaktionsansatz wurde anschließend über Nacht in einem 37°C Wasserbad inkubiert. In Abhängigkeit vom verwendeten Enzym wurde dem Ansatz BSA in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Anschließend erfolgte die Analyse der Restriktionsfragmente mittels Agarosegelelektrophorese. Für die nachfolgende Ligation wurden die geschnittenen PCR-Fragmente und der Vektor erneut aufgereinigt (Abschnitt 4.1.6.1).

4.1.8.2 Dephosphorylierung

Bei der ungerichteten Klonierung von PCR-Fragmenten in einen Vektor entstehen durch die Restriktion mit nur einem Restriktionsenzym zwei kompatible Enden, die während der Ligation wieder verknüpft werden können. Um diese Selbstligation des Vektors zu verhindern, wurde der Vektor pGL3-basic mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Die für die Ligation benötigten Phosphatreste werden bei dieser Reaktion entfernt. Nach dem Restriktionsverdau wurden dem Ansatz 1 µl Alkalische Phosphatase (CIP) und in entsprechender Menge CIP-Puffer (10x) zugefügt und für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nachfolgend wurde die DNA erneut aufgereinigt.

4.1.8.3 DNA-Ligation

Nach der Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Produkt mit geeigneten Restriktionsenzymen wurde das linearisierte Plasmid mit der geschnittenen DNA ligiert. Bei der Ligation werden die beiden DNA-Fragmente durch die Ausbildung von 3'-5'-Phosphodiesterbindungen kovalent miteinander verbunden. Sie erfordert entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder kohäsive Enden (*sticky ends*). Eine gerichtete Klonierung, also die gezielte Orientierung des Inserts in einen Vektor, wurde erreicht, in dem jede Komponente (Vektor und Insert) unterschiedliche Enden trug, so dass nur eine Richtung der Insertion möglich war. Für die Durchführung einer effizienten Ligation ist das stöchiometrische Verhältnis von Vektor und Insert entscheidend. Im Falle der gerichteten Ligation von PCR-Fragmenten in den pCR3.1-uni Vektor wurde ein Molekülverhältnis Vektor : Insert von 1:2 gewählt. Die Ligation erfolgte in einem 10 µl Ansatz für 16 h bei 15°C im Zykler.

Folgender Ansatz wurde pipettiert:

PCR-Produkt	x µl
10x Ligationspuffer	1 µl
Vektor	y µl
T4 DNA Ligase (4 U/µl)	1 µl
ad 10 µl Aqua bidest	

Für die Ligation der Promotorfragmente in den Vektor pGL3-basic wurden Vektor und Insert in einem molekularen Verhältnis von 1:4 in einem 20 µl umfassenden Ligationsansatz eingesetzt. Zur Inaktivierung der Ligase erfolgte ein Inkubationsschritt für 15 min bei 70°C. Anschließend wurden die Expressionsplasmide in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

4.1.8.4 Transformation von Bakterien

Für die Vermehrung von klonierten DNA-Fragmenten wurden Plasmide als Vektoren eingesetzt, die sich episomal in Bakterien vermehren können. Diese Plasmide mussten für ihre Amplifikation in einen geeigneten *E. coli*-Stamm übertragen werden. Dazu wurden die Expressionsplasmide in *E. coli* (Top 10 F') und die Reportergenplasmide in *E. coli* DH5α transformiert.

Die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mittels Hitzeschockverfahren (Hanahan, 1983). Zunächst wurden die bei -80°C gelagerten Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des Ligationsansatzes (5-200 ng DNA) versetzt und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation der Ansätze für 30 min auf Eis erfolgte die Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 90 sek im Wasserbad. Anschließend wurden die Ansätze sofort wieder auf Eis gestellt. An die nun folgende Zugabe von 250 µl SOC-Medium (ohne Antibiotikum) schloss sich eine 1-stündige Inkubation bei 37°C im Schüttler an. 50 µl bzw. 100 µl des Ansatzes wurden dann auf vorgewärmte Ampicillin-haltige (100 µg/ml) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.1.8.5 Screening nach positiven *E. coli*-Klonen

Die über Nacht gewachsenen *E. coli*-Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in ca. 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Flüssigmedium überführt. Die Inkubation (max. 16 h) erfolgte erneut über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler bei 200 Upm. Anschließend erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA (Abschnitt 4.1.1.3.1), die nachfolgend einem Restriktionsverdau unterworfen wurden. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Größe der DNA-Fragmente gab dann Auskunft über mutmaßlich positive *E. coli* - Klone, die anschließend sequenziert wurden.

4.1.9 Herstellung der Expressionsplasmide

Für die Klonierung des orf50, orfA6/BZLF1_h und orf57 von PLHV-1 sowie Hämagglutinin (HA)-markierter Varianten der orfs A6/BZLF1_h und 57 und der Flag-markierten Variante des ORF50 wurde der Eukaryotic TA Cloning Kit (Unidirectional) der Firma Invitrogen verwendet. Die Konstruktion von Plasmiden zur Expression von HA- bzw. Flag-markierten Proteinen war

notwendig, da für den Nachweis der Proteine im Westernblot keine spezifischen, gegen diese Proteine gerichteten Antikörper zur Verfügung standen.

Die PCR-Produkte wurden ohne vorherigen Enzymverdau in den linearisierten Vektor pCR3.1-uni ligiert. Diese TA-Ligation wird durch die Matrizen-unabhängige Aktivität der Taq-Polymerase bewirkt, die an das 3'-Ende von PCR-Produkten ein zusätzliches dATP synthetisiert. Der vom Hersteller gelieferte, linearisierte Vektor pCR3.1-uni enthält dagegen an den 3'-Enden ein zusätzliches dTTP, so dass die Ligation auch ohne Restriktion effizient erfolgen kann. Das zu klonierende DNA-Fragment wurde in die *EcoRI* / *HindIII*-Schnittstelle des pCR3.1-uni inseriert. Um eine gerichtete Klonierung des PCR-Fragmentes zu erreichen, wurde vom Hersteller zusätzlich die Phosphatgruppe des pCR3.1-uni Vektors an einem der 5'-Enden durch eine OH-Gruppe ersetzt. Die Amplifikation des PCR-Produktes erfolgte dann mit einem phosphorylierten sense-Primer und einem nicht-phosphorylierten antisense-Primer. Das am 5'-Ende phosphorylierte PCR-Produkt garantiert nun die gerichtete Insertion in den Vektor pCR3.1-uni. Zur Generierung von N-terminal getagten ORFA6/BZLF1_h- und ORF57-Proteinen wurde ein Hämagglutinin (HA)-tag über den sense-Primer eingeführt. Die Markierung am C-Terminus der Proteine wurde dagegen über den antisense-Primer realisiert. In derselben Weise wurde ein Flag-tag als Markierung an den N- bzw. C-Terminus des ORF50 eingefügt. Die Expressionsplasmide wurden anschließend in kompetente *E. coli* (Top 10 F') mittels Hitzeschockverfahren transformiert (Abschnitt 4.1.8.4).

Da sowohl die N-terminal also auch die C-terminal Flag-getagte Variante von ORF50 in der Immunfluoreszenz und im Westernblot nicht detektiert werden konnte, erfolgte die Umklonierung der genomischen und gespleißten Variante des orf50 in den Vektor pCMV-myc (BD). Der im Vektor enthaltene c-Myc-tag resultiert in einer Expression von N-terminal getagten Proteinen. Nach der Auswahl geeigneter Restriktionsschnittstellen wurden der Vektor und die PCR-Fragmente verdaut, anschließend gereinigt und ligiert.

4.1.10 Herstellung der Reportergenplasmide

Die durch PCR amplifizierten PLHV-1-Promotoren und EBV-Promotoren wurden nach dem klassischen Klonierungsverfahren nach Sambrook (1989) in den Reportergenvektor pGL3-basic (Promega) kloniert. Dabei erfolgte die Insertion der PCR-Produkte direkt vor das Firefly-Luziferase-Gen in die multiple Klonierungsstelle des pGL3-basic Vektors. Die Klonierung der PLHV-1-Promotoren erfolgte ungerichtet, da es an geeigneten Restriktionsschnittstellen im Vektor und Insert fehlte. Die EBV-Promotoren wurden dagegen gerichtet kloniert. Zur Klonierung wurden die DNA-Fragmente und der Vektor zunächst mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und nachfolgend ligiert.

4.1.11 Lagerung von *E. coli*-Kulturen

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienklonen bei -80°C wurden die Bakterien mit Glycerol versetzt. Dazu wurde von der entsprechenden Bakterienkolonie eine Übernachtskultur angefertigt. $800\ \mu\text{l}$ der Übernachtskultur wurden mit $200\ \mu\text{l}$ sterilem Glycerin, das in einem autoklavierten Kryogefäß vorgelegt worden war, gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefren und bei -80°C gelagert. Zur Neubeimpfung von Antibiotika-haltigen Agarplatten wurde mit einer sterilen Impföse etwas Bakterienmaterial aus dem Kryogefäß entnommen und ein Verdünnungsausstrich angefertigt. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.1.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Nucleinsäuren, also die Bestimmung der Nucleotidabfolge innerhalb eines DNA-Moleküls, wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al., 1977 durchgeführt. Zunächst wird die DNA in eine einzelsträngige Form überführt, die mit einem Oligonucleotid, dem Sequenzierungsprimer, hybridisiert. Ausgehend von diesem Primer erfolgt die Synthese des zur Matrize komplementären Stranges. Dabei bewirkt der Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleosid-Triphosphaten (ddNTP) einen Kettenabbruch am Matrizenstrang, da die Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom entfernt wurde. Dabei entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, die ein einzelnes je nach Stickstoffbase unterschiedlich fluoreszierendes Nucleotid am 3'-Ende tragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe zeigt eine Leiter, anhand derer die Sequenz der jeweiligen Basen ermittelt werden kann. In dieser Arbeit wurden zur Erzeugung und Markierung der PCR-Fragmente das ABI PRISM™ Big Dye Terminators v 3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet.

Zur Sequenzierung wurden 250-500 ng Plasmid-DNA mit 10 pmol eines Sequenzierungs-Primers und $1\ \mu\text{l}$ Big Dye (Applied Biosystems) in $10\ \mu\text{l}$ Aqua bidest verdünnt. Die PCR erfolgte unter nachstehenden Bedingungen im Thermozykler.

	96°C	2 min 30 sek	Vordenaturierung
	96°C	10 sek	Denaturierung
25 x	55°C	5 sek	Primer-Annealing
	60°C	4 min	Elongation
	4°C	∞	Lagerung

Im Anschluss daran wurden die Proben durch Gelfiltration über Sephadex™ aufgereinigt, gefriergetrocknet und in Formamidlösung aufgenommen. Die Sequenzierung erfolgte in einem ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer, der automatisch Größe, Sequenz und Menge einer Nukleinsäure erfasst. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente in einem 4,8%igen, denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgt eine Anregung der vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe über Laserabtastung. Die emittierten Farbsignale wurden über Filter mit vier verschiedenen Wellenlängen in einem Fotomultiplier geleitet und mit Hilfe eines Computers in die entsprechende Nukleotidsequenz übersetzt. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde als Computerdatei erhalten und wurde mit der Software „Factura“ und „Auto Assembler“ ausgewertet.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von Zellen

4.2.1.1 Suspensionszellen

Die in Suspension wachsenden porzinen B-Zellen L23 (PLHV-3-positiv) und Krallenaffen- B-Zellen B95-8 (EBV-positiv) wurden in RPMI 1640-Medium gehalten, dem 10%iges Hitzeinaktiviertes (30 min bei 56°C) fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol und 100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurde. Alle Zellen wurden in 175 cm²-Zellkulturflaschen bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. Sobald die Zellen dicht gewachsen waren (etwa 10⁶ Zellen/ml), wurden sie zunächst aufgeschüttelt, um dann in einer Verdünnung von 1:5 (B95-8) bzw. 1:3 (L23) umgesetzt zu werden.

4.2.1.2 Adhärent wachsende Zellen

Die humanen 293-Graham-Zellen und die porzinen Makrophagen (IPAM) und PK15-Zellen wurden in DMEM-Medium unter Zusatz von 100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Der FKS-Anteil betrug in Abhängigkeit von der Zelllinie 5% (293-Graham) oder 10% (PK15, IPAM). Die Umsetzung der Zellen erfolgte in der Regel zweimal pro Woche, nachdem der Zellrasen geschlossen war. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt, um die Zellen anschließend mit 1-3 ml Trypsin-Lösung zu behandeln. Nach Entfernen des überschüssigen Trypsins wurden die Zellen 5-10 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die sich ablösenden Zellen wurden in 10 ml frischem Medium aufgenommen und durch mehrfaches Auf- und Abziehen in einer Glaspipette separiert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden 1/10 bzw. 1/20 der resuspendierten Zellen in eine neue Kulturflasche überführt und mit frischem Medium aufgefüllt. In Abhängigkeit der Kulturflasche wurden ca. 25 ml (75 cm²) bzw. 50 ml frisches Medium (175 cm²) zugeführt.

4.2.2 Zellzählung

Die Zellzahl wurde über die Zählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde der Farbstoff Trypanblau eingesetzt. Die toten Zellen nehmen aufgrund ihrer durchlässigen Plasmamembran das Trypanblau auf und erscheinen im Mikroskop dunkelblau, während die lebenden Zellen leuchtend weiß sind. 10 µl Zellsuspension wurden mit 190 µl einer 0,25 %igen Trypanblau-Lösung für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Applikation des Gemisches auf eine Neubauer-Zählkammer wurden nur die leuchtend weißen Zellen gezählt. Zunächst wurde die Zellzahl in jeweils 4 Eckquadraten ermittelt und der Mittelwert berechnet, um die Zellzahl eines Eckquadrates zu erhalten. Durch Multiplikation dieses Mittelwertes mit dem Verdünnungsfaktor lässt sich die Zellzahl pro ml folgendermaßen berechnen:

$$\text{Zellzahl/ml} = n \times 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 \text{ (Kammergröße)}$$

Multipliziert man dieses Ergebnis mit dem Volumen in ml, in denen die Zellen resuspendiert wurden, so erhält man die Gesamtzellzahl der lebenden Zellen:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl/ml} \times \text{Volumen (ml)}$$

4.2.3 Lagerung von Zellen

Zur Konservierung wurden Zellen aus zwei konfluent bewachsenen 175 cm²-Zellkulturflaschen gewaschen, trypsiniert und in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Die Ernte von Suspensionszellen erfolgte durch 6-minütige Zentrifugation bei 800 Upm. Die pelletierten Zellen wurden nachfolgend in 10 ml Einfriermedium resuspendiert. Dies setzte sich aus 7 ml DMEM bzw. RPMI (zzgl. Zusätzen), 2 ml FKS und 1 ml DMSO zusammen. Die Zellen wurden anschließend in sechs sterile Kryo-Röhrchen abgefüllt. Um die Abkühlung der Zellen schrittweise zu ermöglichen, wurden die Röhrchen zunächst für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen in Zellstoff eingewickelt und bei -80°C für 24 h eingefroren, um dann in flüssigem Stickstoff (-196°C) endgelagert zu werden.

Um Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie in warmem Wasser (37°C) aufgetaut, in vorgewärmtem Medium verdünnt (1x) und abzentrifugiert (800 Upm, 4 min; Variofuge 3.0R, Heraeus), um das zelltoxische DMSO zu entfernen. Die Anzucht der Zellen erfolgte zunächst in 25 cm²-Kulturflaschen mit 10 ml Medium, um am darauf folgenden Tag in eine 75 cm²-Zellkulturflasche umgesetzt zu werden.

4.2.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen

4.2.4.1 Transfektion mittels nicht-liposomaler Lipide (Effectene)

Bei dieser Form der Transfektion wird die DNA zunächst mit einem positiv geladenen Enhancer kondensiert. Durch Bindung der kondensierten DNA an ein kationisches, nicht-liposomales Lipid (Effectene) entstehen Micellen, die durch Endocytose von der Zelle aufgenommen werden.

Zur Durchführung des Luziferase-Reporterassay wurden 5×10^4 Zellen (293-Graham, PK15, IPAM) einen Tag vor der Transfektion in 24-Loch-Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die Transfektion der Zellen wurde der Effectene Transfection Reagent Kit (Qiagen) verwendet, der neben Effectene, auch den EC-Puffer und den Enhancer enthielt. Bei Verwendung von Effectene wurden die Zellen je Ansatz zum einen mit 100 ng des Expressionsplasmides bzw. 100 ng des Reporterplasmides kotransfiziert. Als interne Kontrolle erfolgte außerdem die Transfektion von 50 ng des β -Galactosidase-Expressionsplasmides pRSV- β gal (Tab. 11 a). Die DNA (500 ng) wurde zunächst in 120 μ l EC-Puffer (Doppelansatz) verdünnt und nach Zugabe von 4 μ l Enhancer für 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l Effectene-Transfektionsreagenz zugesetzt und die Lösung für 10 sek gevortext. Diesem Schritt folgte eine 10-minütige Inkubation, um die Komplexbildung zu gewährleisten. In der Zwischenzeit erfolgte die Zugabe von 350 μ l frischen Mediums zu den 50-80% konfluenten Zellen. Daraufhin wurden die DNA-Lipid-Komplexe mit 700 μ l Medium gemischt und jeweils 400 μ l der Lösung vorsichtig auf die Zellen eines Doppelansatzes pipettiert (Tab. 11 b). Nach 24 h Inkubation der Zellen unter Standardbedingungen wurde die Transfektionslösung durch frisches Medium ersetzt. Nach 48 h erfolgte dann die Ernte der Zellen.

Zur Expression von viralen Proteinen und deren Nachweis mittels Westernblot wurden 2×10^5 293-Graham-Zellen in einer 6-Lochplatte ausgesät. 24 h später erfolgte die Transfektion der Zellen mit den unter Tabelle 11 c angegebenen Reagenzien. Für die Transfektion von porzinen PK15-Zellen erwies sich Effectene als ungeeignet, so dass GenePorterTM2 verwendet wurde, mit dem die Transfektionseffizienz deutlich verbessert werden konnte (Abschnitt 4.2.4.2).

Tabelle 11 a: Transfektion mit Effectene für Luziferase-Reporterassay

Doppelansatz	DNA (ng)	Expressionsplasmid	Reporterplasmid	pRSV- β gal
2/24 Lochschale	500 ng in 5 μ l	200 ng	200 ng	100 ng

Tabelle 11 b: Auflistung der zugehörigen Mengen an Reagenzien für eine Transfektion mit Effectene

Doppelansatz	DNA (ng)	EC-Puffer	Enhancer	Effectene	Medium zu Komplexen	Medium zu Zellen
2/24 Lochschale	500 ng in 5 μ l	ad 120 μ l	4 μ l	10 μ l	700 μ l	400 μ l

Tabelle 11 c: Transfektion mit Effectene für SDS-PAGE

Einfacher Ansatz	DNA (ng)	EC-Puffer	Enhancer	Effectene	Medium zu Komplexen	Medium zu Zellen
1/6 Lochschale	400 ng	ad 100 μ l	3,2 μ l	10 μ l	600 μ l	1600 μ l

4.2.4.2 Liposomenvermittelte Transfektion (GenePorterTM2)

Bei der Lipofektion erfolgt die Bindung der DNA ohne zusätzlichen Enhancer an Lipide, die anschließend als Liposomen-DNA-Komplexe mit der Membran der Zelle fusionieren, so dass die DNA in die Zelle gelangt. GenePorterTM2 ist ein Gemisch aus einem kationischen Lipid mit einem neutralen Helferlipid (DOPE), das DNA bindet und durch Endocytose in die Zelle aufgenommen wird. Neben der höheren Transfektionseffizienz bei Verwendung von GenePorterTM2 in PK15-Zellen, erlaubt das Herstellerprotokoll den Einsatz sehr hoher DNA-Konzentrationen, die vor allem bei Kombination mehrerer Expressionsplasmide mit dem jeweiligen Reporterplasmid in PK15-Zellen und 293-Graham-Zellen eingesetzt wurden. Der Transfektions-Kit der Firma Peqlab enthält neben GenePorterTM2 auch die DNA-Verdünnungslösung DNA Diluent A bzw. DNA Diluent B.

Einen Tag vor der Transfektion wurden 5×10^4 Zellen (293-Graham, PK15) in 24-Loch-Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Transfektion der Zellen erfolgte dann mit 400 ng Expressionsplasmid, 400 ng Reporterplasmid und 100 ng β -Galactosidase-Plasmid (Tab. 12 a). Bei Verwendung von GenePorterTM2 für die Kotransfektion von mehreren Plasmiden wurden pro Ansatz insgesamt 750 ng bis 1350 ng DNA eingesetzt, die zunächst in DNA-Diluent A verdünnt wurde. Eine Auflistung der eingesetzten Plasmidkonzentrationen ist Tabelle 13 a zu entnehmen. Dabei wurde die DNA-Menge des Expressionsplasmides 1 konstant (300 ng) gehalten, während das zweite Expressionsplasmid in steigenden DNA-Mengen von 150, 300, 450 oder 600 ng zugegeben wurde. Auch der umgekehrte Ansatz wurde durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit 300 ng Kontrollplasmid pCR-NS, 300 ng Reporterplasmid und 150 ng β -Galactosidase-Plasmid transfiziert. Nach Verdünnung der DNA wurden je nach zu transfizierender DNA-Menge entsprechende Mengen von GenePorterTM2 in einem bestimmten Volumen serumfreien Mediums aufgenommen (Tab. 13 b). Nachfolgend wurde die DNA/Verdünnung-Lösung mit der GenePorterTM2-Lösung vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit erfolgte analog zur Transfektion mit Effectene die

Zugabe von 500 μl Medium auf die in 24-Loch-Platten wachsenden Zellen. Die DNA-Liposomen-Komplexe wurden dann in Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Menge in einem bestimmten Volumen vorsichtig auf die Zellen appliziert (Tab. 13 b). Nach einer Inkubation von 24 h bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium gewechselt, um die restlichen Transfektionskomplexe zu entfernen. Die Ernte der Zellen mit nachfolgender Messung der Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität erfolgte 48 h nach der Transfektion.

Tabelle 12 a:

Transfektion mit GenePorterTM2 für Luziferase-Reporterassay (1 Expressionsplasmid)

Doppelansatz	Expressionsplasmid	Reporterplasmid	pRSV- β gal
1,8 μg in 5 μl	800 ng	800 ng	200 ng

Tabelle 12 b: Auflistung der zugehörigen Mengen an Reagenzien für eine Transfektion mit GenePorterTM2 (1 Expressionsplasmid / 1 Reporterplasmid)

Doppelansatz	DNA (μg)	DNA-Diluent A	GenePorter TM 2	serumfreies Medium	pro Loch
2/24 Lochschale	1,8 μg in 5 μl	ad 50 μl	10 μl	40 μl	50 μl

Tabelle 13 a: Transfektion mit GenePorterTM2 für Luziferase-Reporterassay (2 Expressionsplasmide / 1 Reporterplasmid)

DNA (μg) je Doppelansatz	Expressionsplasmid 1	Expressionsplasmid 2	Reporterplasmid	pRSV- β gal
1,5 – 2,7 μg in 5 μl	600 ng	0, 300, 600, 900, 1200 ng	600 ng	300 ng

Tabelle 13 b: Auflistung der zugehörigen Mengen an Reagenzien für eine Transfektion mit GenePorterTM2 (2 Expressionsplasmide / 1 Reporterplasmid)

Ansatz	Gesamt-DNA (μg) je Doppelansatz	DNA-Diluent A (μl)	GenePorter TM 2 (μl)	serumfreies Medium (μl)	pro Loch (μl)
1	1,5	37,5	7,5	30	37,5
2	1,8	50	10	40	50
3	2,1	62,5	12,5	50	62,5
4	2,4	62,5	12,5	50	62,5
5	2,7	68,75	13,75	55	68,75

4.2.4.3 Transfektion mittels Elektroporation

Das in der B-Zelllinie L23 latent vorliegende PLHV-3 sollte durch Transfektion von Expressionsplasmiden, die für virale Regulatorproteine kodieren, reaktiviert werden. Als Positivkontrolle dienten EBV-latent infizierte B95-8-Zellen. Zur Transfektion der Suspensionszellen wurde die Methode der Elektroporation gewählt. Bei der Elektroporation werden Zellen starken elektrischen Feldern kurzer Dauer ausgesetzt, die zu vorübergehenden Veränderungen in der Zellmembran führen und deren Durchlässigkeit für

DNA-Moleküle erhöht. Die Transfektion von porzinen B-Zellen (L23) und Krallenaffen-B-Zellen (B95-8) mittels Elektroporation erfolgte mit dem Gerät Gene-Pulser-II. Um eine möglichst hohe Transfektionsrate zu erreichen, mussten zunächst die verschiedenen Parameter der Elektroporation wie Spannung, Zelldichte und DNA-Konzentration für die B-Zellen optimiert werden. Dazu wurden die Zellen zunächst mit einem GFP-Expressionsplasmid transfiziert und nach 48 h einer FACS-Analyse unterzogen (Abschnitt 4.2.6).

Die Anzucht der L23- bzw. B95-8-Zellen erfolgte in 175 cm²-Kulturflaschen, denen am Vortag der Elektroporation frisches Medium zugesetzt wurde. Für die Elektroporation wurden die Zellen zunächst bei 800 Upm für 6 min abzentrifugiert (RT, Variofuge 3.0R, Heraeus), anschließend in 37°C vorgewärmten FKS-freiem RPMI-Medium (zzgl. Zusätze) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 37°C-temperierten FKS-freiem RPMI-Medium (zzgl. Zusätze) aufgenommen und die Zellzahl auf eine Konzentration von 2×10^7 /ml eingestellt. Die L23- bzw. B95-8-Zellen wurden dann mit den PLHV-1-Expressionsplasmiden pCR-50, pCR-A6/BZLF1g bzw. pCR-50+pCR-A6/BZLF1g oder den EBV-Expressionsplasmiden pCMV-BZLF1, pCMV-BRLF1 bzw. pCMV-BZLF1+pCMV-BRLF1 elektroporiert. Als Negativkontrolle dienten zum einen unstimulierte Zellen bzw. Zellen, die mit dem Expressionsplasmid pCR-NS elektroporiert wurden. TPA (20 ng/ μ l) - stimulierte L23- und B95-8-Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet.

Die Zellen wurden dann wie folgt elektroporiert:

15-20 μ g der zu transfizierenden DNA wurde in eine Elektroporationsküvette überführt, mit 10^7 Zellen in 500 μ l vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Kondensator mit der Kapazität von 960 μ F wurde je nach Zelltyp mit 250 V (L23) oder 270 V (B95-8) aufgeladen und über die Küvette mit dem Transfektionsansatz entladen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 μ l 37°C temperiertem FKS zum Elektroporationsansatz mit nachfolgendem Vereinzeln der Zellen, um eventuelle Verklumpungen zu lösen. Für die Stimulationsversuche wurden je Ansatz insgesamt vier Küvetten mit jeweils 1×10^7 Zellen wie oben beschrieben elektroporiert und in eine 75 cm²-Kulturflasche mit 20 ml 37°C-temperiertem Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren erneut vereinzelt und auf zwei 75 cm²-Kulturflaschen verteilt (2×10^7 Zellen/Kulturflasche). Dann erfolgte die Zugabe von 10 ml frischem RPMI-Medium (zzgl. Zusätze) je Zellkulturflasche. Nach zwei bzw. vier Tagen erfolgte die Extraktion der Zellen bzw. Abnahme der Überstände mit nachfolgender Ermittlung der Zellzahl. Zellen, die vier Tage kultiviert wurden, erhielten am zweiten Tag 20 ml frisches RPMI-Medium (zzgl. Zusätze). Nach der DNA-Präparation aus Zellen und Überständen wurden die Proben hinsichtlich ihrer Viruslast mittels real time-PCR (Abschnitt 4.1.4.3) untersucht.

4.2.5 Kokultivierung von L23- und B95-8-Zellen

Für die Stimulation des latent in der Zelllinie L23 vorliegenden PLHV-3 wurde eine Kokultivierung mit EBV-positiven B95-8 Zellen vorgenommen. Die spontane Reaktivierung von EBV geschieht in einem Teil dieser Zellen, so dass eine Infektion der L23-Zellen mit nachfolgender Reaktivierung erreicht werden könnte. Die Reaktivierung von EBV kann durch die Zugabe eines geeigneten Stimulans, wie z.B. TPA unterstützt werden. 1×10^6 Zellen der Zelllinie L23 wurden mit 1×10^6 B95-8-Zellen in einer 75 cm^2 -Kulturflasche mit 10 ml RPMI-Medium (zzgl. Zusätze) kultiviert. Parallel dazu erfolgte die Kokultivierung von L23- und B95-8-Zellen unter Zugabe von TPA (20 ng/ μl). Als Negativkontrolle dienten unstimulierte L23- und B95-8-Zellen. TPA-stimulierte B95-8-Zellen dienten als Positivkontrolle. Nach zwei bzw. vier Tagen wurden die Zellen bzw. Überstände für eine nachfolgende DNA-Extraktion geerntet und auf ihren Virusgehalt mittels real time-PCR untersucht. Am zweiten Tag wurden 10 ml frisches RPMI-Medium (zzgl. Zusätze) zu den Zellen zugefügt, die am Tag 4 geerntet wurden.

4.2.6 Durchflusszytometrie / FACS (*fluorescence activated cell sorting*)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen und Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Sie wird einerseits zum Nachweis von Proteinen auf der Zelloberfläche genutzt, die mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern detektierbar sind, oder andererseits zum Nachweis von Proteinen der Zelle, die eine eigene Fluoreszenz (z.B. GFP) aufweisen. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Die den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht Streulicht, über dessen Messung und Auswertung Informationen über die Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) der Zelle gewonnen werden. Neben der Streulichtmessung ermöglicht die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS) die Unterscheidung und Auftrennung von Zellen nach vorhandener Fluoreszenz durch Laser-Aktivierung und -Abtastung. Die gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen. Die graphische Darstellung erfolgte nach Zellgröße, Populationsgehörigkeit, Verteilungswerten und Fluoreszenzstärke in Wolken- und Kurvendiagrammen.

Zur Optimierung der Elektroporation von Suspensionszellen (siehe Abschnitt 5.2.8.1) wurden die Zellen mit einem GFP-Expressionsplasmid transfiziert und die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Dazu wurden 1×10^6 Zellen für 5 min bei 550 g und 4°C abzentrifugiert und anschließend mit 200 μl FACS-PBS (1% FKS in PBS)

gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen dann in 200 μ l FACS-PBS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert. Kurz vor der Messung erfolgte die Zugabe von 100 μ l Propidiumiodid, das in die Zellen aufgenommen wird und sich im Zytoplasma anreichert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wird aus lebenden Zellen wieder heraustransportiert, verbleibt jedoch in toten Zellen, deren charakteristische Eigenfluoreszenz gemessen wird. Die Messung erfolgte an einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson), welches mittels Laserlichtdetektion im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht die Zellpopulation anhand der Zellgröße (Vorwärtslaser) und Granularität (Seitwärtslaser) differenziert. Zur Skalierung der Messgrößen bei unterschiedlichen Zelltypen wurden nicht transfizierte Zellen eingesetzt.

4.2.7 Luziferase-Reporter- und β -Galactosidaseassay

Zur Bestimmung der Promotoraktivität wurde ein Luziferase-Reporterassay (Applied Biosystems) in verschiedenen Zellen durchgeführt (humane 293-Graham-Zellen, IPAM; PK15-Zellen). Mit Ausnahme von DTT wurden alle Reagenzien dem Dual Light Kit der Firma Applied Biosystems entnommen.

Die Transfektion der Zellen erfolgte zum einen mit dem Expressionsplasmid (pCR3.1-uni) bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und einem Reportervektor (pGL3-basic), in den verschiedene virale Promotorfragmente direkt vor das Luziferase-Reporter gen kloniert wurden. Wird die Luziferase durch Aktivierung des Promotors in transfizierten Zellen als Reporterprodukt exprimiert, so kann die Aktivität des Enzyms *in vitro* nach Substratzugabe durch Messung der Biolumineszenz erfolgen. Dabei wandelt die Luziferase Luziferin in Gegenwart von Sauerstoff, ATP und Mg^{2+} in Oxyluziferin und CO_2 um. Das bei der enzymatischen Reaktion emittierte Licht einer Wellenlänge von 562 nm wird dann in einem Luminometer (MicroLumat Plus LB96V, EG&G Berthold) gemessen (Abb. 10). Zusätzlich wurde ein β -Galactosidase-Plasmid kotransfiziert, um eine Normalisierung der Luziferasewerte vornehmen zu können. Bei der Spaltung des Substrates Galacton-Plus durch die β -Galactosidase wird Licht einer Wellenlänge von 470 nm emittiert. Durch Zusatz des Accelerator II (Dual Light Kit) verstärkt sich die Lichtemission mit einem Shift zu einer maximalen Wellenlänge von 530 nm. Gleichzeitig wird der pH-Wert herabgesetzt.

Zunächst wurden die Zellen wie unter 4.2.4 beschrieben transfiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 h nach der Transfektion. Nach Entfernen des Mediums wurde der Zellrasen 2 x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 100 μ l Lysispuffer (Dual Light Kit, Applied Biosystems) pro Loch, dem zuvor DTT in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben wurde. Nach Ablösen der Zellen mit Hilfe eines Zellschabers wurde das Zelllysate in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 13000 Upm für 2 min zentrifugiert (RT, Heraeus Tischzentrifuge), um die Zelltrümmer zu beseitigen. Der

Überstand wurde abgenommen und auf Eis bis zur Messung gelagert. Zunächst wurden 25 μl Puffer A in einer 96-Loch-Platte vorgelegt, die anschließend mit 10 μl des Gesamtzellextraktes vermischt wurden. Das Lichtsignal beider enzymatischer Reaktionen wurde nacheinander im Luminometer gemessen. Für die enzymatische Reaktion wurden die Substrate beider Enzyme vermischt.

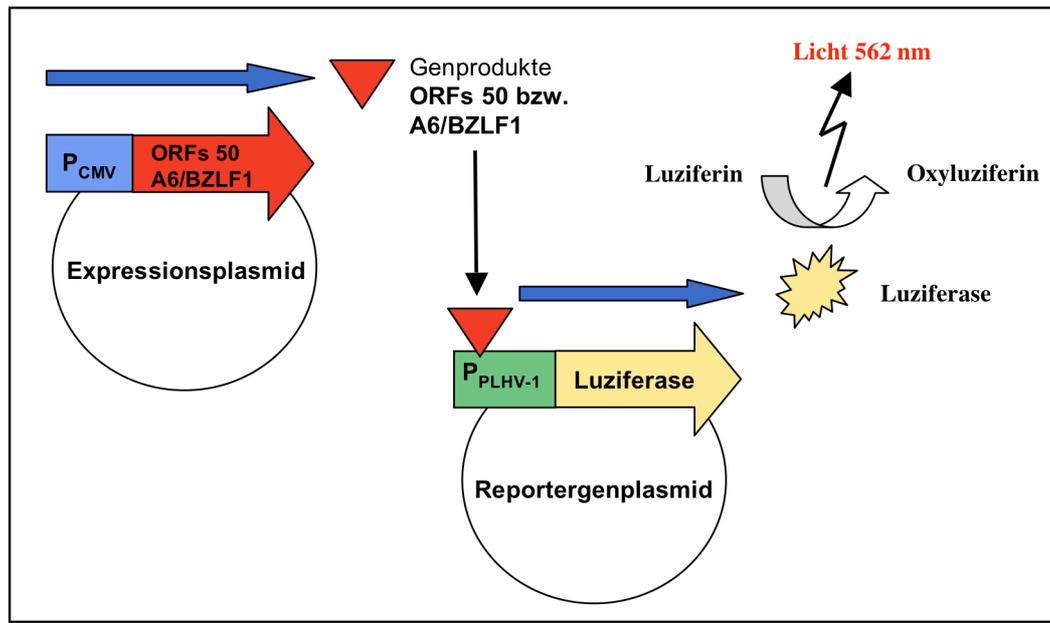


Abb. 10: Prinzip des Luciferase-Reporterassays. Adhärenente Zellen werden mit einem Expressionsplasmid und einem Reporterplasmid transfiziert. Während das Expressionsplasmid für das zu untersuchende Protein kodiert, trägt das Reporterplasmid die Promotorregion, die direkt vor das Luciferasegen kloniert wurde. Falls das exprimierte Protein zu einer Aktivierung des Promotors führt, wird die Luciferase exprimiert. Die Luciferaseaktivität kann nach Substratzugabe durch Messung des emittierten Lichtes bei 562 nm im Luminometer gemessen werden. Dabei wird Luziferin in Gegenwart von Sauerstoff, ATP und Mg^{2+} in Oxyluziferin und Kohlendioxid umgewandelt. Die Stärke der Luciferaseaktivität korreliert mit der Menge des exprimierten Enzyms.

Dazu wurde das Substrat für die β -Galactosidase (Galacton-Plus) im Verhältnis 1:100 im Substrat für die Luciferase (Luziferin / Puffer B) eingesetzt. Die Luciferaseaktivität wurde durch Zugabe von 100 μl Substratlösung (Luziferin/Galacton-Plus) durch das Gerät in relativen Lichteinheiten gemessen. Nach einer 45-minütigen Inkubation im Dunkeln erfolgte nach Zugabe von 100 μl Accelerator II die Messung der β -Galactosidaseaktivität. Alle gemessenen Luciferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte bezogen. Die normalisierten Luciferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, die dem Wert 1 gleichgesetzt wurden.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden nach der Methode von Laemmli (1970) mit der diskontinuierlichen SDS-PAGE aufgetrennt. Dieses Verfahren ermöglicht die Trennung von Proteinen und anderen Makromolekülen aufgrund ihrer Eigenschaft, in einem elektrischen Feld zu wandern. SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung von Proteinen überdeckt, so dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseinheit (ca. 1,4 g SDS pro g Protein) entstehen. Während der Elektrophorese wandern deshalb die Protein-SDS-Komplexe zur Anode. Die Erhitzung auf 95°C bei der Probenvorbereitung führt durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken zur Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Eine weitere Denaturierung der Proteine wird durch Zugabe von β -Mecaptoethanol erreicht, dass zur Spaltung von Schwefelbrücken zwischen Cysteinen führt.

Bei der SDS-PAGE überschichtet ein weitporiges Sammelgel ein engmaschiges Trenngel. Das Sammelgel dient der Vortrennung und Aufkonzentrierung der Proteine und besitzt im Vergleich zum Trenngel eine größere Porenweite, eine niedrigere Salzkonzentration und einen niedrigeren pH-Wert. Im Trenngel werden dann die SDS-Proteinkomplexe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Mit Hilfe von Markerproteinen können die Größen der zu analysierenden Proteine ermittelt werden. Als Laufpuffer wurde ein Tris-Glycin-Puffer verwendet.

4.3.1.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Bevor das Trenngel gegossen werden kann, müssen Glas- und Aluminiumplatte zunächst sorgfältig mit Alkohol und Aqua Bidest gesäubert werden. Mit Hilfe der Spacer wurden Glas- und Aluminiumplatte in die Gelgießapparatur eingespannt. Durch Verwendung eines fettenden Gels (Gelseal), das auf die Spacer dünn aufgetragen wird, kann die Haftung zwischen Glas- und Aluminiumplatte erhöht werden. Dies vermeidet in der Regel ein Auslaufen des Trenngels. Bei der Herstellung von SDS-Gelen ist darauf zu achten, dass die Polymerisation beginnt, sobald SDS, APS und TEMED zugegeben wurden (siehe Tab. 14). Das Trenn- bzw. Sammelgel muss zügig in die Gelgießapparatur gegossen werden. Nach dem Aufbau der Gelgießapparatur wurde vorsichtig das Trenngel hineingegossen und mit H₂O gesättigtem n-Butanol überschichtet, um die Ausbildung einer glatten Oberfläche zu gewährleisten. Nach der Polymerisation des Trenngels, wurde das n-Butanol gründlich mit destilliertem Wasser entfernt und restliche Flüssigkeit mit Hilfe von dünnem Filterpapier abgesaugt. Anschließend erfolgte die Überschichtung des Trenngels mit dem Sammelgel und der Elektrophoresekamm wurde in die noch flüssige Sammelgellösung eingesetzt.

Tabelle 14: Pipettierschema für ein denaturierendes Gel

Trenngel			Sammelgel	
10 %ig in ml	12 %ig in ml		5 %ig in ml	
7,50	7,50	Trenngelpuffer	2,50	Sammelgelpuffer
10,00	12,00	Acrylamid-Bis (30%)	3,30	Acrylamid-Bis (30%)
11,90	9,90	H ₂ O	13,70	H ₂ O
0,30	0,30	SDS (10%)	0,20	SDS (10%)
0,12	0,12	APS (10%)	0,12	APS (10%)
0,04	0,04	TEMED	0,04	TEMED

Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Bei Bedarf wurden die Gele in feuchte Papiertücher eingeschlagen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.3.1.2 Probenvorbereitung und Gelelektrophorese

Zum Nachweis der Expression viraler Proteine wurden 293-Graham-Zellen 48 h nach der Transfektion aus 6-Loch-Platten geerntet. Nachdem der Zellrasen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen wurde, erfolgte die Zugabe von 1 ml Lysispuffer, der zuvor mit 1% NP40, Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete Mini, Roche) und Benzonase komplementiert wurde. Dazu wurden eine Tablette des Protease-Inhibitor und 5 µl Benzonase (25 U/µl) auf 10 ml Lysispuffer gegeben. Nach Zugabe des Lysispuffers wurden die Platten für ca. 1 h auf Eis inkubiert und alle 10 min geschwenkt, um eine vollständige Lyse des Zellrasens zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit Hilfe eines Deckgläschens aus der Lochschale abgekratzt, in ein Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gelagert. Nach mehrfachem Vortexen wurden Zelltrümmer und unlösliches Material durch Zentrifugation entfernt (13000 Upm, 10 min, 4°C, Tischzentrifuge, Heraeus). Nach Abnahme der Überstände wurden 50 µl des Rohlysates zur Detektion im Westernblot abgenommen. Restlicher Überstand wurde entweder bei -20°C eingefroren oder für die Immunpräzipitation weiter verwendet (siehe 4.3.3). Nach Zugabe von 50 µl 2x SDS-Probenpuffer und 5 % β-Mercaptoethanol wurden die Proben für 5 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Ein 10%iges (Detektion von ORF50, ORF57) bzw. 12%iges SDS-Polyacrylamidgel (Detektion von ORFA6/BZLF1_h) wurde anschließend mit 15 µl Proteinextrakt und 5 µl Proteinmarker pro Geltasche beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 mA für ca. 1 h in Elektrophoresepuffer, bis die Bromphenolblau-Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurde das Sammelgel vom Trenngel getrennt und das Trenngel in Transferpuffer äquilibriert und geblottet.

4.3.2 Westernblot

Die Methode des Westernblots ermöglicht die Übertragung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine geeignete Membran. Dadurch werden verschiedene Färbe-, Nachweis- und Analysemethoden ermöglicht, die im Gel nicht durchführbar sind, weil die Proteine diffundieren würden. Blot-Membranen bestehen aus Nitrozellulose, Polyvinylchlorid (PVDF), positiv geladenem Nylon oder aus mit Polybren beschichteten Glasfasern. Die Bindung der Proteine an die Membranen erfolgt durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen. Für den Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine wurde hier eine PVDF-Membran (Gultekin & Heermann, 1988) verwendet, welche eine größere Bindungskapazität als z.B. Nitrozellulosemembranen besitzt. Aufgrund der starken, hydrophoben Eigenschaft der Membran muss allerdings eine Vorinkubation der Membran berücksichtigt werden. Dazu wird diese zuvor mit Methanol behandelt und anschließend mit Aqua bidest abgespült. Zum Blotten der Proteine wurden Gel, Blotmembran und Filterpapiere zunächst in Transferpuffer befeuchtet. Entsprechend der Gelgröße wurden Filterpapiere und PVDF-Membran zurechtgeschnitten und der Blot von unten nach oben in der folgenden Reihenfolge zwischen zwei flache Elektroden einer Blotkammer aufgebaut (1. Filterpapier, 2. Membran, 3. Gel, 4. Filterpapier). Der Transfer erfolgte in der Apparatur Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell für ca. 60 min bei $1,5-2 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche. Zur Kontrolle der Übertragung der Proteine wurde die Membran mit Ponceau-Rot behandelt, was zu einer reversiblen Färbung der Proteine führt. Durch Schwenken der Membran in PBS kann die Membran wieder entfärbt werden. Die Spuren der Proteinmarker wurden zuvor abgeschnitten und separat in Amidoschwarz-Lösung angefärbt. Durch Spülen dieser Membranspuren in Amidoschwarz-Entfärbelösung wurde unspezifisch gebundenes Amidoschwarz entfernt. Anschließend wurden die Membranen getrocknet und bis zur weiteren Verwendung im Dunklen aufbewahrt.

4.3.2.1 Immunologische Detektion von Proteinen

Die häufigste, verwendete Variante des Westernblot ist der Immunoblot, bei der Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Nach dem Transfer der Proteine auf die Blotmembran, erfolgt die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper, der das gesuchte Protein bindet (Primärantikörper). Durch Zugabe eines zweiten Antikörpers (Sekundärantikörper), der den ersten Antikörper erkennt und mit einem Enzym (Peroxidase bzw. Phosphatase) konjugiert ist, kann durch Zugabe des Enzymsubstrates das Zielprotein mittels Farb- oder Chemilumineszenzreaktion auf der Membran nachgewiesen werden. Peroxidase-markierte Antikörper katalysieren die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der Lumineszenz entsteht. Die Freisetzung des Lichtes wird durch Exposition der Membran auf einem Chemilumineszenzfilm nachgewiesen. Zur Detektion der Proteine auf

der PVDF-Membran wurde diese zunächst für 1,5 h in 20 ml Blockpuffer I auf einem Horizontalschüttler (Biometra) inkubiert, um restliche Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran in ca. 10 ml Primärantikörperlösung für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Zum Nachweis des c-Myc-markierten ORF50-Protein wurde der Maus anti-c-Myc Antikörper 1:5000 (Sigma) bzw. 1:1000 (Covance) in Blockpuffer II verdünnt. Der Maus anti-HA Antikörper (Covance) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet und diente zur Detektion von HA-markierten ORFA6/BZLF1_h-bzw. ORF57-Proteinen. Nach Bindung des Primärantikörpers wurde die Membran 3 x 5 min in Waschpuffer geschwenkt, um ungebundene Proteine zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran in ca. 10 ml Sekundärantikörperlösung für 1 h bei Raumtemperatur. Dabei wurde der Peroxidasegekoppelte anti-Maus IgG-Antikörper (Dianova) 1:10000 in Blockpuffer II verdünnt. Anschließend wurde die Membran erneut 3 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurde zunächst das Substrat für die Peroxidase durch Mischen von 1,5 ml Western Blotting Detection reagent 1 mit 1,5 ml Western Blotting Detection reagent 2 (Amersham) hergestellt. Danach wurde die Substratlösung auf die Membran getropft, gleichmäßig verteilt und für ca. 70 sek inkubiert. Nachdem überschüssiges Substrat von der Membran abgetropft war, wurde diese vorsichtig in Haushaltsfolie eingeschlagen und mit einem Chemilumineszenzfilm (Chemiluminescent Detection Film; Roche) in einer Röntgenkassette inkubiert. Nach einer variablen Belichtungszeit von 25 sek- 30 min wurde der Film entnommen und in dem Filmentwicklungsautomaten Curix-60 (Agfa) entwickelt.

4.3.3 Koimmunpräzipitation (Ko-IP)

Die Koimmunpräzipitation ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen eines der beiden Proteine gerichtet ist, werden das Zielprotein und sein potentieller Interaktionspartner aus dem Proteingemisch präzipitiert. Dabei wird der Antikörper-Protein-Komplex an Protein-G- und/oder Protein-A-Sepharose Kügelchen gebunden. Protein-G bzw. Protein-A sind Bestandteile der Zellwand von bestimmten Streptokokken-bzw. Staphylokokken-Stämmen, die spezifisch die Fc-Region vieler Immunglobuline der Klasse IgG von Säugern erkennen. Durch Zentrifugation der Sepharosekügelchen werden die dort gebundenen Komplexe isoliert und die Proteine anschließend durch Denaturierung gelöst. Das präzipitierte Protein und sein Interaktionspartner werden im Westernblot nachgewiesen. Die Methode der Ko-IP wurde angewandt, um die potentielle Interaktion zwischen PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h bzw. ORF50 und ORF57 nachzuweisen.

Transfektion und Ernte

293-Graham-Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen in 60 mm Schalen ausgesät und 24 h später mit den Expressionsplasmiden pCR-A6HAn und pCMV-50myc bzw. pCR-57HAn und pCMV-50myc kotransfiziert. Bei Präzipitation mit einem anti-HA Antikörper aus Kaninchen dienten Zellen als Negativkontrolle, die mit dem Kontrollplasmid pCMV-HA und pCMV-50myc transfiziert wurden. Bei Verwendung eines präzipitierenden anti-c-Myc Antikörpers aus Kaninchen dienten Zellen als Negativkontrolle, die mit dem Kontrollplasmid pCMV-myc und pCR-A6HAn bzw. pCR-57HAn transfiziert wurden. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h erfolgte die Ernte der Zellen. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS erfolgte die Zugabe von 1 ml Ko-IP-Lysispuffer, dem zuvor NP40 und Protease- und Phosphataseinhibitoren wie NaF, PMSF, Na_3VO_4 und der Proteininhibitorcocktail (Roche) frisch zugesetzt wurden. Nach Zugabe des Ko-IP-Lysispuffers wurden die Zellkulturschalen auf Eis für 1 h auf einem Horizontalschüttler inkubiert, um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Deckgläschens abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 3×30 sek vortexen erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 13000 Upm und 4°C für 10 min (Tischzentrifuge, Heraeus). Anschließend wurden die Lysate in ein neues Eppendorfgefäß überführt und $50 \mu\text{l}$ Rohlysat für den Westernblot weggefroren.

Bildung des Antikörper-Proteinkomplexes

Für die Präzipitation von HA-markiertem ORFA6/BZLF1_h- bzw. ORF57-Protein wurde ein polyklonaler anti-HA Antikörper aus Kaninchen (Covance) verwendet. Im analogen Experiment wurde c-Myc-markiertes ORF50-Protein mit dem anti-c-Myc Antikörper aus Kaninchen (Covance) präzipitiert. Nach Zugabe des Antikörpers (1:150 verd.) in die Rohlystate erfolgte die Inkubation der Proben für 2 h auf einem Rotator bei 4°C . Als Negativkontrolle wurde außerdem IgG aus nicht-immunisierten Kaninchen für die Präzipitation (1:20 verd.) verwendet, um eine mögliche unspezifische Bindung der PLHV-Proteine zu erkennen.

Pre-Clearing (Vorinkubation)

Vorversuche hatten gezeigt, dass die PLHV-1-Proteine ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57 in geringem Umfang unspezifisch an Protein-G-Sepharose binden. Um unspezifische Bindungsstellen abzudecken, wurde die Protein-G-Sepharose mit einem Ko-IP-Waschpuffer inkubiert, der neben allen Komponenten des Ko-IP-Lysispuffers zusätzlich 0,1 % Ovalbumin enthielt. Pro Ansatz wurden $40 \mu\text{l}$ Protein-G-Sepharose verwendet und zunächst bei 4000 Upm für 2 min abzentrifugiert. Nach Abnahme des überschüssigen Ethanol wurde die

Protein-G-Sepharose 1 x mit 500 μ l Ko-IP-Waschpuffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Je Ansatz wurden 60 μ l Ko-IP-Waschpuffer zugefügt, so dass je Probe 100 μ l gewaschene Protein-G-Sepharose vorlagen. Nach Zugabe von weiteren 500 μ l Ko-IP-Waschpuffer je Ansatz wurde die Protein-G-Sepharose für 2 h bei 4°C auf einem Rotator vorinkubiert.

Bindung des Antikörper-Proteinkomplexes an Protein-G-Sepharose

Nach der Vorinkubation der Protein-G-Sepharose mit dem Ko-IP-Waschpuffer erfolgte die Zentrifugation der Protein-G-Sepharose bei 4000 Upm für 2 min (RT, Tischzentrifuge, Heraeus). Anschließend wurde der Ko-IP-Waschpuffer abgesaugt und die Protein-G-Sepharose mit den Antikörper-Protein-Ansätzen vermischt. Die Bindung der Antikörper-Proteinkomplexe an die Protein-G-Sepharose erfolgte für 2 h bei 4°C auf einem Rotator. Anschließend wurden die Protein-G-Sepharose-Kügelchen bei 4000 Upm für 2 min abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Nachfolgend wurde die Protein-G-Sepharose 3 x 10 min mit 500 μ l Ko-IP-Waschpuffer gewaschen und nach jedem Waschschrift erneut abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand soweit abgesaugt, dass das Sepharose-Pellet nahezu trocken war. Die Pellets wurden nachfolgend bei -20°C eingefroren. Zur Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Protein-G-Sepharose-Pellets mit 35 μ l 1 x SDS-Probenpuffer und 5% β -Mercaptoethanol versetzt und für 5 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Proben sofort auf Eis überführt und kurz anzentrifugiert. Die Beladung des SDS-Gels erfolgte wie unter 4.3.1.2 beschrieben.

4.3.4 Immunfluoreszenz (IFA)

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz können Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Ein Sekundärantikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, erlaubt die Lokalisation des Proteins in der Zelle.

Humane 293-Graham-Zellen wurden dazu in einer 24-Lochplatte auf einem 15 mm \varnothing Glasplättchen ausgesät und 24 h später transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 500 μ l Fixierlösung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 μ l Blockpuffer III für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Dazu wurde der Maus anti-c-Myc (Sigma) bzw. Maus anti-HA (Covance) Antikörper 1:500 in Blockpuffer III verdünnt. Nachdem 3 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen wurde, schloss sich eine 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Rhodamin Red- markierten Sekundärantikörper (Dianova; 1:200 verdünnt) an. Danach wurden die Zellen 3 x 5 min mit

bidestilliertem Wasser gewaschen. Zur Anfärbung der DNA wurde der Farbstoff DAPI verwendet, der 1:20000 in ddH₂O verdünnt wurde. Die Zellen wurden anschließend mit 250 µl der DAPI-Lösung für 10 min im Dunkeln inkubiert. Nachdem 2 x mit bidestilliertem Wasser gewaschen wurde, erfolgte die Einbettung der Deckgläser auf Objektträgern mit Immumount (Shandon). Die Auswertung der Proben erfolgte am nächsten Tag mittels konfokaler Laser-Scanmikroskopie, nachdem die Proben über Nacht bei 4°C ausgehärtet waren.

4.3.5 Konfokale Laser-Scanmikroskopie (cLSM)

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde 1955 von M. Minsky entwickelt. Im Gegensatz zu einem Durchlicht- oder konventionellen Fluoreszenzmikroskop wird das vom Präparat ausgehende Licht durch eine Lochblende geführt, bevor es vom Detektor registriert wird. Signale, die aus anderen Ebenen oberhalb oder unterhalb der Fokusebene stammen, werden dadurch ausgeblendet. Somit wird das Streulicht erheblich reduziert und die Auflösung ist deutlich höher als bei der konventionellen Mikroskopie. Im cLSM (*confocal laser scanning microscope*) wird ein Bild aus Einzeldaten zusammengesetzt, wobei jede Probe Punkt für Punkt und Zeile für Zeile sequenziell abgetastet wird. Der Durchmesser der Lochblende bestimmt zusammen mit dem Mikroskopobjektiv und dessen numerischer Apertur die Dicke des optischen Schnittes. Im Computer wird dann ein Schnittbild zusammengesetzt, das die Probe hoch aufgelöst wiedergibt. Zeichnet man mehrere Schnitte in verschiedenen Fokusebenen auf, so können diese im Computer zu dreidimensionalen Bildern des Objektes zusammengesetzt werden. Im cLSM dient ein Laser (Argon/Krypton) als Lichtquelle, der sowohl blaues als auch grünes Anregungslicht liefert. Durch die Anregung des Fluorochroms werden die Elektronen kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau gehoben und die Anregungsenergie wird zeitversetzt in Form einer anderen Wellenlänge emittiert. Dieses Fluoreszenzlicht kann dann gemessen und analysiert werden. Ein cLSM verfügt in der Regel über mindestens zwei Kanäle, so dass zwei Fluoreszenzsignale (Doppelmarkierungen) im identischen Präparat simultan oder sequentiell gescannt und anschließend digital zu einem Bild rekonstruiert werden können.

Die Lokalisation der viralen Proteine mittels cLSM erfolgte über Rhodamin-markierte Sekundärantikörper. Die Anregung des Rhodamins erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm, während das Licht bei 461 nm emittiert wurde. Die DNA wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI markiert. Zur Anregung von DAPI wurde eine Quecksilberdampf Lampe verwendet, die Licht einer Wellenlänge von 359 nm lieferte. Das durch DAPI emittierte Licht wurde bei 461 nm dokumentiert.

5. Ergebnisse

5.1 Methodische Grundlagen

5.1.1 Klonierung in Expressionsvektoren

5.1.1.1 Konstruktion von ORF50-, ORFA6/BZLF1_h- und ORF57-Expressionsplasmiden

Zur Untersuchung der Transkriptionsaktivität von ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57 im Luziferase-Reporterassay mussten die Gene zunächst in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Mittels nested-PCR wurden die vollständigen Sequenzabschnitte von orf50, orfA6/BZLF1_h und orf57 von PLHV-1 amplifiziert und in den Vektor pCR3.1-uni (Invitrogen) kloniert. In Abbildung 11 ist die Strategie zur Amplifikation und Klonierung der PLHV-1-Gene dargestellt. Um die gerichtete Klonierung der PCR-Fragmente in den Vektor pCR3.1-uni zu gewährleisten, wurden phosphorylierte (P) s-Primer eingesetzt. Anschließend wurden die PCR-Fragmente in die *EcoRI* / *HindIII*-Schnittstelle des Vektors kloniert.

Unter Verwendung von genomischer DNA (#56a) sowie cDNA (#1776) aus dem PLHV-1 positiven Lymphknoten bzw. Milz eines Miniaturschweines wurde sowohl die genomische als auch die gespleißte Variante des orfA6/BZLF1_h von PLHV-1 kloniert. Mit Hilfe der Primerpaare 1911s/1911as und P-1912s/1912as erfolgte die Amplifikation des genomischen und gespleißten orfA6/BZLF1_h (Abb. 11). Nach Klonierung der Fragmente in pCR3.1-uni erhielten die Konstrukte die Bezeichnung pCR-A6/BZLF1sp und pCR-A6/BZLF1g. Die Klonierung von orf50 erfolgte in seiner gespleißten Form, da das Vollängen-Gen aufgrund seiner Größe von 2485 bp für die Klonierung in den Vektor pCR3.1-uni als ungeeignet erschien. Mit Hilfe der Primerpaare 1821s/1821as und P-1733s/1733as und cDNA als Matrize wurde orf50 mit einer Größe von 1546 bp amplifiziert (Abb. 11). Das erhaltene Konstrukt wird im Folgenden als pCR-50 bezeichnet. Nach Amplifikation des genomischen orf57 mit den Primerpaaren 2897s/2897as und P-1734s/1734as wurde das PCR-Fragment in pCR3.1-uni kloniert (Abb. 11). Das Konstrukt wird im Folgenden als pCR-57 bezeichnet. Als Negativkontrolle wurde ein 32 bp Fragment, das neben Restriktionsschnittstellen für *SalI* und *BamHI* auch zwei Stop-Codons enthielt, in den pCR3.1-uni Vektor kloniert. Die erfolgreiche Insertion des Fragmentes in den pCR3.1-uni Vektor konnte durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *SalI* bzw. *BamHI* kontrolliert werden. Dieser Kontrollvektor erhielt die Bezeichnung pCR-NS (pCR-NonSense). Eine Übersicht über die erzeugten Expressionsplasmide zeigt Tabelle 15 in Abschnitt 5.1.1.2. Die für die nested-PCR verwendeten Primer und Amplifikatgrößen und der Verwendungszweck der Konstrukte ist ebenfalls dargestellt. Alle Primersequenzen sind dem Abschnitt 3.4, Tabelle 5 zu entnehmen.

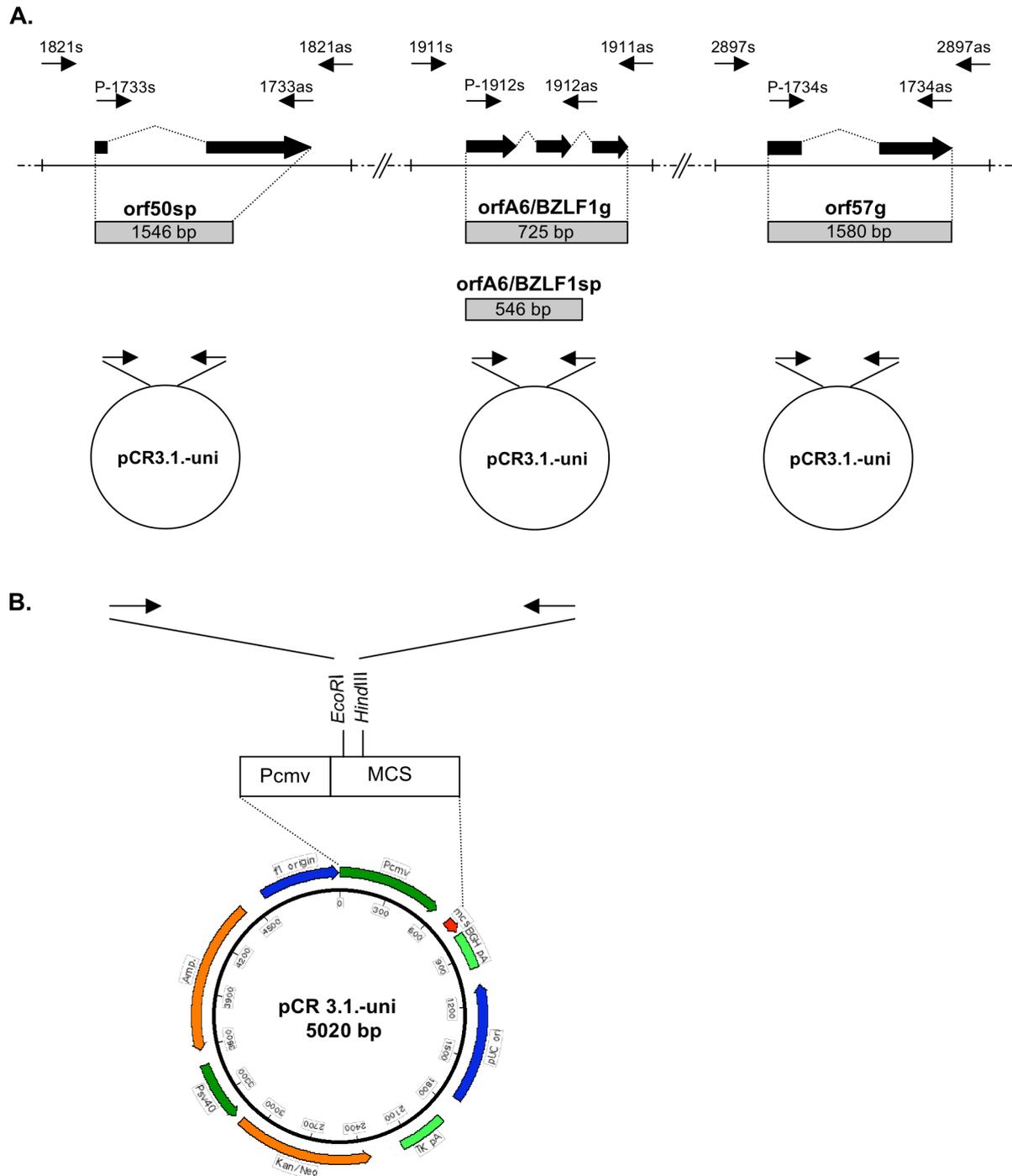


Abb. 11: Klonierung von PLHV-1 orf50, orfA6/BZLF1_h und orf57 in pCR3.1-uni.

A. Dargestellt ist die Amplifikation von orf50, orfA6/BZLF1_h und orf57 mittels nested-PCR. Vom orfA6/BZLF1_h wurde sowohl die gespleißte (sp) als auch die genomische (g) Variante amplifiziert. Kodierende Gensequenzen (Exons) sind als schwarze ausgefüllte Pfeile dargestellt, während nicht-kodierende Bereiche (Introns) als gepunktete Linien gekennzeichnet sind. Die Bindungsregionen der externen (1821s/as; 1911s/as; 2897s/as) und internen Primerpaare (P-1733s/as; P-1912s/as; P-1734s/as) sind durch schmale Pfeile gekennzeichnet. Die internen s-Primer sind phosphoryliert (P). Flankierende Bereiche sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Größen der amplifizierten PCR-Fragmente sind in grau unterlegten Boxen angegeben. **B.** Die Klonierung der PCR-Fragmente erfolgte in den Expressionsvektor pCR3.1-uni. In der Abbildung B ist die multiple Klonierungsstelle (mcs) mit den Schnittstellen für *EcoRI* und *HindIII* heraus vergrößert. Die Transkription steht unter Kontrolle des viralen CMV-Promotors (Pcmv).

Die Plasmide zur Expression von EBV BZLF1 und BRLF1 wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W. Hammerschmidt, GSF München, zur Verfügung gestellt (Feederle et al., 2000). In beiden Konstrukten steht die Transkription, wie im Vektor pCR3.1-uni, unter Kontrolle des CMV-Promotors, so dass die Stärke der Genexpression mit der des pCR3.1-uni Vektors vergleichbar sein sollte. Die Konstrukte erhielten die Bezeichnung pCMV-BZLF1 und pCMV-BRLF1. Alle Expressionskonstrukte wurden mittels Sequenzierung überprüft.

5.1.1.2 Konstruktion von Plasmiden zur Expression von ORF50-, ORFA6/BZLF1_h- und ORF57-Fusionsproteinen

Zum Nachweis der Expression der viralen Proteine mittels Westernblot und für Lokalisationsstudien wurden ORFA6/BZLF1_h, ORF57 und ORF50 von PLHV-1 als Fusionsproteine exprimiert.

Mit Hilfe der Primer P-2232s und 2232as und pCR-A6/BZLF1sp bzw. pCR-A6/BZLF1g als Matrize wurde ein Hämagglutinin (HA)-tag an das 5'-Ende der Gensequenz des genomischen bzw. gespleißten orfA6/BZLF1_h angefügt. Nach Klonierung der PCR-Fragmente in die *EcoRI* / *HindIII*-Schnittstelle des Vektors pCR3.1-uni erhielten die Konstrukte die Bezeichnung pCRA6/BZLF1sp-HAn und pCRA6/BZLF1g-HAn (Tab. 15). Mit dem Primerpaar P-2233s/2233as und den Konstrukten pCR-A6/BZLF1sp und pCR-A6/BZLF1g als Matrizen wurden die C-terminal HA-markierten Varianten der ORFA6/BZLF1_h-Proteine erzeugt. Nach Insertion der PCR-Fragmente in die *EcoRI* / *HindIII*-Schnittstelle von pCR3.1-uni erhielten die Plasmide die Bezeichnung pCRA6/BZLF1g-HAc bzw. pCRA6/BZLF1sp-HAc (Tab. 15).

In Analogie wurden Konstrukte zur Expression von ORF57 mit N- und C-terminalem HA-tag erstellt. Unter Verwendung von pCR-57 als Matrize und den Primerpaaren P-2840s/2840as bzw. P-2841s/2841as erfolgte die Amplifikation des orf57 mit nachfolgender Klonierung in die *EcoRI* / *HindIII*-Schnittstelle von pCR3.1-uni (Abb. 12). Die Plasmide werden im Folgenden als pCR57-HAn und pCR57-HAc bezeichnet (Tab. 15).

Für mögliche Interaktionsstudien zwischen den viralen PLHV-1-Proteinen ORF50 und ORFA6/BZLF1_h wurde der orf50 zunächst mit einem Flag-tag am 5'-bzw. 3'-Ende der Gensequenz markiert und in den pCR3.1-uni Vektor kloniert. Die Konstrukte erhielten die Bezeichnung pCR-50sp-FLn und pCR-50sp-FLc (Tab. 15). Die Expression der Flag-Fusionsproteine in der Zellkultur konnte weder durch Westernblot noch in der Immunfluoreszenzanalyse (IFA) gezeigt werden. Aus diesen Gründen musste der orf50 mit einem anderen, geeigneten Marker erneut kloniert werden. Die Klonierung der genomischen und gespleißten Variante von orf50 erfolgte mittels nested-PCR in den Vektor pCMV-myc (BD Biosciences). Dieser Vektor enthält einen c-Myc-tag zur Expression N-terminal markierter Proteine. Mit Hilfe der Primerpaare 1821s/1821as und 2989s/2989as und cDNA

bzw. genomische DNA als Matrize wurde der gespleißte bzw. ungespleißte orf50 durch PCR amplifiziert. Über die mit den nested-PCR Primern eingeführten *EcoRI* / *XhoI*-Restriktionsschnittstellen erfolgte die Insertion in pCMV-myc. Die Konstrukte werden im Folgenden als pCMV50g-myc und pCMV50sp-myc bezeichnet (Tab. 15). Die Größen der Amplifikate und nested-PCR Primer, sowie alle Expressionskonstrukte sind in Tabelle 15 aufgelistet. Alle Primersequenzen sind dem Abschnitt 3.4, Tabelle 6 zu entnehmen.

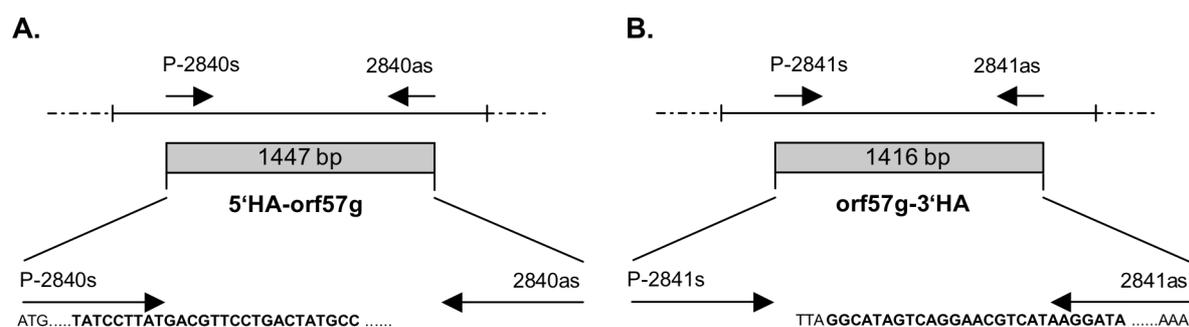


Abb. 12: Strategie zur Herstellung von Hämagglutinin (HA)-markierten ORF57-Proteinen. **A.** Dargestellt ist die Amplifikation des ungespleißten orf57 mit den Primern 2840s/2840as, deren Bindungsregion durch Pfeile dargestellt ist. Über den phosphorylierten (P) s-Primer 2840 wurde ein HA-tag an das 5'-Ende der Gensequenz von orf57 angefügt. Der HA-tag in der Primersequenz ist fett hervor gehoben. Die Größe des amplifizierten PCR-Produktes ist ebenfalls angegeben. **B.** Durch Amplifikation von orf57 mit den Primern 2841s/as wurde ein HA-tag an das 3'-Ende der Gensequenz von orf57 angefügt. Die Sequenz des HA-tags im Primer 2841as ist fett hervor gehoben. Anschließend erfolgte die Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pCR3.1-uni. Damit standen die Vektoren pCR-57HAn und pCR-57HAc zur Expression von N- und C-terminal markierten ORF57-Proteinen zur Verfügung.

Tabelle 15: Übersicht über die erzeugten Expressionskonstrukte

Ziel-Gen (PLHV-1)	nested-PCR Primer	Amplifikatgröße (bp)	Bezeichnung des Konstruktes	Verwendungszweck
orf50sp	1733 s/as	1546	pCR-50	Luziferase-Reporterassay
orf50sp	2989 s/as	1553	pCMV50sp-myc	Westernblot, Immunfluoreszenz
orf50g	2989 s/as	2505	pCMV50g-myc	Westernblot, Immunfluoreszenz
orf50sp	2919 s/2280 as	1563	pCR50sp-FLn	Westernblot, Immunfluoreszenz
orf50sp	2929 s/2921 as	1557	pCR50sp-FLc	Westernblot, Immunfluoreszenz
orfA6/BZLF1 _h sp	1912 s/as	546	pCRA6/BZLF1sp	Luziferase-Reporterassay
orfA6/BZLF1 _h g	1912 s/as	725	pCRA6/BZLF1g	Luziferase-Reporterassay
orfA6/BZLF1 _h sp	2232 s/as	559	pCRA6/BZLF1sp-HAn	Westernblot, Immunfluoreszenz
orfA6/BZLF1 _h sp	2233 s/as	552	pCRA6/BZLF1sp-HAc	Westernblot, Immunfluoreszenz
orfA6/BZLF1 _h g	2232 s/as	738	pCRA6/BZLF1g-HAn	Westernblot, Immunfluoreszenz
orfA6/BZLF1 _h g	2233 s/as	731	pCRA6/BZLF1g-HAc	Westernblot, Immunfluoreszenz

Ziel-Gen (PLHV-1)	Primer	Amplifikatgröße (bp)	Bezeichnung des Konstruktes	Verwendungszweck
orf57g	1734 s/as	1580	pCR-57	Luziferase-Reporterassay
orf57g	2840 s/as	1447	pCR57-HAn	Westernblot, Immunfluoreszenz
orf57g	2841 s/as	1416	pCR57-HAc	Westernblot, Immunfluoreszenz

FL- Flag; HA- Hämagglutinin; n- N-terminal; c- C-terminal; sp- gespleißt; g- genomisch

5.1.2 Klonierung in Luziferase-Reportervektoren

5.1.2.1 Klonierung von PLHV-1-Promotoren

Zur Untersuchung des Aktivierungspotentials von PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57 wurden sechs verschiedene PLHV-1-Promotoren in den Luziferase-Reportervektor pGL3-basic (Promega) kloniert. Die Auswahl dieser Promotoren erfolgte nach den Erkenntnissen über die Reaktivierung von EBV aus der Latenz. Die Induktion der lytischen EBV-Replikation wird durch die beiden *immediate early*-Transkriptionsaktivatoren BZLF1 und BRLF1 reguliert (Abschnitt 2.5). Deren frühe Expression führt zur Aktivierung von *early*-Genen wie z.B. orfBMLF1, orfBMRF1, der viralen DNA-Polymerase und *late*-Genen wie z.B. dem Strukturprotein Glykoprotein B. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die Promotoren folgender PLHV-1-Gene ausgewählt: orf50 und orfA6/BZLF1_h (*immediate early*-Gene), orf57, orf59 und orf09 (DNA-Polymerase; *early*-Gene), orf08 (Glykoprotein B; *late*-Gen).

Die Amplifikation der Promotorfragmente erfolgte mittels nested-PCR, wobei die inneren Primer Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym *Xma*I trugen. Die Amplifikatgrößen lagen zwischen 1043 bp und 1478 bp. Bei der Amplifikation des orf57-Promotors wurde erst in der zweiten PCR-Runde mit den Primern 2062s/2062as ein PCR-Fragment erhalten. Anschließend erfolgte die ungerichtete Klonierung der PCR-Fragmente in die *Xma*I-Schnittstelle des Vektors pGL3-basic. Die Konstrukte erhielten die Bezeichnung pGL-pA6, pGL-p50, pGL-p57, pGL-p59, pGL-pDPol und pGL-pgB. In Abschnitt 5.1.2.2, Tabelle 16 sind die für die nested-PCR verwendeten Primer und Größen der amplifizierten PCR-Fragmente dargestellt. Alle verwendeten Primer sind dem Abschnitt 3.4, Tabelle 7 zu entnehmen.

5.1.2.2 Klonierung von EBV-Promotoren

Zur Untersuchung einer möglichen Wechselwirkung zwischen dem humanen Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem porzinen lymphotropen Herpesvirus Typ-1 (PLHV-1) auf molekularer Ebene wurden heterologe Luziferase-Reporterassays durchgeführt. Dazu wurden die Promotoren von EBV-Genen in den pGL3-basic Vektor kloniert, die von EBV BZLF1 und BRLF1 nachweislich aktiviert werden (Abb. 13). Dies umfasste die Promotoren von

orfBZLF1, orfBRLF1, orfBMLF1 und orfBMRF1, die entweder durch direkte Bindung von BZLF1 und BRLF1 an definierte Sequenzbindeelemente oder indirekt über zelluläre Faktoren aktiviert werden (siehe Abschnitte 2.5.1.1; 2.5.2.1; Liu & Speck 2003; Flemington & Speck 1990a; Quinlivan et al., 1993; Kolman et al., 1996).

Alle EBV-Promotorfragmente wurden mittels nested-PCR amplifiziert und in den Vektor pGL3-basic (Promega) kloniert. Die Amplifikation des orfBRLF1-Promotors erfolgte mit den Primerpaaren 2556s/2556as und 2557s/2557as, die Restriktionsschnittstellen für *SacI* und *NheI* tragen. Das PCR-Fragment von 543 bp wurde nachfolgend in die *SacI* / *NheI*-Schnittstelle von pGL3-basic kloniert. Mit den Primerpaaren 2552s/2552as und 2553s/2553as wurde ein 397 bp großes PCR-Fragment erzeugt, das den Bereich des orfBZLF1-Promotors umfasste. Der Promotor von orfBMRF1 mit einer Größe von 424 bp wurde durch Amplifikation mit den Primerpaaren 2554s/2554as und 2555s/2555as erzeugt. Dabei wurden die amplifizierten Promotorbereiche von orfBZLF1 bzw. orfBMRF1 an ihren 5'-Enden mit *NheI* und *HindIII* Restriktionsschnittstellen versehen, über welche die Fragmente in pGL3-basic kloniert wurden. Mit den Primerpaaren 2558s/2558as und 2559s/2559as wurde der Promotor von orfBMLF1 mit einer Größe von 719 bp amplifiziert und an seinen 5'-Enden mit Restriktionsschnittstellen für *KpnI* und *HindIII* versehen. Die Ligation des orfBMLF1-Promotors erfolgte nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *HindIII* in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pGL3-basic. Die erzeugten Plasmide erhielten die Bezeichnung pGL-pBZLF1, pGL-pBRLF1, pGL-pBMRF1 und pGL-pBMLF1. Tabelle 16 zeigt die für die nested-PCR verwendeten Primer und Größen der Amplifikate. Alle verwendeten Primer sind dem Abschnitt 3.4, Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 16. Übersicht über die erzeugten Luziferase-Reportergenvektoren

Zielpromotor	Virus	Genombereich (nt)	Primer	Amplifikatgröße (bp)	Bezeichnung des Konstruktes
orfA6/BZLF1 _h	PLHV-1	67135-68421	2055 s/as	1305	pGL-pA6
orf50	PLHV-1	64556-65752	2052 s/as	1215	pGL-p50
orf57	PLHV-1	76528-77552	2062 s/as	1043	pGL-p57
orf59	PLHV-1	81164-82385	2053 s/2054 as	1240	pGL-p59
orf09/DPOI	PLHV-1	16043-17502	2060 s/2059 as	1478	pGL-pDPOI
orf08/gB	PLHV-1	13404-14684	2058 s/as	1299	pGL-pgB
orfBZLF1	EBV	103156-103534	2553 s/as	397	pGL-pBZLF1
orfBRLF1	EBV	106091-106615	2557 s/as	543	pGL-pBRLF1
orfBMLF1	EBV	84086-84786	2559 s/as	719	pGL-pBMLF1
orfBMRF1	EBV	79492-79897	2555 s/as	424	pGL-pBMRF1

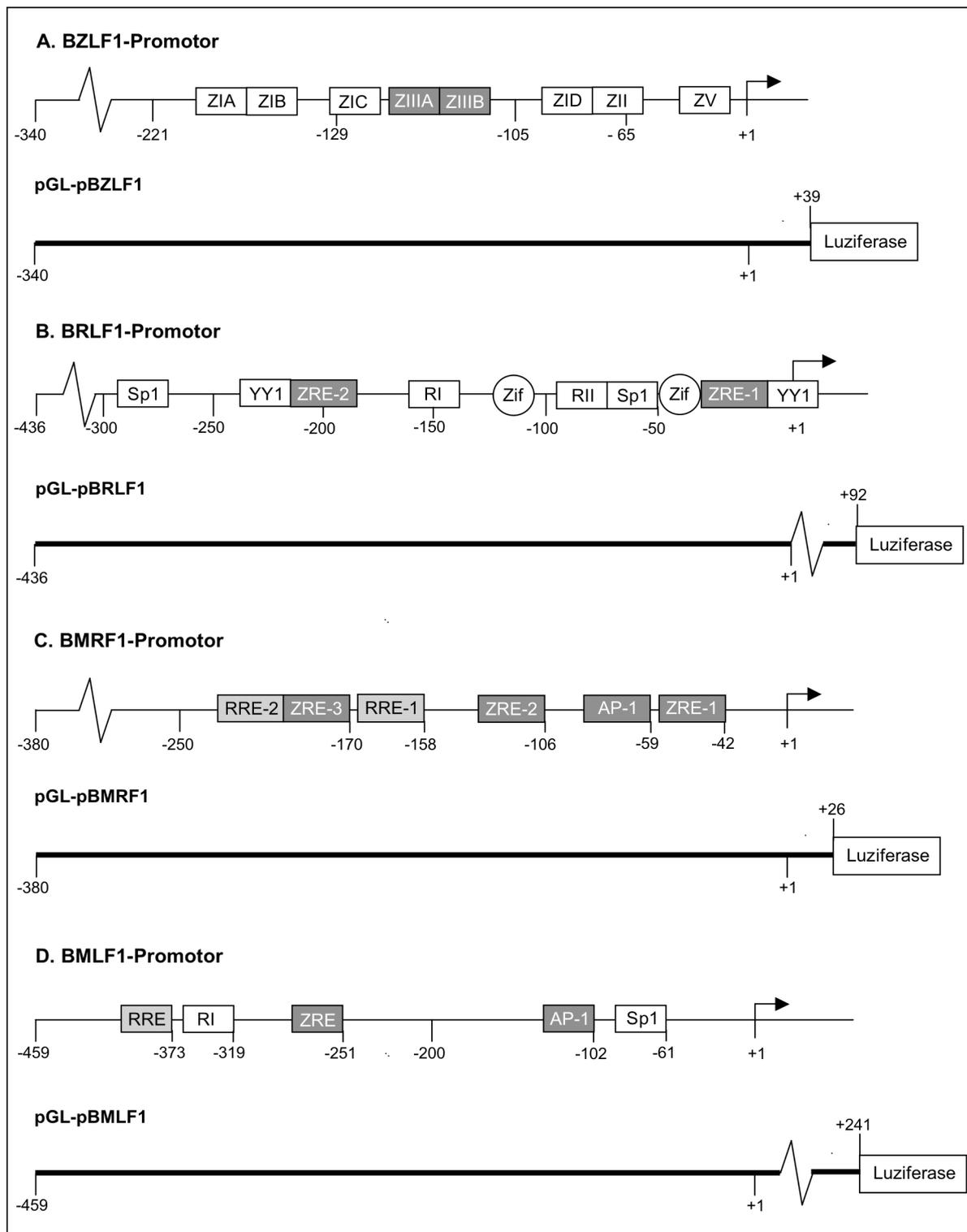


Abb. 13: Schematische Darstellung von beschriebenen Sequenzbindeelementen für Transkriptionsfaktoren in vier ausgewählten EBV-Promotoren. Dargestellt sind die bisher identifizierten Sequenzbindeelemente der EBV-Promotoren orfBZLF1 (A), orfBRLF1 (B), orfBMRF1 (C) und orfBMLF1 (D). Dunkelgrau unterlegt sind Boxen für die Bindung von BZLF1 (ZRE, AP-1, ZIII). Hellgrau unterlegt stellen Bindesequenzen für BRLF1 dar (RRE). Die Boxen für die Bindung von zellulären Faktoren sind weiß unterlegt (Sp1, YY1, ZIA-ZID (Sp1, Sp3, MEF2D), ZII (ATF-2, c-Jun), ZI, RI, RII (TRE- TPA response element); AP-1). Unter jedem der skizzierten EBV-Promotorregionen ist der klonierte Bereich des jeweiligen Promotors (pGL-pBZLF1, pGL-pBRLF1, pGL-pBMRF1, pGL-pBMLF1) in den Reportergenvektor pGL3-basic dargestellt. +1 markiert den Transkriptionsstartpunkt

Quellen: Flemington & Speck, 1990a; Liu & Speck, 2003; Quinlivan et al., 1993; Kolman et al., 1996

5.1.3 Untersuchungen zur Transkription der Expressionsplasmide

Zur Kontrolle der Funktionalität der erzeugten Expressionskonstrukte pCR-A6/BZLF1sp, pCR-A6/BZLF1g, pCR-57 und pCR-50 wurde die Transkription der viralen Gene mittels RACE-PCR überprüft. Zunächst wurden 293-Graham-Zellen mit den Expressionsplasmiden transfiziert und nach 48 h RNA isoliert. Nach der Synthese der cDNA wurden alle viralen Transkripte in der 3'RACE detektiert. Die mittels 3'RACE erhaltenen PCR-Produkte wurden sequenziert.

Das Transkript von orfA6/BZLF1_h mit einer Größe von 519 bp ist doppelt gespleißt und besteht aus drei Exons und zwei Introns. Zur Analyse der Transkription von orfA6/BZLF1_h wurden die Primer 2410s, 2498s und 2500s eingesetzt, die jeweils am Transkriptionsstart des Exon 1, Exon 2 bzw. Exon 3 binden. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der 3'RACE nach Transfektion von Zellen mit pCR-A6/BZLF1sp bzw. pCR-A6/BZLF1g. Unter Verwendung des 3'RACE-Primers 2410s wurde wie erwartet das vollständig gespleißte orfA6/BZLF1_h-Transkript mit einer Größe von 595 bp amplifiziert, wenn Zellen mit dem gespleißten Konstrukt pCR-A6/BZLF1sp transfiziert worden waren (Abb. 14, Spur 1).

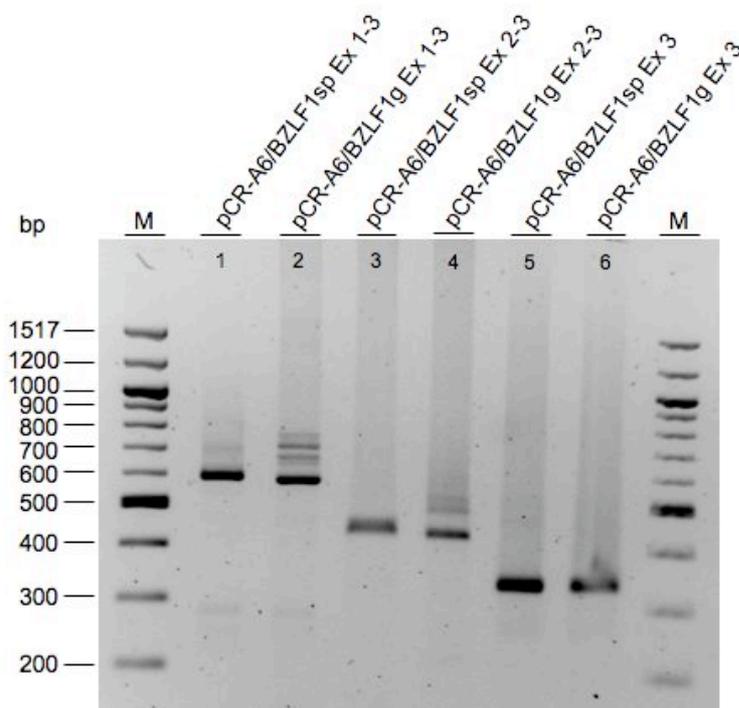


Abb. 14: Nachweis der Transkription von orfA6/BZLF1_h mittels RACE. 293-Graham-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pCR-A6/BZLF1sp bzw. pCR-A6/BZLF1g transfiziert und die RNA nach 48 h aus den Zellen isoliert. Nach reverser Transkription der RNA in cDNA wurden die gespleißten bzw. ungespleißten orfA6/BZLF1-Transkripte mittels 3'RACE nachgewiesen. Unter Verwendung des Primers 2410s wurden die Exons 1-3 (Ex 1-3) des orfA6/BZLF1_h amplifiziert (Spur 1, 2). Die Amplifikation der Exons 2-3 (Ex 2-3) des orfA6/BZLF1_h wurden mit Hilfe des Primers 2498s erzeugt (Spur 3, 4). Unter Verwendung des Primers 2500s erfolgte die Amplifikation des Exons 3 (Ex 3) des orfA6/BZLF1_h (Spur 5, 6). Die PCR-Produkte wurden nachfolgend in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

Bei Transfektion der Zellen mit dem genomischen Konstrukt pCR-A6/BZLF1g konnte neben dem vollständig gespleißten Transkript, auch das ungespleißte Transkript mit einer Größe von 774 bp nachgewiesen werden (Abb. 14, Spur 2). Daneben wurde ein PCR-Fragment mit der Größe von ca. 680 bp amplifiziert, bei der es sich wahrscheinlich um ein unvollständig gespleißtes Transkript handelt (Abb. 14, Spur 2). Auch bei Amplifikation mit dem 3'RACE-Primer 2498s wurde in Zellen, die mit dem Plasmid pCR-A6/BZLF1g transfiziert wurden, neben dem gespleißten PCR-Hauptprodukt von 432 bp, das die Exons 2 und 3 enthält, noch das ungespleißte Transkript mit einer Größe von 530 bp detektiert (Abb. 14; Spur 4). Bei Verwendung des 3'RACE-Primers 2500s wurde wie erwartet nur Exon 3 mit einer Größe von 338 bp amplifiziert (Abb. 14; Spur 5, 6).

Das Transkript von orf50 mit einer Größe von 1534 bp ist einfach gespleißt. Beim Spleißprozess wird ein Intron mit einer Größe von 952 bp herausgeschnitten. Zum Nachweis der Transkription von orf50 in pCR-50-transfizierten Zellen wurde der 3'RACE-Primer 2464s verwendet, der im Exon 2 bindet und ein Amplifikat von 495 bp Größe erzeugte (Abb. 15, Spur 1).

Das Transkript von orf57 ist ebenfalls einfach gespleißt und hat eine Größe von 1387 bp. Zum Nachweis der orf57-mRNA wurde ein 3'RACE-Primer verwendet, der im Exon 2 bindet. Nach Transfektion von Zellen mit pCR-57 konnte nach Amplifikation mit 2842s ein PCR-Fragment der erwarteten Größe von 409 bp nachgewiesen werden (Abb. 15, Spur 2).

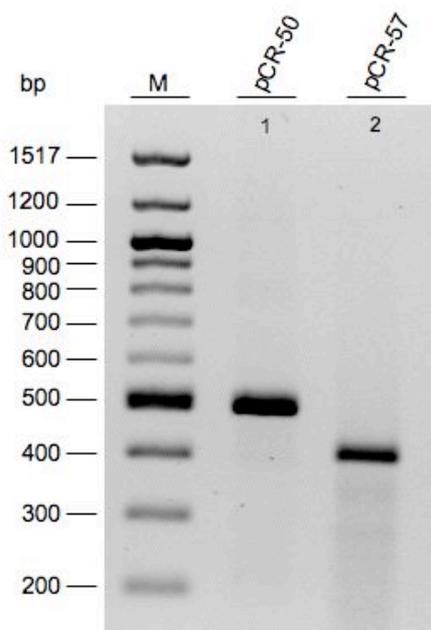


Abb. 15: Nachweis der Transkription von orf50 bzw. orf57 mittels RACE. 293-Graham-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pCR-50 bzw. pCR-57 transfiziert und die RNA nach 48 h aus den Zellen isoliert. Nach Synthese der cDNA erfolgte der Nachweis der orf50- bzw. orf57-Transkripte mittels 3'RACE. Unter Verwendung des 3'RACE-Primers 2464s wurde ein Teil des Exon 2 von orf50 amplifiziert (Spur 1). Mit Hilfe des Primers 2842s konnte ein Teilfragment des Exon 2 von orf57 amplifiziert werden (Spur 2). Die PCR-Produkte wurden nachfolgend in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

Die Leserahmen orfA6/BZLF1_h, orf50 und orf57 werden in den Konstrukten pCR-A6/BZLF1sp, pCR-A6/BZLF1g, pCR-50 bzw. pCR-57 transkribiert. Dies lässt erwarten, dass die Expressionsplasmide auch die entsprechenden Proteine exprimieren.

5.2 Versuchsergebnisse

5.2.1 Expression der PLHV-1-Proteine ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57

Die Expression der PLHV-1-Proteine ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57 wurde mittels Westernblot überprüft. Zum Nachweis von ORF50 wurden 293-Graham-Zellen transient mit den Expressionskonstrukten pCMV50g-myc und pCMV50sp-myc transfiziert, in denen orf50 am 5'-Ende mit einem c-Myc-tag vorliegt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem anti-c-Myc Primärantikörper aus Maus (Covance), der wiederum von einem anti-Maus IgG Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Dianova) erkannt wurde. Im Westernblot wurde c-Myc-markiertes ORF50-Protein mit einer molekularen Masse von ca. 70-72 kDa nachgewiesen (Abb. 16). Neben dieser Hauptproteinbande wurde eine schwächere Bande bei ca. 38 kDa detektiert, bei der es sich vielleicht um ein Abbauprodukt oder eine Spleißvariante handeln könnte. Die Expression von ORF50 wurde sowohl in Zellen nachgewiesen, die mit pCMV50g-myc als auch mit pCMV50sp-myc transfiziert wurden (Abb. 16). Das im Westernblot ermittelte Molekulargewicht von ORF50 variiert von der mittels MacVector errechneten Größe von 60,3 kDa um ca. 12 kDa.

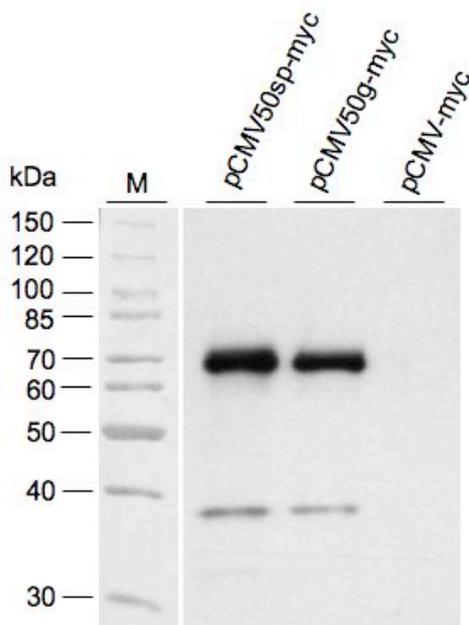


Abb. 16: Expression N-terminal c-Myc-markierter ORF50-Proteine.

293-Graham-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten pCR50sp-myc, pCR50g-myc bzw. dem Kontrollvektor pCMV-myc transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Proteinextrakte wurden nachfolgend in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Westernblot mit einem anti-c-Myc-Primärantikörper aus Maus, der von einem anti-Maus Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert wurde.

Zur Detektion von ORF57 wurden 293-Graham-Zellen transient mit den Konstrukten pCR57-HAn und pCR57-HAc transfiziert, für deren Genprodukte eine molekulare Masse von 51,2 kDa bzw. 50,9 kDa berechnet wurde. Der Nachweis erfolgte über einen anti-HA Antikörper aus Maus (Covance), der durch einen anti-Maus IgG Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Dianova) detektiert wurde. Im Westernblot wurde die N-terminal markierte Variante von ORF57 mit einer Größe von ca. 57 kDa detektiert, während das C-terminal markierte Protein eine Größe von ca. 54 kDa hatte (Abb. 17 A).

Unter Verwendung derselben Antikörper wurde die Expression von N- und C-terminal HA-markierten Varianten von ORFA6/BZLF1_h überprüft. Nach transienter Transfektion von 293-Graham-Zellen mit den Konstrukten pCRA6/BZLF1sp-HAn und pCRA6/BZLF1sp-HAc bzw. pCRA6/BZLF1g-HAn und pCRA6/BZLF1g-HAc wurde ORFA6/BZLF1_h im Westernblot mit einer molekularen Masse von ca. 24 kDa (N-terminal) bzw. 22 kDa (C-terminal) detektiert (Abb. 17 B). Diese Größen entsprachen recht gut den mittels MacVector ermittelten Größen von 21,9 kDa (N-terminal) bzw. 21,8 kDa (C-terminal). Dabei wurde das C-terminal markierte ORFA6/BZLF1_h-Protein deutlich schwächer exprimiert als die N-terminal markierte Variante. Im Westernblot wurde nur die ORFA6/BZLF1_h-Variante detektiert, die vom genomischen orfA6/BZLF1_h exprimiert wurde.

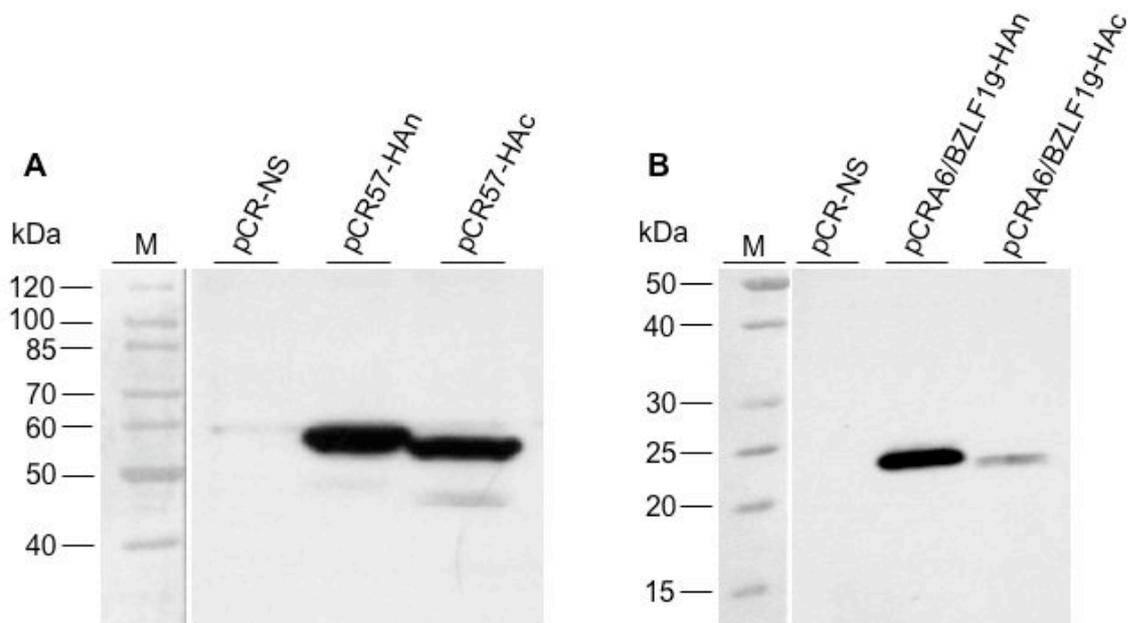


Abb. 17: Expression N- bzw. C-terminal HA-markierter ORF57- und ORFA6/BZLF1_h-Proteine. 293-Graham-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten pCR57-HAn (A), pCR57-HAc(A) oder pCRA6/BZLF1g-HAn (B), pCRA6/BZLF1g-HAc (B) bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS (A, B) transfiziert und nach 48 h die Zellextrakte gewonnen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10%igen (ORF57) oder 12%igen (ORFA6/BZLF1_h) SDS-Gel. Die Detektion der Proteine im Westernblot erfolgte mit einem anti-HA-Primärantikörper aus Maus, der von einem anti-Maus Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert wurde.

5.2.2 Subzelluläre Lokalisation der PLHV-1-Proteine ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57

Die Analyse der Aminosäuresequenz von ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57 identifizierte putative Kernlokalisierungssignale (siehe Abschnitte 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3). Um zu überprüfen, ob die PLHV-1-Proteine tatsächlich im Zellkern transfizierter Zellen lokalisiert sind, wurden die markierten Fusionsproteine mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie (cLSM) nachgewiesen. 293-Graham-Zellen wurden mit dem Expressionskonstrukt pCMV50g-myc transient transfiziert, um nach 48 h c-Myc-markiertes ORF50-Protein zu detektieren. Zunächst erfolgte die Bindung des anti-c-Myc Primärantikörpers aus Maus (Covance) an ORF50. Mit Hilfe eines Rhodamin-gekoppelten Sekundärantikörpers (Dianova) konnte die Expression von c-Myc-markiertem ORF50-Protein nachgewiesen werden (Abb. 18 A; Spalte 1). Die zelluläre DNA wurde mit dem Farbstoff DAPI angefärbt, so dass die Zellkerne im blauen Wellenlängenbereich des Lichtes fluoreszierten (Abb. 18 B; Spalte 2). Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder zeigte, dass ORF50 im Zellkern der Zelle, aber außerhalb der Nukleoli lokalisiert ist (Abb. 18 A; Spalte 3). Als Negativkontrolle wurden 293-Graham-Zellen mit dem Vektor pCMV-myc transfiziert. Es wurde kein c-Myc-markiertes Protein detektiert (Abb. 18 B). Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden 293-Graham-Zellen mit dem Expressionsplasmid pEGFP-N3 transfiziert und GFP (*green fluorescent protein*) mittels cLSM detektiert. Der Prozentsatz der GFP-exprimierenden Zellen lag bei mehr als 70% (Abb. 18 C).

Zur Lokalisation von ORFA6/BZLF1_h wurden 293-Graham-Zellen mit den Expressionskonstrukten pCRA6/BZLF1g-HAn bzw. pCRA6/BZLF1g-HAc transfiziert, so dass zum einen N-terminal HA-markiertes ORFA6/BZLF1_h-Protein und zum anderen C-terminal HA-markiertes ORFA6/BZLF1_h in den Zellen exprimiert wurde. Die Detektion HA-markierter Proteine erfolgte mit einem anti-HA Primärantikörper aus Maus, der von einem Rhodamin-gekoppelten Sekundärantikörper gebunden wurde. Mittels cLSM konnte sowohl N-terminal (Abb. 19 A) als auch C-terminal (Abb. 19 B) markiertes ORFA6/BZLF1_h-Protein im Zellkern lokalisiert werden. Auch hier sind die Nukleoli deutlich zu erkennen. In ihnen wurde kein ORFA6/BZLF1_h nachgewiesen (Abb. 19 A-B; Spalte 3). Bei der Transfektion von 293-Graham-Zellen mit dem Expressionskonstrukt pCRA6/BZLF1sp-HAn konnte keine Proteinexpression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den Westernblots überein, in denen ebenfalls keine Expression der gespleißten Variante des ORFA6/BZLF1_h nachgewiesen wurde (Abschnitt 5.2.1).

Zur Lokalisation von ORF57 wurden 293-Graham-Zellen mit den Expressionsplasmiden pCR57-HAn bzw. pCR57-HAc transfiziert, die zur Expression von N- bzw. C-terminal HA-markierten Varianten vom ORF57-Protein führten. Nach 48 h erfolgte die Lyse der Zellen mit nachfolgender Visualisierung der N- (Abb. 19 C) bzw. C-terminal (Abb. 19 D) markierten

ORF57-Proteine im Nucleus der Zelle mittels cLSM. Auch hier wurde ORF57 nach Überlagerung der Fluoreszenzbilder eindeutig im Zellkern, aber außerhalb der Nucleoli detektiert (Abb. 19 C-D; Spalte 3). Als Negativkontrolle dienten 293-Graham-Zellen, die mit dem Vektor pCR-NS transfiziert wurden (Abb. 19 E).

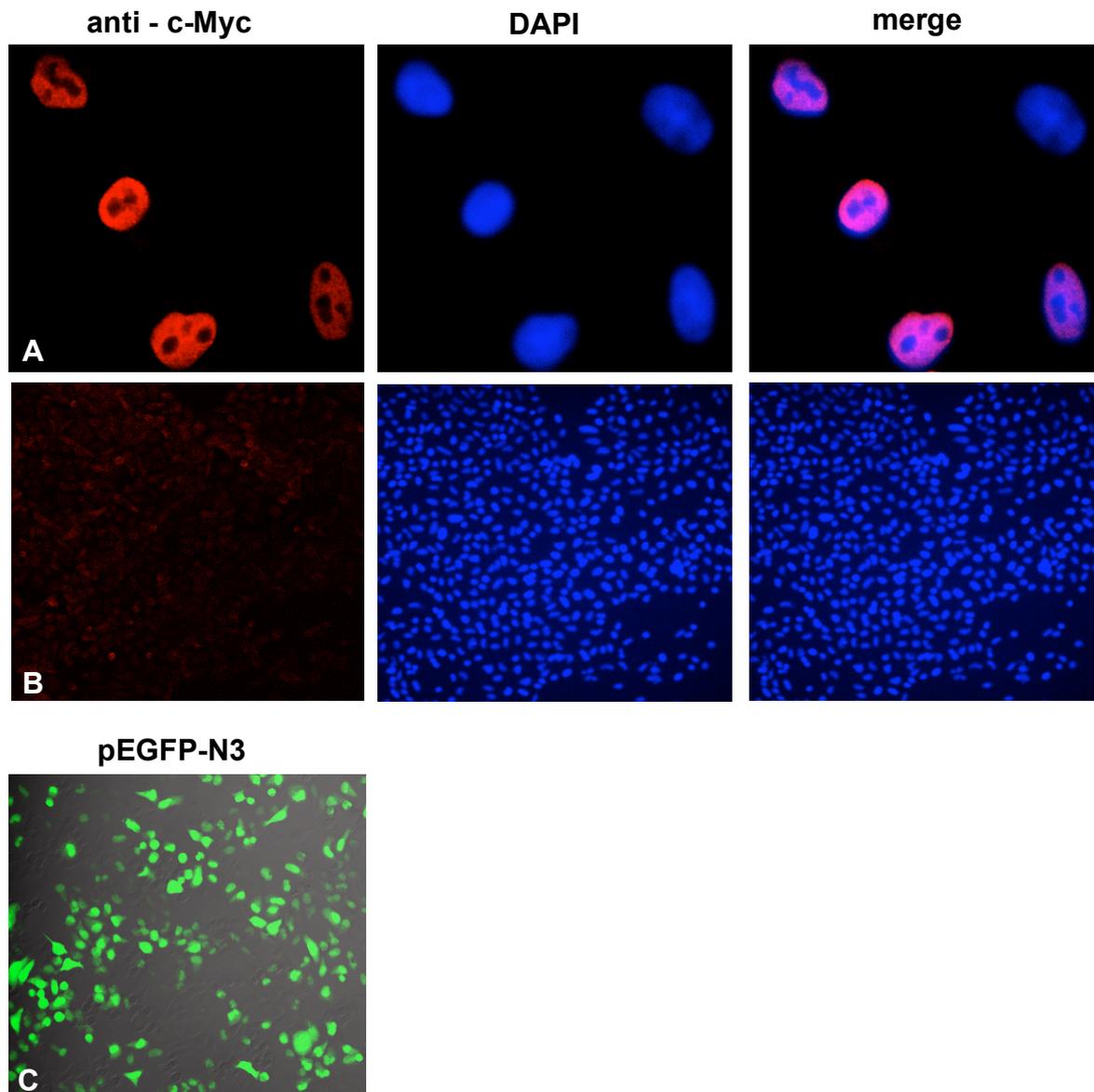


Abb. 18: Lokalisierung der ORF50-Proteine von PLHV-1 im Zellkern. 293-Graham-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pCMV50g-myc (A) bzw. dem Kontrollvektor pCMV-myc (B) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die c-Myc-markierten Proteine mit einem anti-c-Myc-Antikörper detektiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit einem Rhodamin-gekoppelten Sekundärantikörper mittels cLSM (A: 63x vergrößert; B: 10x vergrößert). Als Transfektionskontrolle wurden 293-Graham-Zellen mit dem GFP-Expressionsplasmid pEGFP-N3 (C) transfiziert, nach 48 h lysiert und die GFP-Fluoreszenz mittels cLSM detektiert (C: 10x vergrößert). (Spalte 1 A,B: c-Myc-markierte Proteine; Spalte 2 A,B: DNA-Färbung mittels DAPI; Spalte 3 A,B: Überlagerung der Fluoreszenzbilder aus Spalte 1 und 2).

Die von PLHV-1 orf50, orfA6/BZLF1_n und orf57 exprimierte Proteine sind im Zellkern transfizierter Zellen lokalisiert, wobei keine Fluoreszenzsignale in den Nucleoli beobachtet wurden.

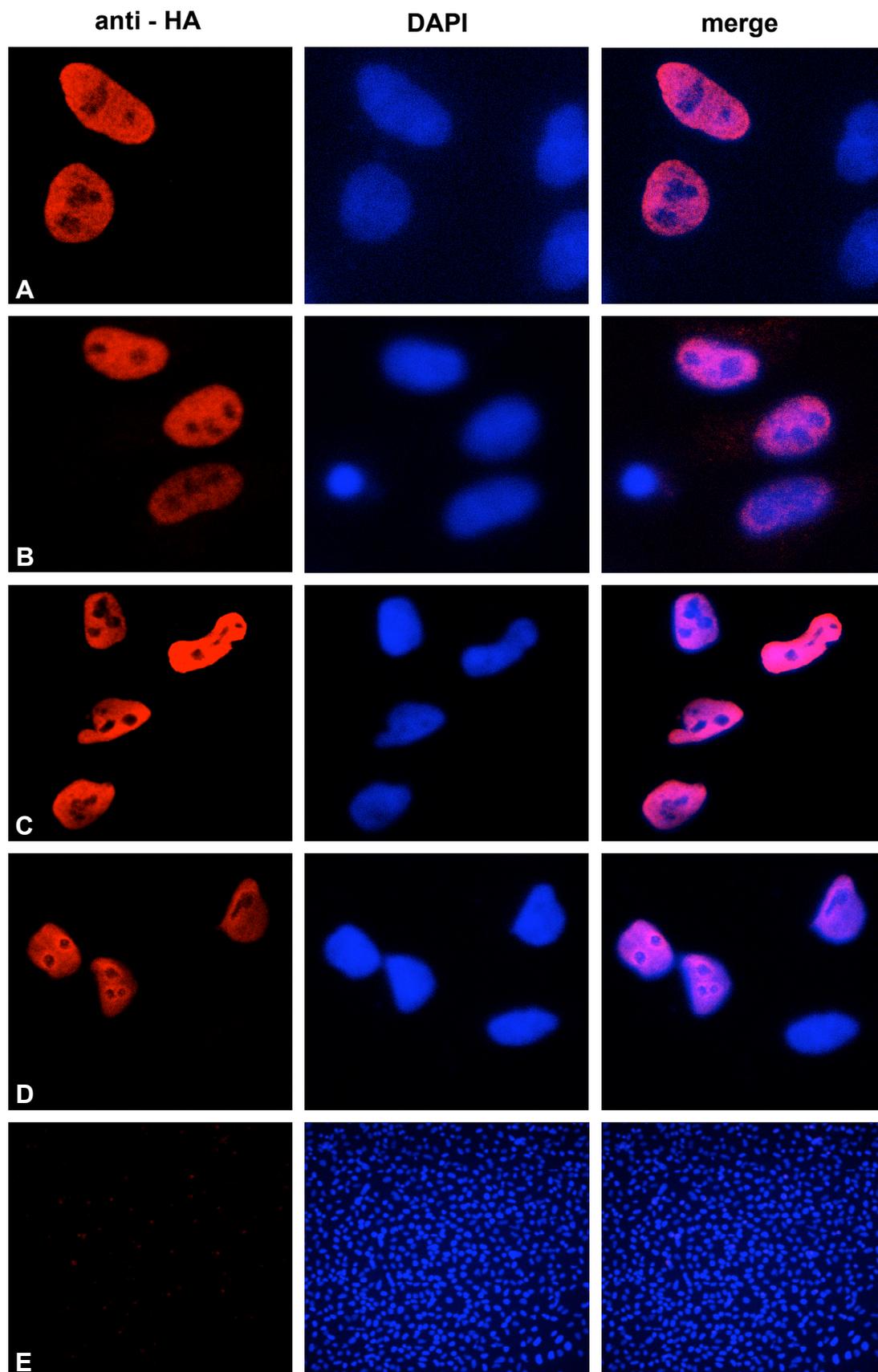


Abb. 19: Lokalisierung der PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h- und ORF57-Proteine im Zellkern. 293-Graham-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pCRA6/BZLF1-HAn (A), pCRA6/BZLF1-HAc (B), pCR57-HAn (C), pCR57-HAc (D) bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS (E) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen präpariert und die HA-markierten Proteine mit einem anti-HA-Antikörper detektiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit einem Rhodamin-gekoppelten Sekundäntikörper mittels cLSM. (A-D: 63x vergrößert; E: 10x vergrößert; Spalte 1: HA-markierte Proteine; Spalte 2: DNA-Färbung mittels DAPI; Spalte 3: Überlagerung der Fluoreszenzbilder aus Spalte 1 und 2).

5.2.3 Untersuchung der Transkriptionsaktivität von PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57

Das Transaktivierungspotential von PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57 gegenüber verschiedenen PLHV-1-Promotoren wurde in einem Luciferase-Reporterassay untersucht. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich ein β -Galactosidase-Expressionsplasmid kotransfiziert.

5.2.3.1 Vorversuche zur Optimierung des Luciferase-Reporterassay

5.2.3.1.1 Einfluss der Temperatur

Zur Überprüfung einer eventuellen Temperaturabhängigkeit der Luciferase- bzw. β -Galactosidaseaktivität wurden porcine Makrophagen-Zellen (IPAM) mit dem Expressionsplasmid pCR-50 und jeweils einem von sechs verschiedenen PLHV-1-Reporterplasmiden (pGL-p) kotransfiziert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Kontrollplasmid pCR-NS und denselben PLHV-1-Reporterplasmiden transfiziert wurden. Die Proben der Zelllysate wurden zur Messung der Luciferase- und β -Galactosidaseaktivität entweder in eine eisgekühlte oder raumtemperierte 96-Lochplatte pipettiert. Die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen in porcinen Makrophagen-Zellen (IPAM) sind in Abbildung 20 dargestellt.

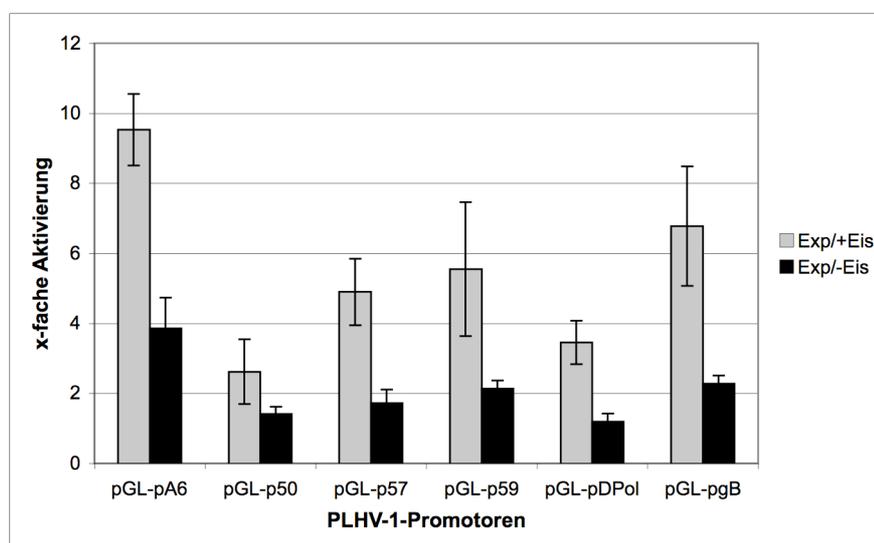


Abb. 20: Optimierung des Luciferase-Reporterassays. IPAM-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCR-50 bzw. dem Kontrollplasmid pCR-NS und je einem der PLHV-1-Reporterplasmide (pGL-p) transfiziert und die Zellextrakte nach 48 h gewonnen. Zur Messung der Luciferase- bzw. β -Galactosidaseaktivität wurden die Proben entweder in eine eisgekühlte 96-Lochplatte (+Eis) oder eine raumtemperierte 96-Lochplatte (-Eis) pipettiert. Alle Luciferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die mit dem Expressionsplasmid erhaltenen, normalisierten Luciferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten mit (+Eis) bzw. ohne Kühlung (-Eis) der Proben.

In beiden Experimenten konnte durch Kühlung der 96-Lochplatte (Exp/+Eis) eine deutlich höhere (ca. 3-9-fach) Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität gemessen werden als bei den ungekühlten Proben (Exp./-Eis; 1-4-fach).

Alle nachfolgenden Messungen der Luziferase- und β -Galactosidase-Aktivität wurden in eisgekühlten Platten durchgeführt.

5.2.3.1.2 Einfluss der Transfektionsreagenz auf die Transfektionsrate

Für die Transfektion von adhärenen Zellen (293-Graham, PK15, IPAM) standen zwei verschiedene Transfektionsreagenzien, Effectene (Qiagen) und GenePorterTM2 (Peqlab), zur Verfügung, deren Eignung für jede der drei Zelllinien getestet wurde. PK15-, IPAM- und 293-Graham-Zellen wurden mit pCR-50 und jeweils einem von sechs verschiedenen PLHV-1-Reporterplasmiden (pGL-p) kotransfiziert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit pCR-NS und den PLHV-1-Reporterplasmiden transfiziert wurden. In Abbildung 21 sind die Mittelwerte für die porzinen Zellen (PK15; IPAM) aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei Verwendung von GenePorterTM2 wurden deutlich höhere Luziferase und β -Galactosidaseaktivitäten in PK15-Zellen gemessen als bei Transfektion mit Effectene.

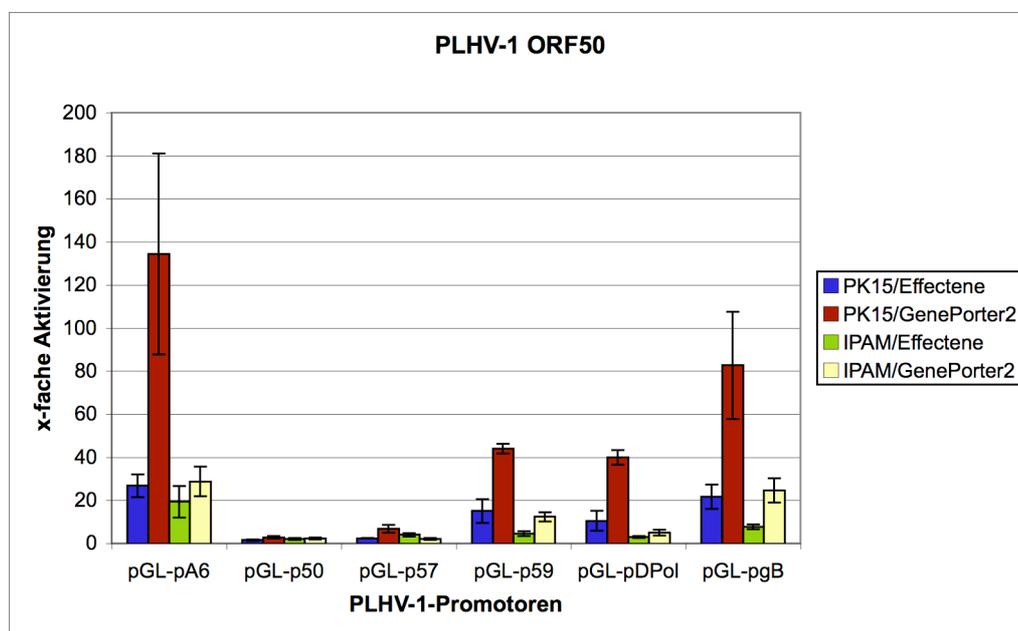


Abb. 21: Optimierung der Transfektion adhärenen Zellen. Porzine Zellen (PK15, IPAM) wurden mit pCR-50 bzw. pCR-NS und je einem der PLHV-1-Reporterplasmide (pGL-p) unter Verwendung von Effectene oder GenePorterTM2 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte gewonnen und die Messung der Luziferase- bzw. β -Galactosidaseaktivität durchgeführt. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die mit dem Expressionsplasmid erhaltenen, normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten gewonnen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

So wurde eine 134-fache Aktivierung des orfA6/BZLF1_h-Promotors durch ORF50 bei Transfektion mit GenePorterTM2 in PK15-Zellen gemessen, während die Transfektion mit Effectene nur eine 27-fache Aktivierung desselben Promotors ergab. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Aktivierung der Reporter-genkonstrukte pGL-59, pGL-DPol und pGL-gB erhalten. Auch die porzinen IPAM-Zellen ließen sich in Gegenwart von GenePorterTM2 besser transfizieren als mit Effectene. Die Unterschiede in den Aktivierungsraten der einzelnen Promotoren waren hier zwar nicht so gravierend wie in PK15-Zellen, aber dennoch signifikant. Bei der Transfektion von 293-Graham-Zellen mit Effectene und GenePorterTM2 konnten keine signifikanten Unterschiede in den Aktivierungsraten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Transfektion von IPAM- und PK15-Zellen wurde in den weiteren Versuchen GenePorterTM2 verwendet, während Effectene für die Transfektion von humanen 293-Graham-Zellen diente. Bei Verwendung von hohen DNA-Konzentrationen wurde für die Transfektion von 293-Graham-Zellen auch GenePorterTM2 verwendet.

5.2.3.2 Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57

5.2.3.2.1 Transkriptionsaktivität von PLHV-1 ORF50

Zur Analyse des Transaktivierungspotentials von ORF50 wurden drei verschiedene Zelllinien mit dem Expressionskonstrukt pCR-50 und jeweils einem von sechs verschiedenen PLHV-1-Reporter-genplasmiden pGL-p50, pGL-pA6, pGL-p57, pGL-p59, pGL-Dpol bzw. pGL-gB unter Verwendung von Effectene (293-Graham) bzw. GenePorterTM2 (PK15, IPAM) transfiziert. Als Negativkontrolle diente der Expressionsvektor pCR-NS, der mit denselben Reporter-genplasmiden kotransfiziert wurde. Mit Ausnahme des orf50-Promotors führte ORF50 zu einer verstärkten Aktivierung aller untersuchten PLHV-1-Promotoren (Abb. 22). Dabei waren die Aktivierungsraten in 293-Graham- und PK15-Zellen deutlich höher als in IPAM-Zellen. In humanen 293-Graham-Zellen wurde eine sehr starke Stimulation des orfA6/BZLF1_h-Promotors (144-fach) und des orf08/gB-Promotors (289-fach) gemessen. Die Promotoren des orf57 und orf09/DPol wurden in ähnlicher Stärke (34/39-fach) aktiviert, während die Stimulation des orf59-Promotors (94-fach) mehr als doppelt so hoch war.

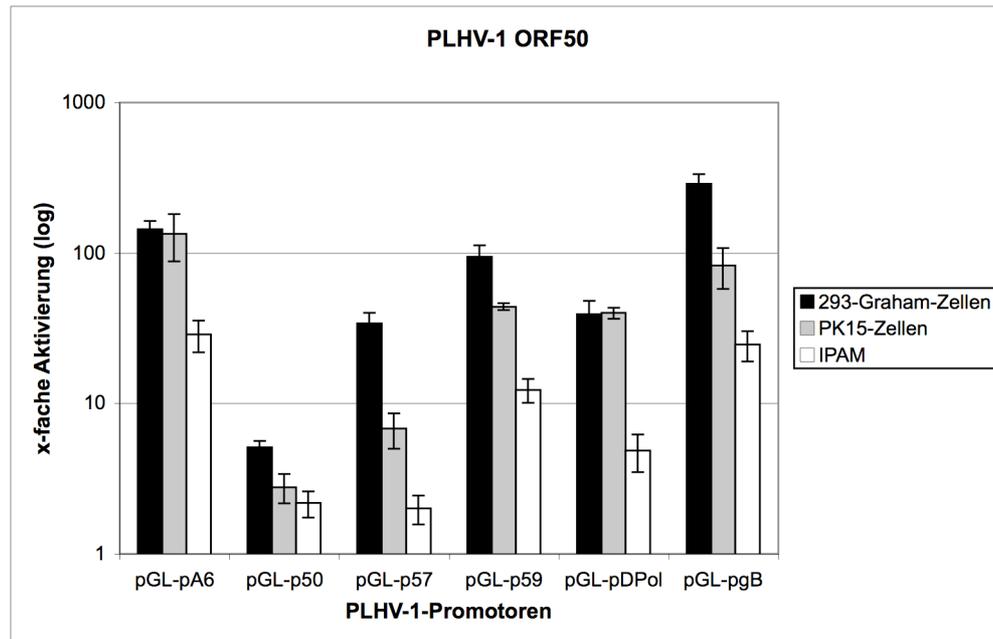


Abb. 22: Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORF50. 293-Graham-, PK15- und IPAM-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCR-50 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der PLHV-1-Reportergenplasmide (pGL-p) transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen und die Messung der Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die mit dem Expressionsplasmid erhaltenen normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Daten wurden aus fünf unabhängigen Versuchen gewonnen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

ORF50 zeigte außerdem eine relativ geringe Autoaktivierung im Luziferaseassay. Die Aktivierung des eigenen Promotors um den Faktor 5 konnte in 293-Graham-Zellen gezeigt werden. Vergleichbare Werte in der Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch ORF50 wurden in PK15- und IPAM-Zellen gemessen (Abb. 22). Auch hier wurde besonders die Promotoraktivität des *orfA6/BZLF1_h*, *orf08/gB* und *orf59* durch ORF50 stimuliert, während die Autostimulation (2-3-fach) sehr gering ausfiel. Zur Überprüfung der konzentrationsabhängigen Stimulation der Promotoren durch ORF50 wurden 293-Graham-Zellen mit gesteigerten DNA-Mengen (150, 300, 450, 600 ng) pCR-50 und 300 ng Reportergenplasmid pGL-p50, pGL-pA6, pGL-p57, pGL-p59 transfiziert. Als Negativkontrolle diente der Vektor pCR-NS, der mit denselben Reportergenplasmiden transfiziert wurde. Aufgrund der hohen DNA-Konzentrationen wurde GenePorterTM2 als Transfektionsreagenz verwendet. Abbildung 23 verdeutlicht die konzentrationsabhängige Stimulation der PLHV-1-Promotoren durch ORF50 in 293-Graham-Zellen.

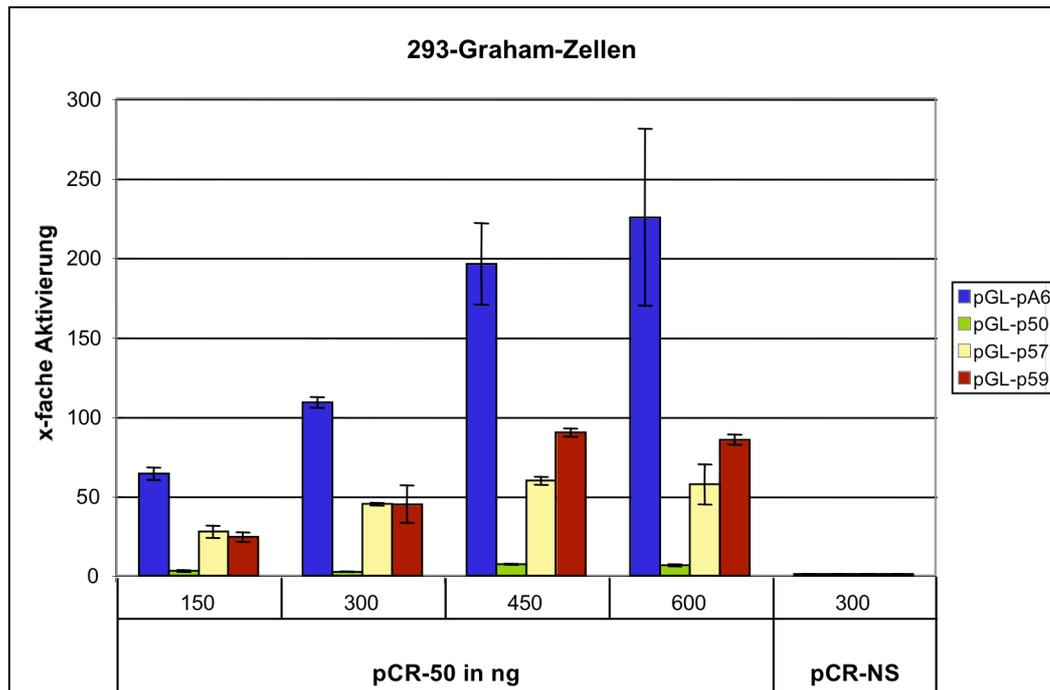


Abb. 23: Konzentrationsabhängige Stimulation von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORF50.

293-Graham-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCR-50 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der PLHV-1-Reportergenplasmide pGL-pA6, pGL-p50, pGL-p57 bzw. pGL-p59 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellysate gewonnen und die Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität gemessen. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

PLHV-1 ORF50 wurde als starker Transkriptionsaktivator für verschiedene PLHV-1-Gene identifiziert.

5.2.3.2.2 Transkriptionsaktivität von PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h

Im Gegensatz zu PLHV-1 ORF50 konnte für ORFA6/BZLF1_h nur eine moderate Aktivierung von PLHV-1-Promotoren ermittelt werden. Bei Verwendung der Expressionskonstrukte pCR-A6/BZLF1sp und pCR-A6/BZLF1g wurden deutliche Unterschiede in der Aktivierbarkeit der Promotoren gemessen. Vorversuche zeigten, dass das Genprodukt des genomischen orfA6/BZLF1_h (pCR-A6/BZLF1g) im Gegensatz zum gespleißten orfA6/BZLF1_h (pCR-A6/BZLF1sp) kaum oder keine Aktivierungseigenschaften zeigte (Abb. 24). Dies stimmt mit Ergebnissen aus den Westernblots überein, in denen keine Expression der gespleißten Variante von ORFA6/BZLF1_h gezeigt werden konnte (Abschnitt 5.2.1). Aus diesen Gründen wurde für alle weiteren Luziferase-Reportergenstudien das Konstrukt mit der genomischen orfA6/BZLF1_h-Variante pCR-A6/BZLF1g verwendet.

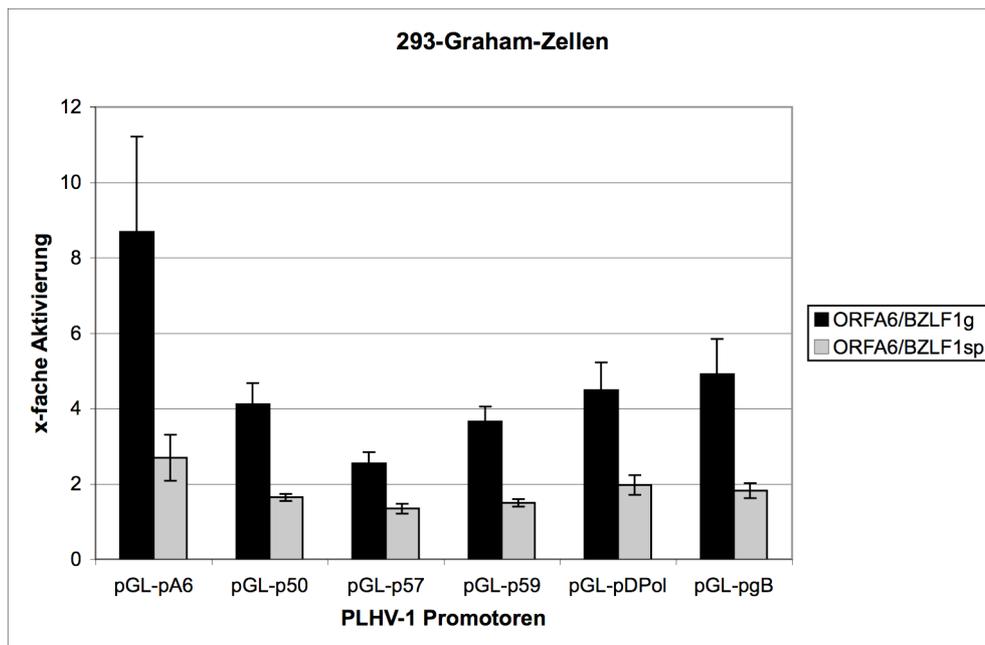


Abb. 24: Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORFA6/BZLF1g und ORFA6/BZLF1sp. 293-Graham-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pCR-A6/BZLF1g, pCR-A6/BZLF1sp bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der PLHV-1-Reporterplasmide (pGL-p) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte gewonnen und die Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität gemessen. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen gewonnen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Die Kotretransfektion von pCR-A6/BZLF1g bzw. des Kontrollvektors pCR-NS und jeweils einem der PLHV-1 Reporterplasmide pGL-p50, pGL-pA6, pGL-p57, pGL-p59, pGL-Dpol bzw. pGL-gB erfolgte in IPAM-, PK15- und 293-Graham-Zellen unter Verwendung von Effectene (293-Graham) und GenePorterTM2 (PK15, IPAM). Die höchsten Aktivierungsraten (2,5-9-fach) wurden in humanen 293-Graham-Zellen gemessen (Abb. 25). PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h stimulierte die Expression der orfs 50, 57, 59, 09/DPol und 08/gB 2,5-5-fach, wobei für orf57 die geringste Aktivierung gemessen wurde. Die stärkste Aktivierung (9-fach) wurde für seinen eigenen Promotor ermittelt. Diese starke Autostimulation wurde allerdings nur in 293-Graham-Zellen gemessen. In PK15-Zellen lag die Aktivierungsrate der PLHV-1-Promotoren zwischen 1,5-3-fach, während in IPAM-Zellen keine Stimulation der PLHV-1-Promotoren nachweisbar war (Abb. 25). Zur Überprüfung der konzentrationsabhängigen Stimulation der Promotoren durch ORFA6/BZLF1_h wurden 293-Graham-Zellen mit verschiedenen DNA-Mengen von pCR-A6/BZLF1g (150, 300, 450, 600 ng) und konstanten 300 ng der jeweils untersuchten Reporterplasmide pGL-p50, pGL-pA6, pGL-p57 bzw. pGL-p59 unter Verwendung von GenePorterTM2 transfiziert. Als Negativkontrolle diente der Vektor pCR-NS, der mit denselben Reporterplasmiden kotretransfiziert wurde. In Abbildung 26 ist die konzentrationsabhängige Aktivierung der Promotoren durch ORFA6/BZLF1g in 293-Graham-Zellen dargestellt. Die Funktion von ORFA6/BZLF1_h als Transkriptionsaktivator konnte mit

diesem Experiment verdeutlicht werden, da auch hier die Aktivierungsrate der PLHV-1-Promotoren direkt mit der Konzentration von ORFA6/BZLF1_h korrelierte.

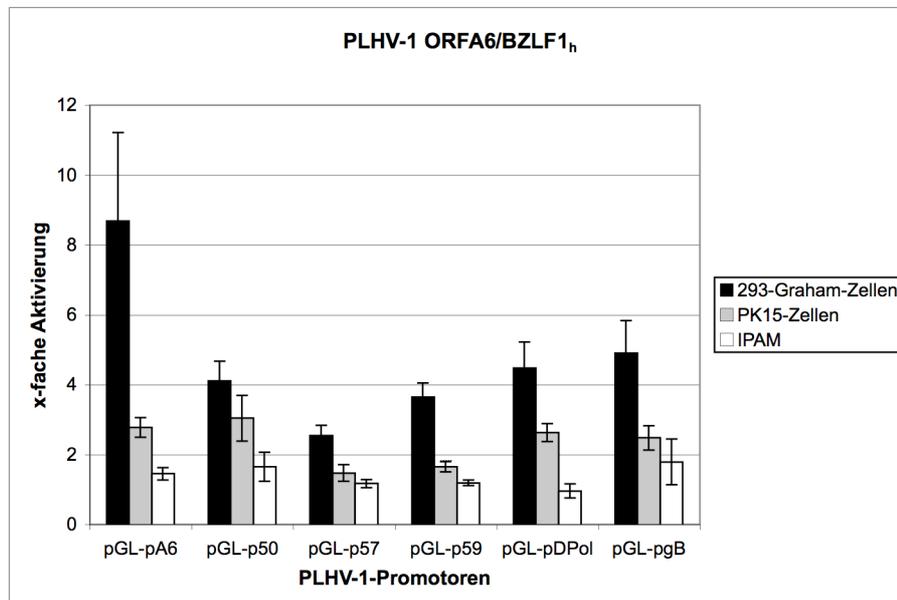


Abb. 25: Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h. 293-Graham-, PK15- und IPAM-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCR-A6/BZLF1g bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der PLHV-1-Reporterplasmide (pGL-p) transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen und die Messung der Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die mit dem Expressionsplasmid erhaltenen normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus fünf unabhängigen Versuchen.

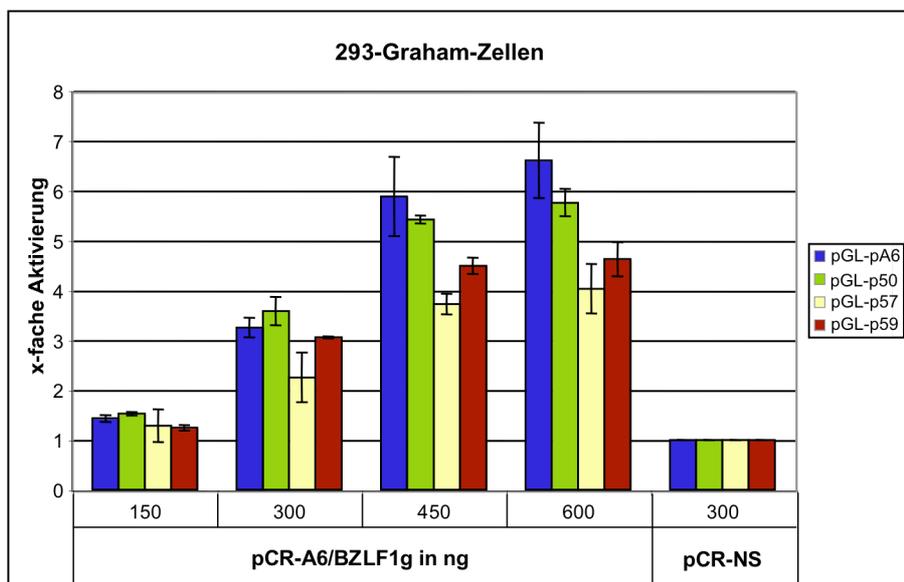


Abb. 26: Konzentrationsabhängige Stimulation von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h. Die Transfektion von 293-Graham-Zellen erfolgte mit dem Expressionsplasmid pCR-A6/BZLF1g bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der PLHV-1-Reporterplasmide pGL-pA6, pGL-p50, pGL-p57 bzw. pGL-p59. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte gewonnen und die Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität gemessen. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

ORFA6/BZLF1_h von PLHV-1 ist ein schwacher Transkriptionsaktivator für die untersuchten PLHV-1-Promotoren. Eine relativ starke Autoaktivierung des Promotors pGL-pA6 durch ORFA6/BZLF1_h konnte in 293-Graham-Zellen gezeigt werden.

5.2.3.2.3 Transkriptionsaktivität von PLHV-1 ORF57

Zur Ermittlung der Transkriptionsaktivität von ORF57 wurden 293-Graham- und PK15-Zellen zum einen mit dem Expressionsplasmid pCR-57 bzw. dem Kontrollplasmid pCR-NS und jeweils einem von vier verschiedenen Reporterplasmiden pGL-pA6, pGL-p50, pGL-p57 bzw. pGL-p59 transfiziert. Da die Stimulation der PLHV-1-Promotoren in Abhängigkeit von der Menge des ORF57-kodierenden Expressionsplasmides (150, 300, 450, 600 ng) untersucht werden sollte, wurde GenePorterTM2 als Transfektionsreagenz verwendet. In PK15-Zellen konnte keine Aktivierung der PLHV-1-Promotoren durch ORF57 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In 293-Graham-Zellen wurde ebenfalls keine signifikante Erhöhung der PLHV-1-Promotoraktivitäten durch ORF57 beobachtet (Abb. 27). Nach Zugabe von 600 ng pCR-57 konnte lediglich eine leichte Aktivierung (1,4-fach) des orf57-Promotors beobachtet werden.

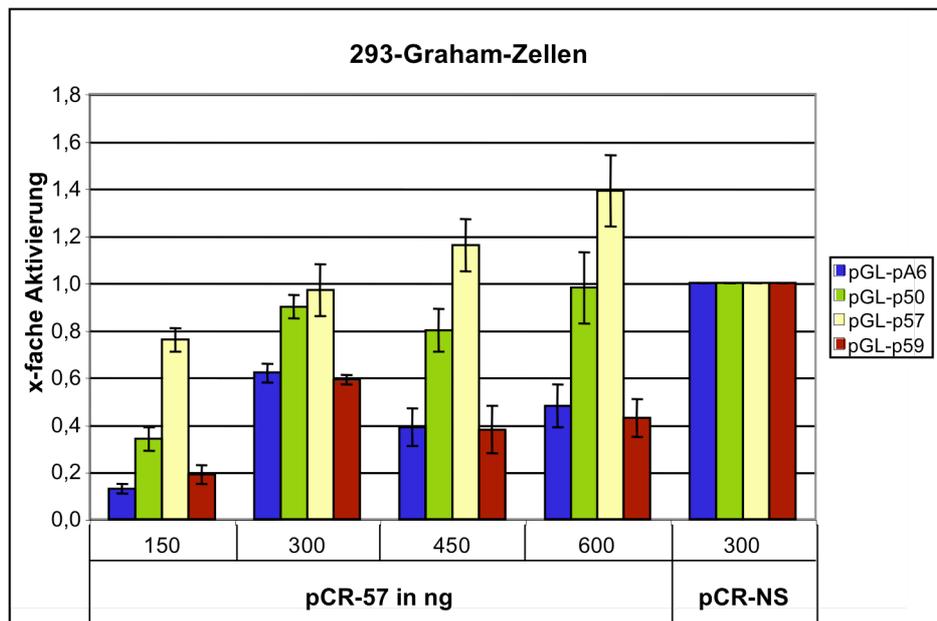


Abb. 27: Konzentrationsabhängige Stimulation von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORF57.

293-Graham-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCR-57 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der PLHV-1-Reporterplasmide pGL-pA6, pGL-p50, pGL-p57 bzw. pGL-p59 transfiziert. Nach 48 h der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen und die Messung der Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen gewonnen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

ORF57 von PLHV-1 ist kein Transkriptionsaktivator der Promotoren orf50, orfA6/BZLF1_h, orf57 bzw. orf59.

5.2.4 Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h

5.2.4.1 Induktion der PLHV-1-Promotoraktivität durch ORF50 und ORFA6/BZLF1_h in 293-Graham-Zellen

Zur Analyse, ob PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h synergistisch bei der Aktivierung von PLHV-1-Promotoren wirken, wurde die Aktivierung von ausgewählten PLHV-1-Promotoren bei Koexpression von beiden Proteinen untersucht. 293-Graham- und PK15-Zellen wurden zum einen mit den Expressionsplasmiden pCR-50 und pCR-A6/BZLF1g bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der Reportergenplasmide pGL-pA6, pGL-p50, pGL-p57 bzw. pGL59 transfiziert. Dabei wurde jeweils eine konstante DNA-Menge von pCR-50 (300 ng) eingesetzt, während pCR-A6/BZLF1g (150, 300, 450, 600 ng) gesteigert wurde. Auch das umgekehrte Experiment mit einer konstanten DNA-Menge von pCR-A6/BZLF1g und gesteigerten DNA-Mengen von pCR-50 wurde durchgeführt.

In den Abbildungen 28 und 29 sind die Ergebnisse der Transaktivierung der PLHV-1-Promotoren orfA6/BZLF1_h, orf50, orf57 und orf59 in 293-Graham-Zellen bei Koexpression von ORF50 und ORFA6/BZLF1_h dargestellt. Dabei wird deutlich, dass sich beide Transkriptionsaktivatoren in ihrem Aktivierungspotential beeinflussen und in Abhängigkeit des Promotors synergistisch bzw. antagonistisch wirken. Bei Zugabe von 150-600 ng pCR-A6/BZLF1g und 300 ng pCR-50 wurde die Stimulation des orfA6/BZLF1_h-Promotors konzentrationsabhängig gehemmt (Abb. 28 A). Die Stimulation des Promotors verringerte sich von einer ca. 160-fachen Aktivierungsrate bei Präsenz von ORF50 auf eine ca. 30-fache Aktivierungsrate bei Zugabe von 600 ng pCR-A6/BZLF1g. In Analogie wurde im Luziferaseassay mit 150-600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-A6/BZLF1g ebenfalls eine deutliche Reduktion der Promotoraktivität von orfA6/BZLF1_h bei Koexpression von ORFA6/BZLF1_h + ORF50 im Gegensatz zur singulären Aktivierung durch ORF50 gemessen (Abb. 28 B). Gleichzeitig führte die steigende Menge von pCR-50 zu einer steigenden Promotoraktivität auch bei Koexpression beider Proteine (Abb. 28 B). Im Gegensatz dazu konnte für den orf50-Promotor keine ORFA6/BZLF1_h-vermittelte Reduktion der Promotoraktivität ermittelt werden. Die simultane Expression von ORFA6/BZLF1_h und ORF50 führte nur zu einer leichten Kostimulation des orf50-Promotors gegenüber der Stimulation durch einen der beiden Transkriptionsaktivatoren (Abb. 28 C, D).

Bei Koexpression von ORFA6/BZLF1_h und ORF50 konnte dagegen eine konzentrationsabhängige Reduktion in der Aktivität des orf57- und orf59-Promotors gezeigt werden (Abb. 29 A, C). Die Promotoraktivität des orf57 verringerte sich von ca. 30-fach bei Präsenz von ORF50 auf ca. 15-fach, nach dem die Konzentration von ORFA6/BZLF1_h auf 600 ng pro Ansatz erhöht wurde (Abb. 29 A).

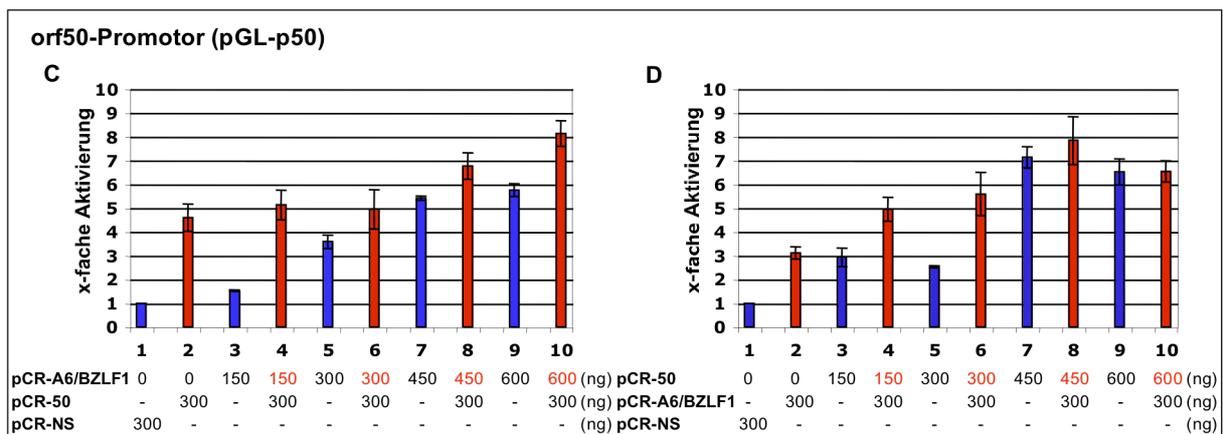
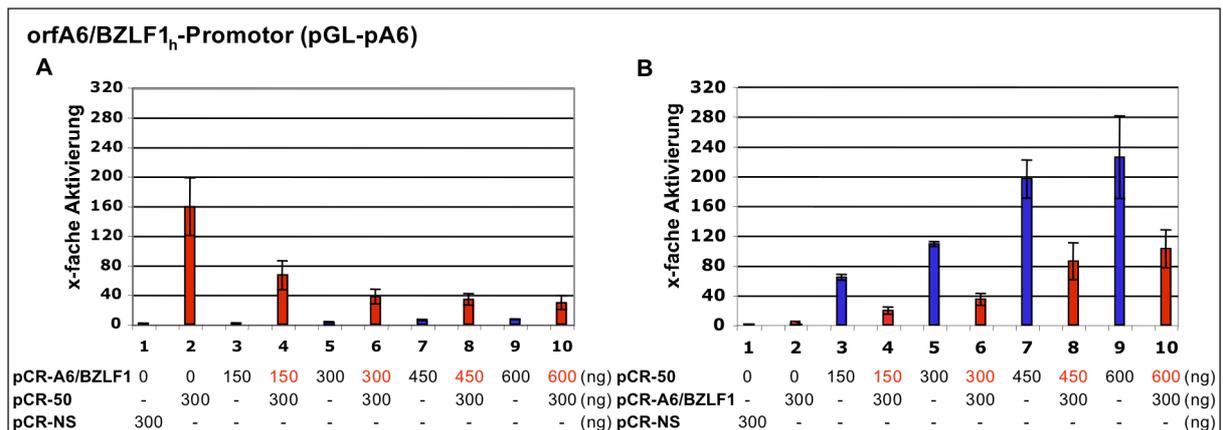


Abb. 28: Transaktivierung des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h und ORF50 in 293-Graham-Zellen. Die Kotretransfektion der Zellen erfolgte mit den Expressionsplasmiden pCR-A6/BZLF1g und pCR-50 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der Reporterexpressionssysteme pGL-pA6 bzw. pGL-p50. **A./C.** Stimulation des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-A6/BZLF1g und 300 ng pCR-50. **B./D.** Stimulation des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-A6/BZLF1g. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte gewonnen und die Luciferase- und β -Galactosidaseaktivität gemessen. Alle Luciferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luciferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Diese Hemmung konnte auch im umgekehrten Experiment bestätigt werden. Während 600 ng pCR-50 zu einer ca. 60-fachen Aktivierung des orf57-Promotors führte, wurde bei zusätzlicher Gabe von 300 ng pCR-A6/BZLF1g der Promotor nur ca. 30-fach induziert (Abb. 29 B). Beim orf59-Promotor reduzierte sich die ORF50-vermittelte 136-fache Aktivierungsrate auf ca. 40-fach, nachdem die Konzentration von ORFA6/BZLF1_h auf 600 ng pro Ansatz erhöht wurde (Abb. 29 C). Im analogen Experiment mit 150-600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-A6/BZLF1g konnte allerdings die starke Reduktion der Promotoraktivität von orf59 nicht gezeigt werden (Abb. 29 D). Hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Stimulation durch ORF50 oder ORF50 + ORFA6/BZLF1_h festgestellt.

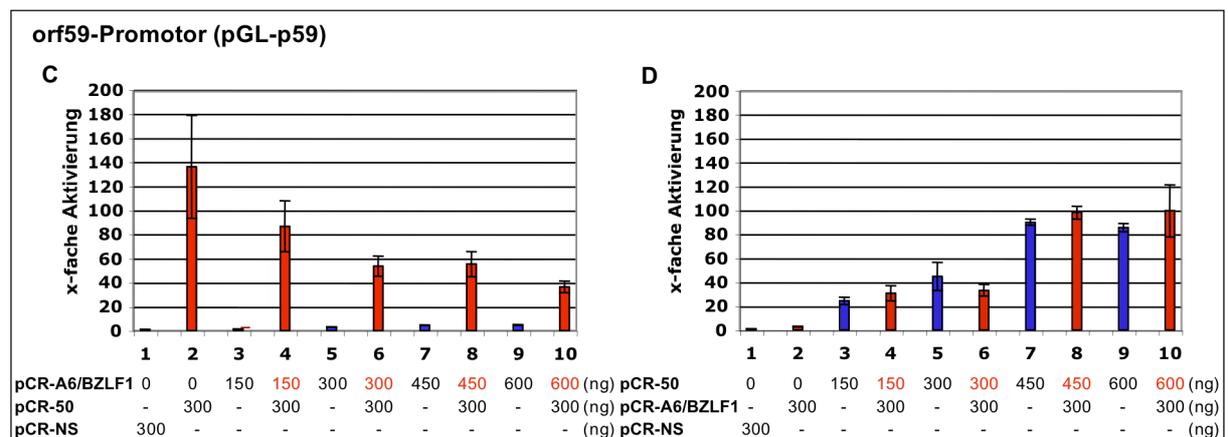
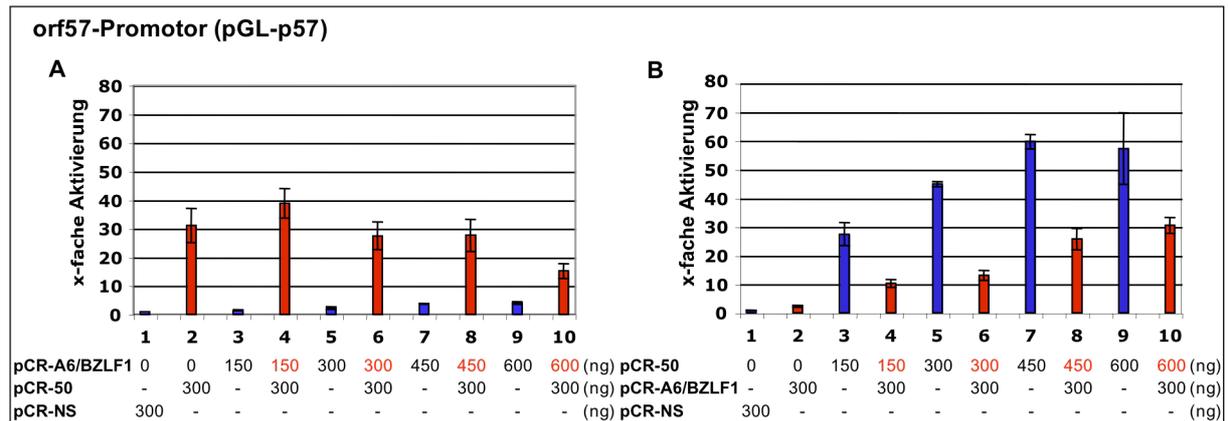


Abb. 29: Transaktivierung des orf57- bzw. orf59-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h und ORF50 in 293-Graham-Zellen. Die Kotransfektion der Zellen erfolgte mit den Expressionsplasmiden pCR-A6/BZLF1g und pCR-50 bzw. dem Kontrollvektor und jeweils einem der Reportergenplasmide pGL-p57 bzw. pGL-p59. **A./C** Stimulation des orf57- bzw. orf59-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-A6/BZLF1g und 300 ng pCR-50. **B./D.** Stimulation des orf57- bzw. orf59-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-A6/BZLF1g. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen und die Messung der Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen gewonnen.

ORFA6/BZLF1_h von PLHV-1 führte zu einer Reduktion der ORF50-vermittelten Aktivierung des orfA6/BZLF1_h-, orf57- und orf59-Promotors in 293-Graham-Zellen. Im Gegensatz dazu wurde der orf50-Promotor bei Koexpression von ORFA6/BZLF1_h und ORF50 synergistisch aktiviert.

5.2.4.2 Induktion der PLHV-1-Promotoraktivität durch ORF50 und ORFA6/BZLF1_h in PK15-Zellen

Die Versuche zur Analyse der Aktivierung ausgewählter PLHV-1-Promotoren bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h wurden ebenfalls in PK15-Zellen durchgeführt. In den Abbildungen 30 und 31 sind die Ergebnisse der Transaktivierung der PLHV-1-Promotoren orfA6/BZLF1_h, orf50, orf57 und orf59 bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h dargestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in 293-Graham-

Zellen konnte in PK15-Zellen keine Hemmung der Promotoraktivität bei simultaner Expression von ORF50 und ORFA6/BZLF1_h festgestellt werden. Dagegen wurde die synergistische Aktivierung der PLHV-1-Promotoren durch ORF50 und ORFA6/BZLF1_h beobachtet (Abb. 30, 31). Bei Zugabe von 150-600 ng pCR-A6/BZLF1g und 300 ng pCR-50 verstärkte sich die Stimulation des orfA6/BZLF1_h-Promotors von ca. 100-fach bei Präsenz von ORF50 auf ca. 140-fach bei Verwendung der Höchstkonzentration von 600 ng pCR-A6/BZLF1g pro Ansatz (Abb. 30 A). Dieser durch die Expression von ORFA6/BZLF1_h verstärkende Effekt wurde auch für den orf50-Promotor gemessen. Die durch ORF50 vermittelte ca. 3-fache Aktivierung des orf50-Promotors wurde durch Zugabe von 600 ng pCR-A6/BZLF1g auf eine ca. 6-fache Aktivierungsrate erhöht (Abb. 30 C).

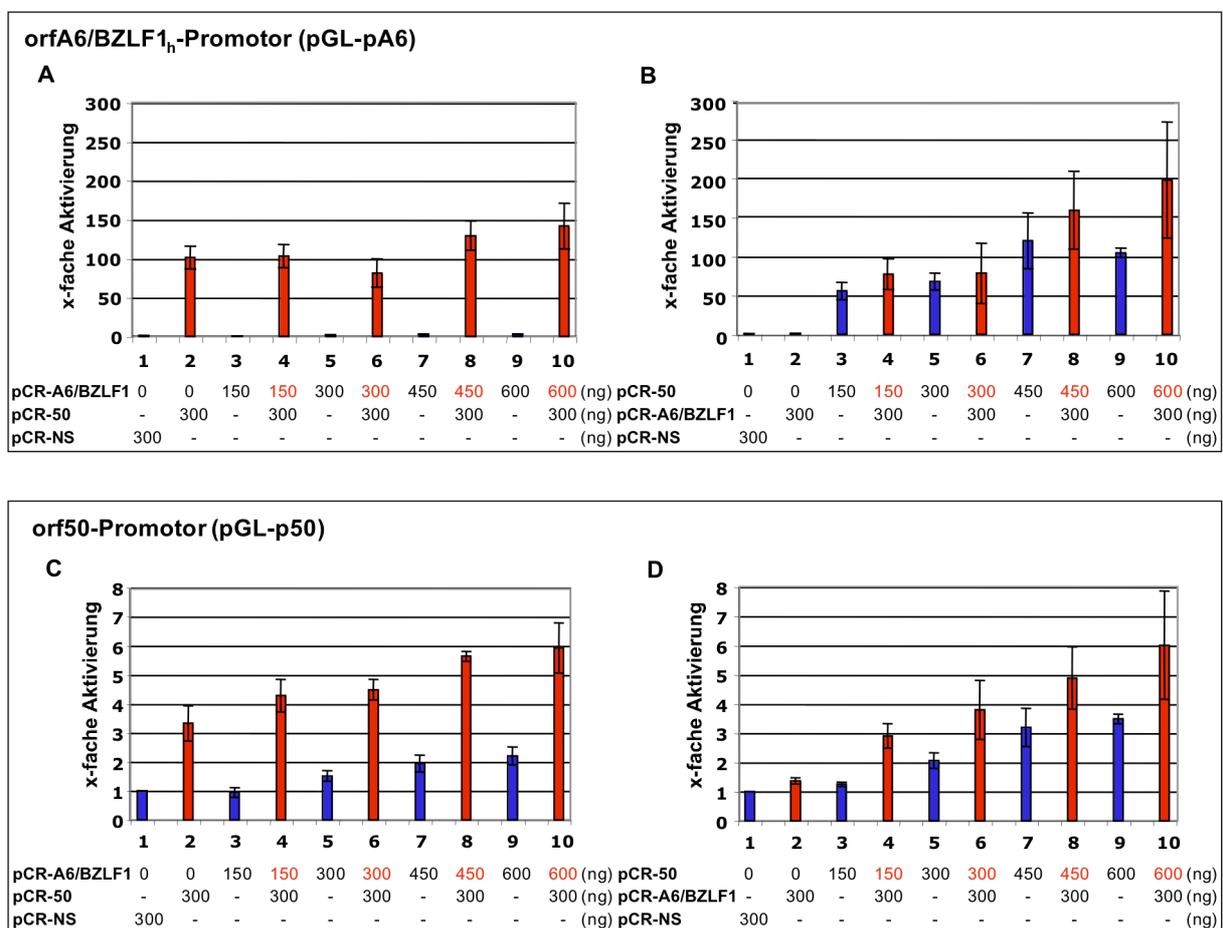


Abb. 30: Transaktivierung des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h und ORF50 in PK15-Zellen. Die Kotransfektion der Zellen erfolgte mit den Expressionsplasmiden pCR-A6/BZLF1g und pCR-50 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und den Reportergenplasmiden pGL-pA6 bzw. pGL-p50. **A./C.** Stimulation des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-A6/BZLF1g und 300 ng pCR-50. **B./D.** Stimulation des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-A6/BZLF1g. Nach 48 h erfolgte die Lyse der Zellen und die Messung der Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Auch im analogen Experiment mit 300 ng pCR-A6/BZLF1g und 150-600 ng pCR-50 konnte dieser stimulierende Effekt verifiziert werden (Abb. 30 D). In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der Transaktivierung von PLHV-1 orf57 und orf59 bei Koexpression von ORF50 und ORFA6/BZLF1_h dargestellt. Die durch ORF50 vermittelte ca. 6-fache Aktivierung des orf57-Promotors steigerte sich auf eine ca. 16-fache Aktivierungsrate nach Zugabe von 600 ng pCR-A6/BZLF1g (Abb. 31 A). Die Aktivierung des orf59-Promotors verstärkte sich von ca. 55-fach bei Präsenz von ORF50 auf den Höchstwert von ca. 150-fach nach Zugabe von 450 ng pCR-A6/BZLF1g (Abb. 31 C). Bereits nach Zugabe von 150 ng pCR-A6/BZLF1g wurde eine ca. 125-fache Aktivierungsrate des orf59-Promotors erreicht, die sich bei kontinuierlicher Zugabe von pCR-A6/BZLF1g kaum merklich steigerte. Dagegen wurde im analogen Experiment mit 300 ng pCR-A6/BZLF1g und 150-600 ng pCR-50 ein stetiger Anstieg (bis ca. 250-fach) in der Promotoraktivität von orf59 beobachtet (Abb. 31 D).

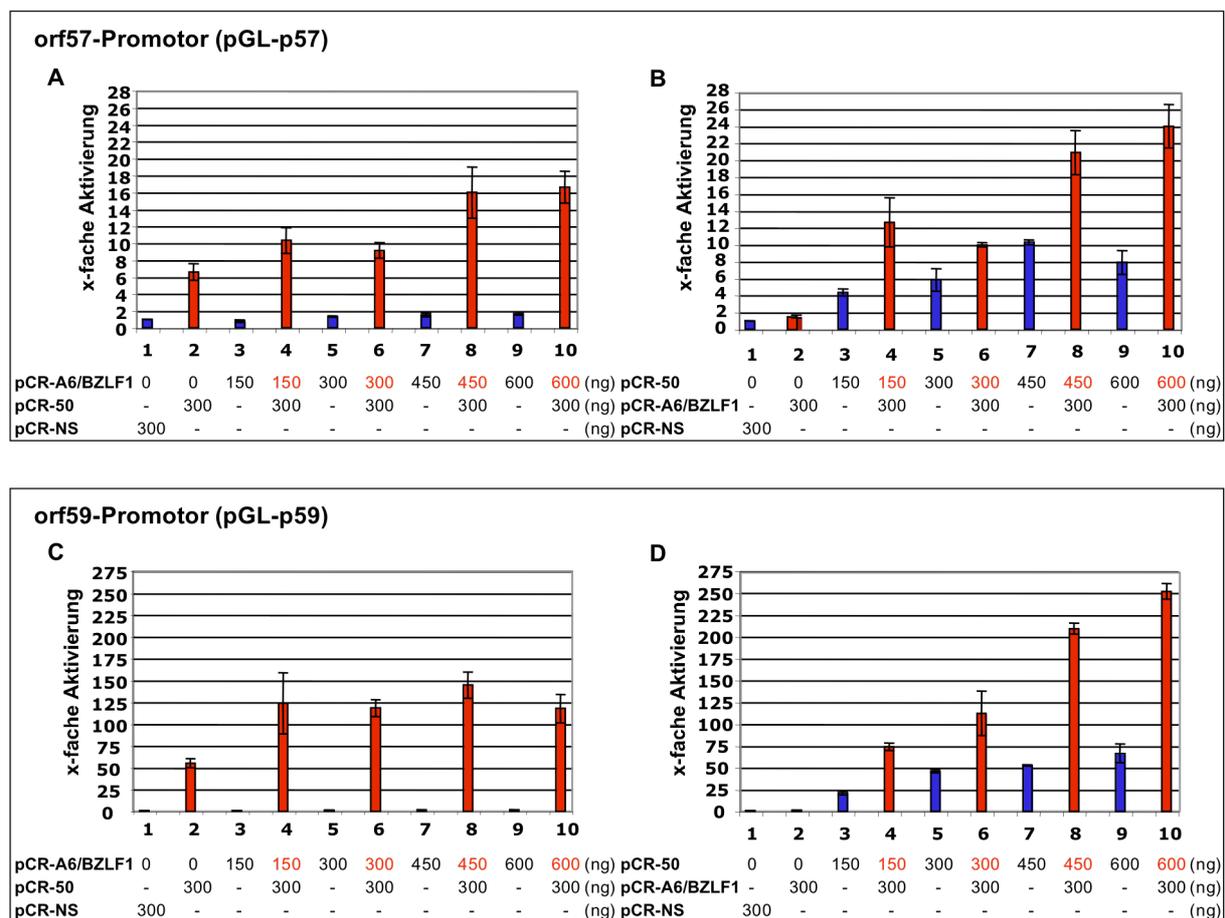


Abb. 31: Transaktivierung des orf57- bzw. orf59-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h und ORF50 in PK15-Zellen. Die Kotransfektion der Zellen erfolgte mit den Expressionsplasmiden pCR-A6/BZLF1g und pCR-50 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der Reporterplasmide pGL-p57 bzw. pGL-p59. **A./C.** Stimulation des orf57- bzw. orf59-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-A6/BZLF1g und 300 ng pCR-50. **B./D.** Stimulation des orf57- bzw. orf59-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-A6/BZLF1g. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferase- und β -Galactosidaseaktivität gemessen. Alle Luciferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luciferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Daten resultieren aus drei unabhängigen Versuchen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Im Gegensatz zu 293-Graham-Zellen erfolgte in PK15-Zellen die Aktivierung von PLHV-1-Promotoren synergistisch durch ORF50 und ORFA6/BZLF1_h. Dies deutet darauf hin, dass ORFA6/BZLF1_h unterschiedlich in beiden Zelllinien wirkt und möglicherweise zelluläre Proteine beteiligt sind.

5.2.5 Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORF57

5.2.5.1 Induktion der PLHV-1-Promotoraktivität durch ORF50 und ORF57 in 293-Graham-Zellen

In bisher beschriebenen Versuchen konnten keine transaktivierenden Eigenschaften von PLHV-1 ORF57 gezeigt werden. Zur Untersuchung des Einflusses von PLHV-1 ORF57 auf die ORF50-vermittelte Induktion von PLHV-1-Promotoren wurde die Aktivierung von ausgewählten PLHV-1-Promotoren bei Koexpression von ORF50 und ORF57 untersucht. 293-Graham-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pCR-50 und pCR-57 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der Reportergenplasmide pGL-pA6, pGL-p50, pGL-p57 bzw. pGL-59 transfiziert. Dabei wurde jeweils die DNA-Menge von pCR-50 (150 ng) konstant gehalten, während die DNA-Menge von pCR-57 (150-600 ng) variiert wurde. Auch das analoge Experiment mit einer konstanten DNA-Menge von pCR-57 und verschiedenen DNA-Mengen von pCR-50 wurde durchgeführt. In den Abbildungen 32 und 33 sind die Ergebnisse der Transaktivierung der PLHV-1-Promotoren orfA6/BZLF1_h, orf50, orf57 und orf59 in 293-Graham-Zellen bei Koexpression von ORF50 und ORF57 dargestellt. Die simultane Expression von ORF50 und ORF57 führte zu einer verstärkten Promotoraktivität von orfA6/BZLF1_h, orf57 und orf59. Im Gegensatz dazu wurde der orf50-Promotor bei Koexpression von ORF50 und ORF57 nur schwach induziert (Abb. 32 C). Die Stimulation des orfA6/BZLF1_h-Promotors steigerte sich von einer ca. 110-fachen Aktivierungsrate bei Zugabe von 300 ng pCR-50 auf eine ca. 840-fache Aktivierungsrate, nach dem 150 ng pCR-57 zugegeben wurden (Abb. 32 A). Auch die Stimulation des orf57- und des orf59-Promotors erreichte bereits bei Zugabe von 150 ng pCR-57 und 300 ng pCR-50 den Maximalwert (Abb. 33 A, C). Bei weiterer Zugabe von pCR-57 bis zur Höchstkonzentration von 600 ng pro Ansatz trat jedoch eine Reduktion in der Aktivierung aller PLHV-1-Promotoren auf (Abb. 32/33 A, C). Die Abnahme der Promotoraktivität wurde allerdings nicht im analogen Experiment bei 150-600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-57 beobachtet (Abb. 32/33 B, D). Hier wurde die Aktivierung der PLHV-1-Promotoren orfA6/BZLF1_h, orf50 und orf57 auch bei Gaben von höheren DNA-Mengen von pCR-50 und pCR-57 (300 ng) deutlich verstärkt (Abb. 32/33 B, D).

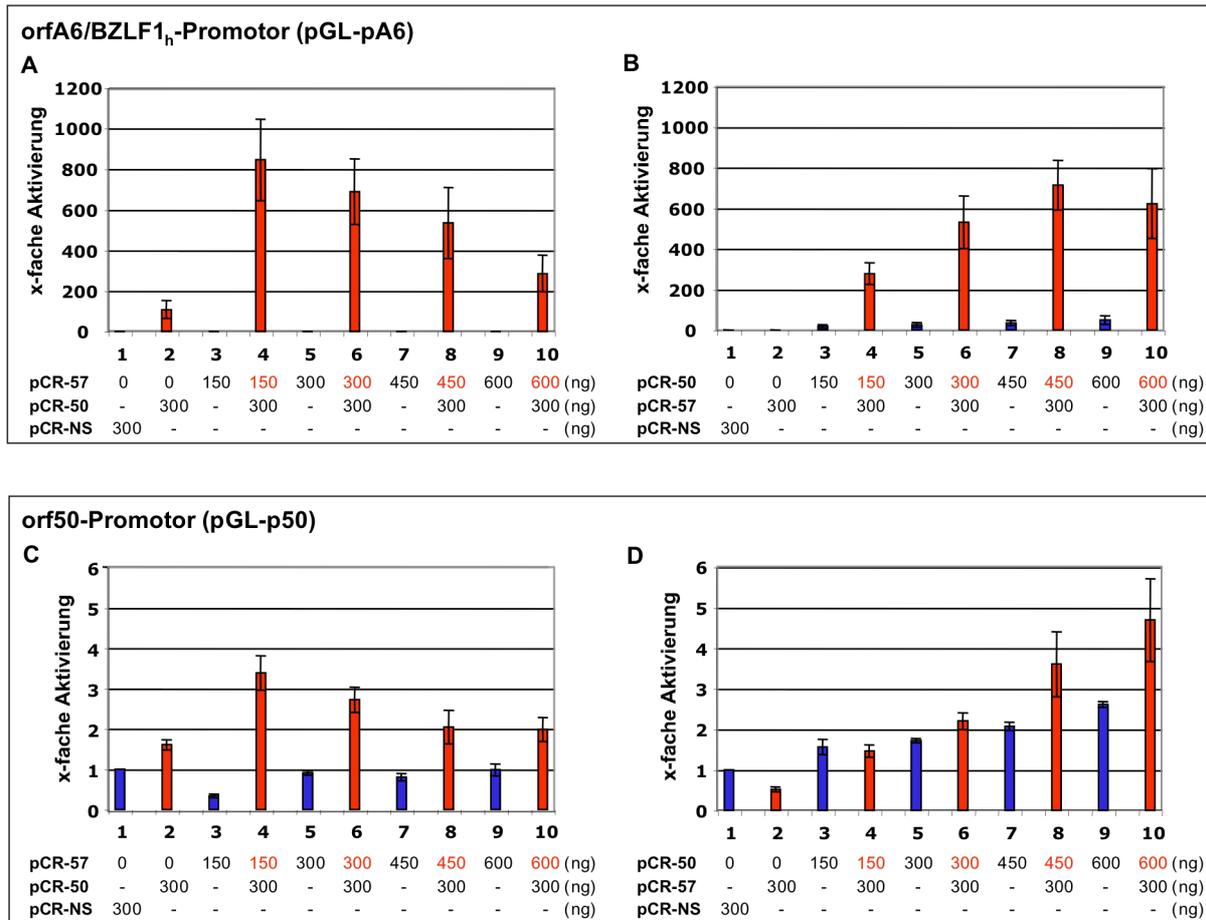


Abb. 32: Transaktivierung des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORF57 in 293-Graham-Zellen. Humane Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pCR-50 und pCR-57 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der Reporterplasmide pGL-pA6 bzw. pGL-p50 kotransfiziert. **A./C.** Stimulation des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-57 und 300 ng pCR-50. **B./D.** Stimulation des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-57. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität gemessen. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen gewonnen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Bei simultaner Expression von ORF50 und ORF57 steigerte sich beispielsweise die Aktivierungsrate des orfA6/BZLF1_h-Promotors von ca. 40-fach bei Gabe von 450 ng pCR-50 auf ca. 700-fach, nach zusätzlicher Zugabe von 300 ng pCR-57 (Abb. 32 B). Die für die Promotoren orfA6/BZLF1_h, orf50 und orf57 beobachtete kontinuierliche Verstärkung der Promotoraktivität konnte allerdings für den orf59-Promotor nur mit einem Experimenttyp belegt werden (Abb. 33 C). Die Aktivierungsrate des orf59-Promotors steigerte sich von 8-fach bei Zugabe von 300 ng pCR-50 auf den Höchstwert von ca. 50-fach nach dem 150 ng pCR-57 zugegeben wurden (Abb. 33 C). Im analogen Versuch bei Zugabe von 150-600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-57 war die Stimulation des orf59-Promotors durch ORF50 immer höher als bei Koexpression beider Proteine (Abb. 33 D).

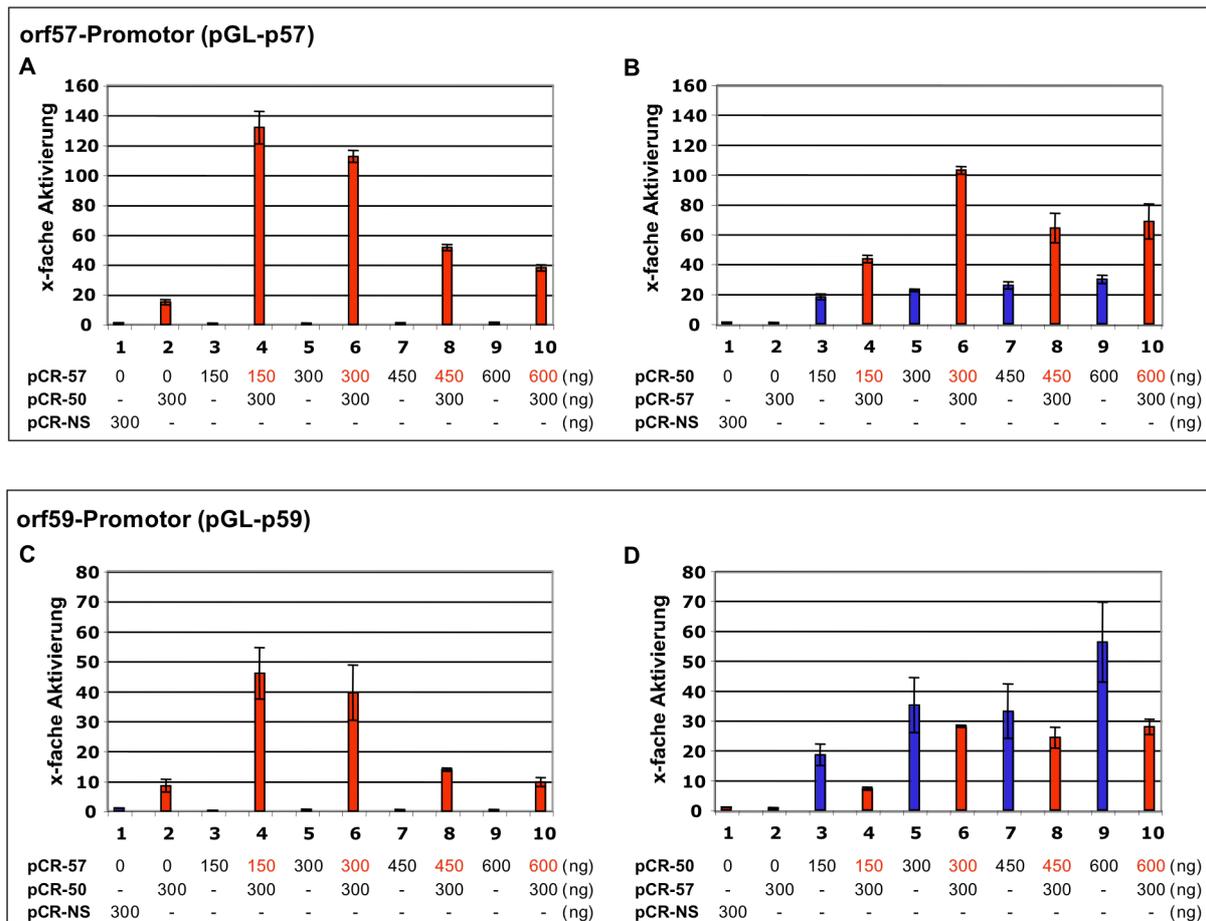


Abb. 33: Transaktivierung des orf57- bzw. orf59-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORF57 in 293-Graham-Zellen. Die Kotretransfektion der Zellen erfolgte mit den Expressionsplasmiden pCR-50 und pCR-57 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der Reporterplasmide pGL-57 bzw. pGL-p59. **A./C.** Stimulation des orf57- bzw. orf59-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-57 und 300 ng pCR-50. **B./D.** Stimulation des orf57- bzw. orf59-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-57. Die Lyse der Zellen mit nachfolgender Messung der Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität erfolgte 48 h nach der Transfektion. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Die simultane Expression von ORF57 und ORF50 führte zu einer synergistischen Aktivierung der untersuchten PLHV-1-Promotoren in 293-Graham-Zellen. Bei höheren Dosen von ORF57 trat ein hemmender Effekt in der Promotoraktivität auf.

5.2.5.2 Induktion der PLHV-1-Promotoraktivität durch ORF50 und ORF57 in PK15-Zellen

Die Versuche zur Analyse des Einflusses von ORF57 auf die ORF50-vermittelte Aktivierung von PLHV-1-Promotoren wurden ebenfalls in PK15-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse der Transaktivierung der PLHV-1-Promotoren bei Koexpression von ORF50 und ORF57 sind in den Abbildungen 34 und 35 dargestellt. Wie in 293-Graham-Zellen bereits beobachtet, wurde

die Aktivierung der vier ausgewählten PLHV-1-Promotoren orfA6/BZLF1_h, orf50, orf57 und orf59 auch in PK15-Zellen bei simultaner Expression von ORF50 und ORF57 synergistisch verstärkt (Abb. 34, 35). Auch hier wurde bereits bei Zugabe von relativ geringen Mengen (150-300 ng) pCR-57 und einer konstanten Menge von pCR-50 (300 ng) die höchste Aktivierung der Promotoren gemessen. Eine weitere Zugabe von pCR-57 führte in der Regel zu keiner weiteren Steigerung der Promotoraktivität. Die Aktivierung des orfA6/BZLF1_h-Promotors verstärkte sich von 12-fach bei alleiniger Präsenz von ORF50 auf ca. 60-fach nach zusätzlicher Gabe von 300 ng pCR-57 (Abb. 34 A). Auch im analogen Experiment war die Promotoraktivität bei Koexpression von ORF50 und ORF57 immer höher als bei singulärer Expression von ORF50 (Abb. 34 B). Wie auch in 293-Graham-Zellen konnte nur eine leichte Verstärkung (2-fach) in der Stimulation des orf50-Promotors gemessen werden, wenn ORF50 und ORF57 simultan exprimiert wurden (Abb. 34 C).

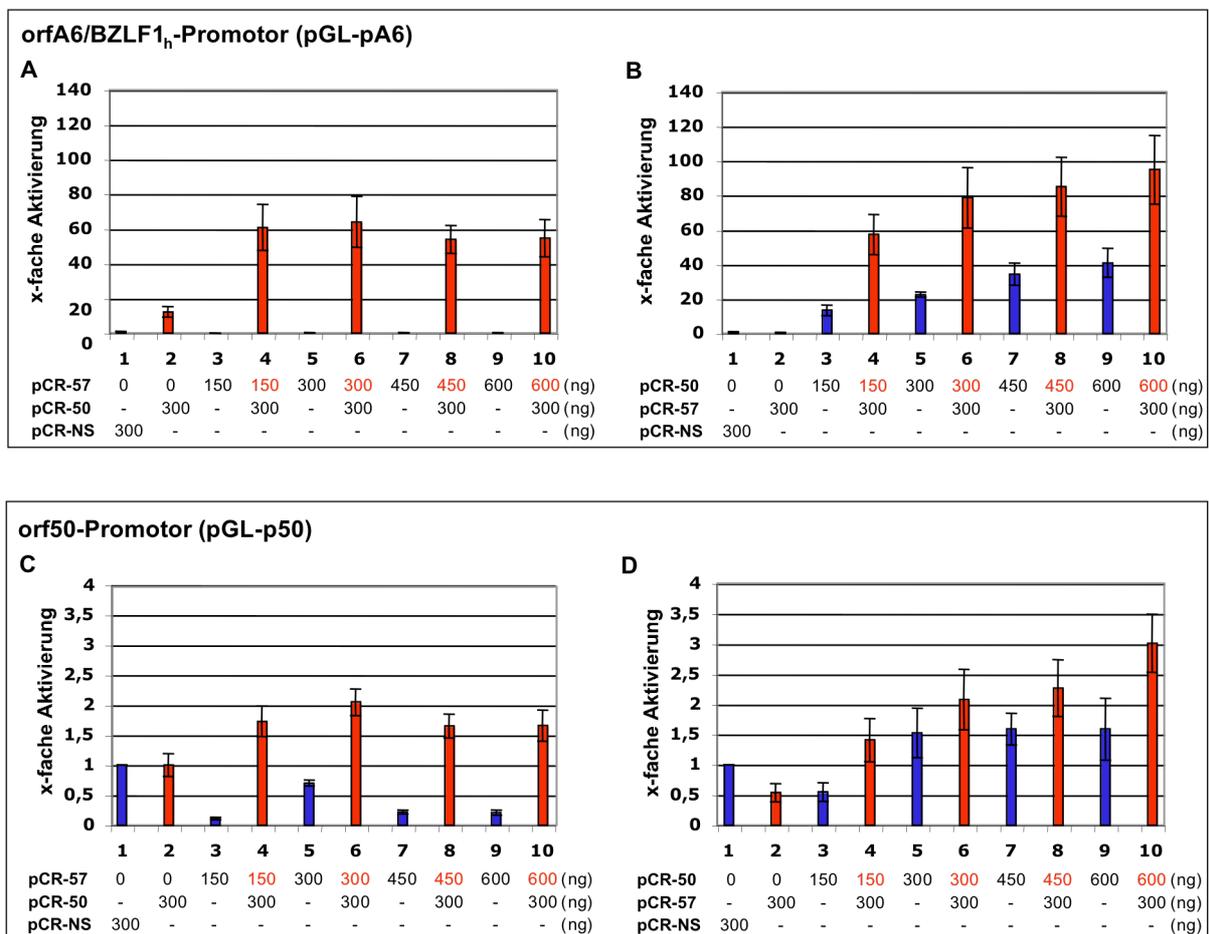


Abb. 34: Transaktivierung des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORF57 in PK15-Zellen. Die Kotretransfektion der Zellen erfolgte mit den Expressionsplasmiden pCR-50 und pCR-57 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der Reportergenplasmide pGL-pA6 bzw. pGL-p50. **A./C.** Stimulation des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-57 und 300 ng pCR-50. **B./D.** Stimulation des orfA6/BZLF1_h- bzw. orf50-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-57. Die Ernte der Zellen mit anschließender Messung der Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität erfolgte 48 h nach der Transfektion. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen gewonnen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Im analogen Versuch steigerte sich die Aktivierungsrate des orf50-Promotors von 1,5-fach (600 ng pCR-50) auf ca. 3-fach, wenn zusätzlich 300 ng pCR-57 transfiziert wurden (Abb. 34 D). Bei Zugabe von mehr als 300 ng pCR-57 reduzierte sich die Promotoraktivität von orf57 (Abb. 35 A). Dieser Rückgang der Promotoraktivität wurde bei den anderen Promotoren nicht beobachtet. Die Promotoraktivität des orf59 erhöhte sich von ca. 40-fach auf ca. 110-fach, nach dem 300 ng pCR-57 und 300 ng pCR-50 transfiziert wurden (Abb. 35 C). Die Ergebnisse konnten auch im analogen Experiment bei 300 ng pCR-57 und gesteigerter DNA-Menge von pCR-50 (150-600 ng) bestätigt werden (Abb. 35 D). Wie bereits in 293-Graham-Zellen beobachtet, korrelierte hier die Aktivierung des Promotors mit steigender Zugabe von pCR-50. Eine Stagnation in der Aktivierbarkeit des Promotors wurde hier nicht beobachtet (Abb. 35 D).

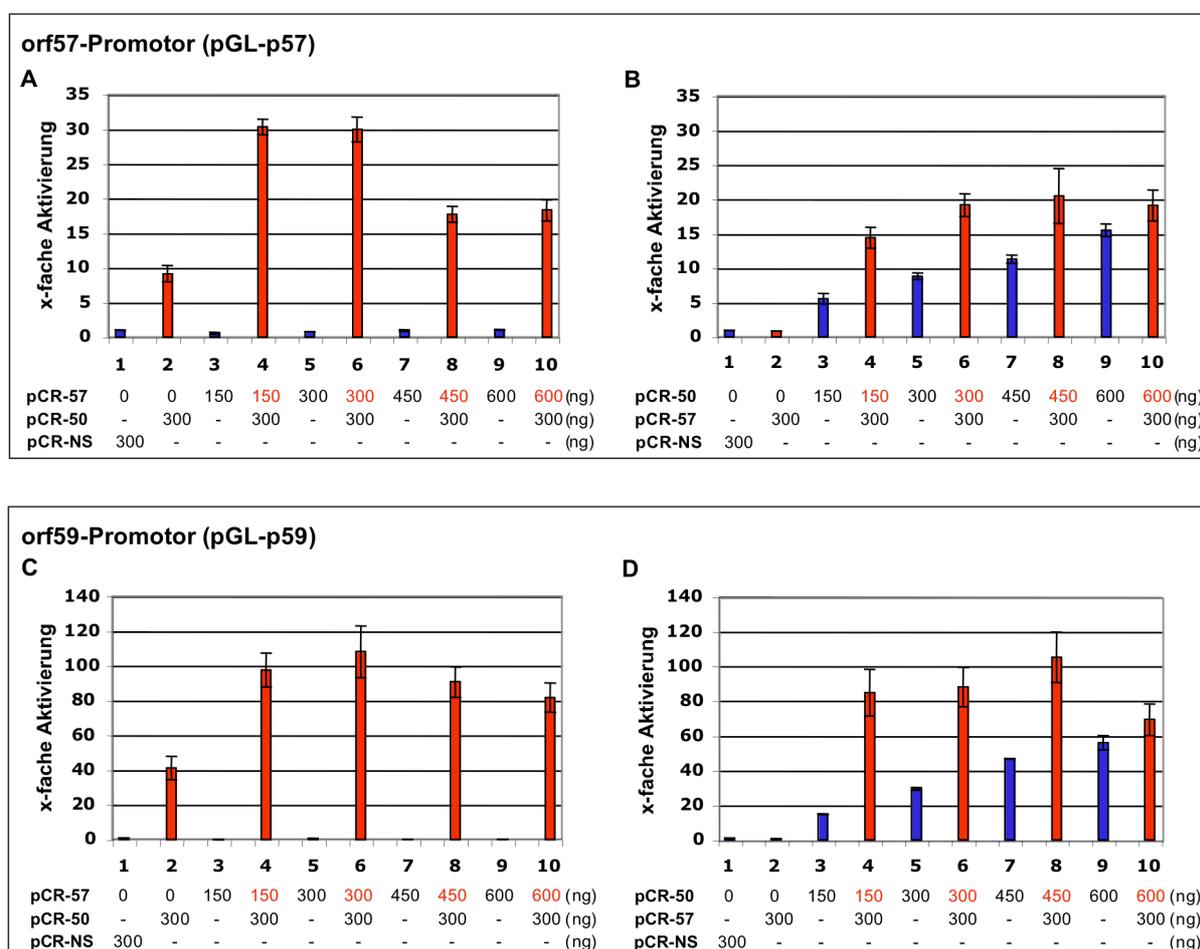


Abb. 35: Transaktivierung des orf57- bzw. orf59-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORF57 in PK15-Zellen. Porzine Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pCR-50 und pCR-57 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der Reportergenplasmide pGL-57 bzw. pGL-p59 transfiziert. **A./C.** Stimulation des orf57- bzw. orf59-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-57 und 300 ng pCR-50. **B./D.** Stimulation des orf57- bzw. orf59-Promotors bei 150, 300, 450 bzw. 600 ng pCR-50 und 300 ng pCR-57. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferase- und β -Galactosidase- Aktivität gemessen. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

ORF57 von PLHV-1 verstärkte auch in PK15-Zellen das Transkriptionspotential von ORF50 in Abhängigkeit des Promotors. Unterschiede zwischen beiden Zelllinien bestehen vor allem bei der Aktivierung des orf59-Promotors.

5.2.6 Interaktionsstudien zwischen den PLHV-1-Proteinen

5.2.6.1 Versuche zur Interaktion zwischen ORF50 und ORFA6/BZLF1_h

Vorangegangene Reporterstudien bei Koexpression von ORF50 und ORFA6/BZLF1_h zeigten, dass ORFA6/BZLF1_h die Transkriptionsaktivität von ORF50 beeinflusst. Während in 293-Graham-Zellen ORFA6/BZLF1_h die ORF50-vermittelte Aktivierung von einigen Promotoren reprimierte, konnte in PK15-Zellen ein synergistischer Effekt beobachtet werden. Diese potentielle Interaktion zwischen PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h sollte nun mit Hilfe der Koimmunpräzipitation untersucht werden. 293-Graham-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pCRA6/BZLF1g-HA_n und pCMV50g-myc kotransfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Kontrollplasmid pCMV-HA und pCMV50g-myc kotransfiziert wurden. Die Präzipitation von N-terminal HA-markiertem ORFA6/BZLF1_h-Protein erfolgte durch Zugabe des präzipitierenden anti-HA Antikörpers aus Kaninchen und Protein G-Sepharose. Durch Zentrifugation der G-Sepharose wurden die Antikörper-Protein-Protein-Komplexe anschließend aufgereinigt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Detektion der PLHV-1-Proteine erfolgte mit einem anti-HA Antikörper (ORFA6/BZLF1_h) bzw. anti-c-Myc Antikörper (ORF50) aus Maus, der wiederum von einem anti-Maus IgG Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt wurde (Abb. 36 A, B). ORFA6/BZLF1_h konnte im Rohlysate nur sehr schwach detektiert werden (Abb. 36 A; Spur 1). Im Kontrollansatz wurde wie erwartet kein ORFA6/BZLF1_h-Protein nachgewiesen (Abb. 36 A; Spur 2). Durch Präzipitation mit dem anti-HA Antikörper aus Kaninchen wurde ORFA6/BZLF1_h aufkonzentriert und konnte als Proteinbande bei ca. 24 kDa detektiert werden (Abb. 36 A, Spur 3). Im Kontrollansatz war ORFA6/BZLF1_h dagegen nicht nachweisbar (Abb. 36 A; Spur 4). In Spur 3 und 4 trat außerdem eine unspezifische Proteinbande bei ca. 28 kDa auf, bei der es sich möglicherweise um Ovalbumin handelt, das im Waschpuffer verwendet wurde. Diese Proteinbande trat nicht auf, wenn ein Waschpuffer ohne Ovalbumin verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 36 B sind die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation nach Detektion mit dem anti-c-Myc Antikörper dargestellt. In den ersten beiden Spuren wurden die Rohlysate aufgetragen, in denen c-Myc-markiertes ORF50-Protein als sehr deutliche Proteinbande bei ca. 72 kDa detektiert wurde. Bei ca. 38 kDa trat eine zweite Proteinbande auf, die bereits in vorangegangenen Versuchen detektiert wurde (Abschnitt 5.2.1). Im Präzipitat (Abb. 36 B, Spur 3) konnte ORF50 als

schwache Proteinbande nachgewiesen werden, die jedoch nur geringfügig stärker war als die unspezifische ORF50-Bande der Kontrolle (Abb. 36 B, Spur 4). Spur 3 und Spur 4 zeigten außerdem die bereits erwähnte unspezifische Proteinbande bei ca. 28 kDa.

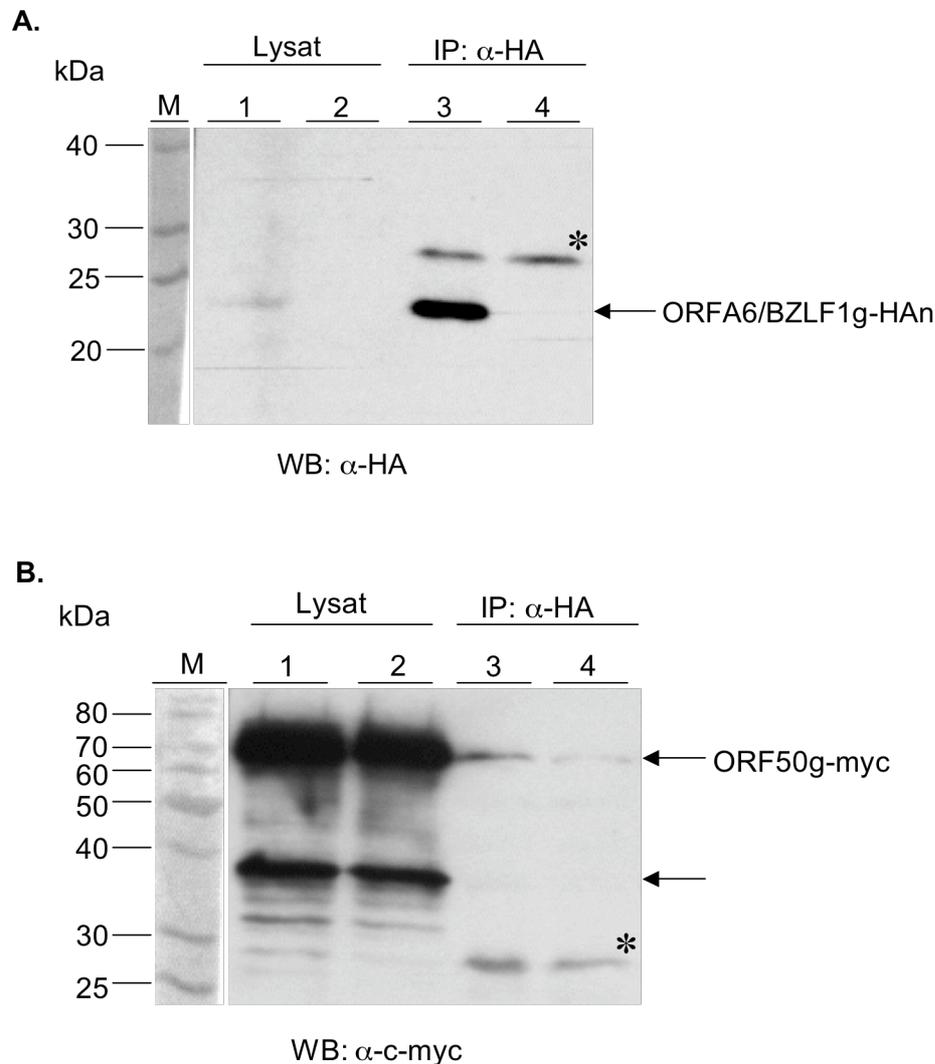


Abb. 36: ORF50 bindet ORFA6/BZLF1_h in Koimmunpräzipitaten. 293-Graham-Zellen wurden entweder mit den Expressionsplasmiden pCRA6/BZLF1g-HA_n und pCMV50g-myc (A/B Spur 1) oder dem Kontrollplasmid pCMV-HA und pCMV-50myc (A/B Spur 2) kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und N-terminal HA-markiertes ORFA6/BZLF1_h-Protein mit einem anti-HA Antikörper aus Kaninchen präzipitiert (A; IP: Spur 3). Nach Auftrennen und Blotten der Proteine wurde HA-markiertes ORFA6/BZLF1_h-Protein (A) mit einem anti HA-Antikörper und c-Myc-markiertes ORF50-Protein (B) mit einem anti c-Myc-Antikörper aus Maus detektiert. Im ORFA6/BZLF1_h-Präzipitat konnte ORF50 detektiert werden (B; IP: Spur 3). Im Waschpuffer enthaltenes Ovalbumin (*) wurde wahrscheinlich unspezifisch gebunden. In den Rohlysaten konnte eine sehr starke Expression von ORF50 (B; Lysat: Spur 1, 2) gezeigt werden. Dagegen wurde ORFA6/BZLF1_h nur sehr schwach exprimiert (A; Lysat: Spur 1).

Eine Interaktion zwischen ORF50 und ORFA6/BZLF1_h von PLHV-1 konnte nicht nachgewiesen werden.

5.2.6.2 Versuche zur Interaktion zwischen ORF50 und ORF57

Zum Nachweis einer potentiellen Komplexbildung von ORF50 mit ORF57 wurden 293-Graham-Zellen mit den Expressionsplasmiden pCMV50g-myc und pCR57-HAn kotransfiziert. Zellen, die mit dem Kontrollplasmid pCMV-HA und pCMV50g-myc transfiziert wurden, dienten als Kontrolle. Durch Zugabe des anti-HA Antikörpers aus Kaninchen und Protein G-Sepharose wurde N-terminal HA-markiertes ORF57-Protein aus dem Rohlysate präzipitiert. Anschließend wurden die Proteinextrakte auf ein denaturierendes SDS-Gel aufgetragen und geblottet. Der Nachweis der PLHV-1-Proteine erfolgte mit einem anti-HA Antikörper (ORF57) oder mit einem anti-c-Myc Antikörper (ORF50) aus Maus, der wiederum von einem anti-Maus IgG Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt wurde. In Abbildung 37 A sind die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation nach Detektion mit dem anti-HA Antikörper dargestellt.

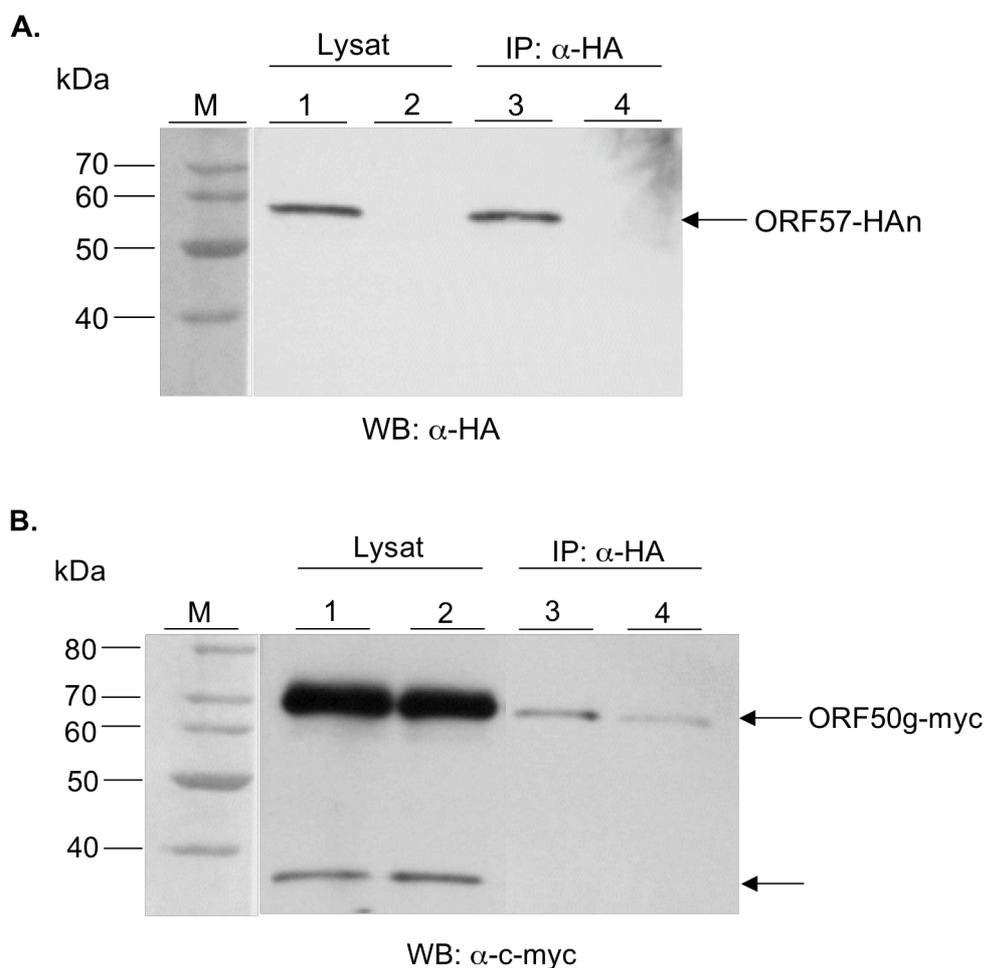


Abb. 37: ORF50 bindet N-terminal markiertes ORF57 in Koimmunpräzipitaten. 293-Graham-Zellen wurden entweder mit den Expressionsplasmiden pCR57-HAn und pCMV50g-myc (A/B, Spur 1) oder dem Kontrollplasmid pCMV-HA und pCMV50g-myc (A/B, Spur 2) kotransfiziert. Nach 48 h erfolgte die Lyse der Zellen und die Präzipitation von N-terminal HA-markierten ORF57-Protein mit einem anti-HA Antikörper aus Kaninchen (A; IP: Spur 3). Nach Auftrennen und Blotten der Proteine wurde HA-markiertes ORF57-Protein (A) mit einem anti-HA Antikörper und c-Myc-markiertes ORF50-Protein (B) mit einem anti c-Myc Antikörper aus Maus detektiert. Im ORF57-Präzipitat konnte ORF50-Protein detektiert werden (B; IP: Spur 3). In den Rohlysaten konnte die Expression von ORF57 (A; Lysat: Spur 1) und ORF50 (B; Lysat: Spur 1, 2) gezeigt werden.

N-terminal HA-markiertes ORF57-Protein konnte mit einer Größe von ca. 57 kDa sowohl im Rohlysate (Abb. 37 A, Spur 1) als auch im Präzipitat (Abb. 37 A, Spur 3) nachgewiesen werden. In den Kontrollzellen, die mit dem Kontrollvektor pCMV-HA und pCMV50g-myc transfiziert waren, konnte ORF57 weder im Rohlysate noch im Präzipitat detektiert werden (Abb. 37 A, Spur, 2, 4). Zum Nachweis von c-Myc-markiertem ORF50-Protein wurden dieselben Proteinextrakte erneut aufgetrennt, geblottet und mit dem anti-c-Myc Antikörper inkubiert (Abb. 37 B). ORF50 konnte als sehr deutliche Proteinbande bei ca. 72 kDa in beiden Rohlysaten (Abb. 37 B, Spur 1, 2) nachgewiesen werden. Im Präzipitat wurde ORF50 ebenfalls nachgewiesen (Abb. 37 B, Spur 3). Die Intensität dieser Proteinbande war jedoch nur geringfügig stärker als die der unspezifischen ORF50-Proteinbande im Kontrollansatz (Abb. 37 B, Spur 4). Daher konnte die Interaktion zwischen ORF50 und ORF57 nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Um auszuschließen, dass die N-terminale Markierung von ORF57 möglicherweise die Interaktion zwischen ORF57 und ORF50 beeinträchtigt, wurde die Koimmunpräzipitation unter Verwendung von C-terminal HA-markiertem ORF57 wiederholt. Dazu wurden 293-Graham-Zellen mit pCMV50g-myc und pCR57-HAc kotransfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit pCMV-HA und pCMV50g-myc transfiziert wurden. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Präzipitation von C-terminal HA-markiertem ORF57-Protein mit dem anti-HA Antikörper aus Kaninchen und Protein G-Sepharose. Um eine mögliche unspezifische Bindung der Proteine an den präzipitierenden Antikörper auszuschließen, wurde als weitere Negativkontrolle IgG aus Kaninchen als präzipitierender Antikörper eingesetzt. Der Nachweis der PLHV-1-Proteine erfolgte mit dem anti-HA Antikörper (ORF57) oder anti-c-Myc Antikörper (ORF50) aus Maus, der von einem anti-Maus IgG Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert wurde. In Abbildung 38 A sind die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation nach Inkubation mit dem anti-HA Antikörper dargestellt. C-terminal HA-markiertes ORF57-Protein konnte im Rohlysate (Abb. 38 A, Spur 1) und als sehr deutliche Proteinbande im Präzipitat (Abb. 38 A, Spur 3) nachgewiesen werden. Im Kontrollansatz wurde sowohl im Rohlysate (Abb. 38 A, Spur 2) als auch im Präzipitat (Abb. 38 A, Spur 4) kein ORF57-Protein nachgewiesen. Bei Verwendung von IgG aus Kaninchen als präzipitierender Antikörper wurde ORF57 als sehr schwache Proteinbande detektiert (Abb. 38 A, Spur 5). Mit Hilfe des anti-c-Myc Antikörpers wurde c-Myc markiertes ORF50-Protein in beiden Rohlysaten (Abb. 38 B, Spur 1, 2) nachgewiesen. Eine schwache ORF50-Bande konnte außerdem im Präzipitat detektiert werden. Diese zeigte jedoch die gleiche Intensität wie die ORF50-Proteinbande im Kontrollansatz (Abb. 38 B; Spur 3, 4). Bei Einsatz von IgG als präzipitierender Antikörper wurde in beiden Spuren sehr schwach ORF50-Protein detektiert (Abb. 38 B, Spur 5, 6).

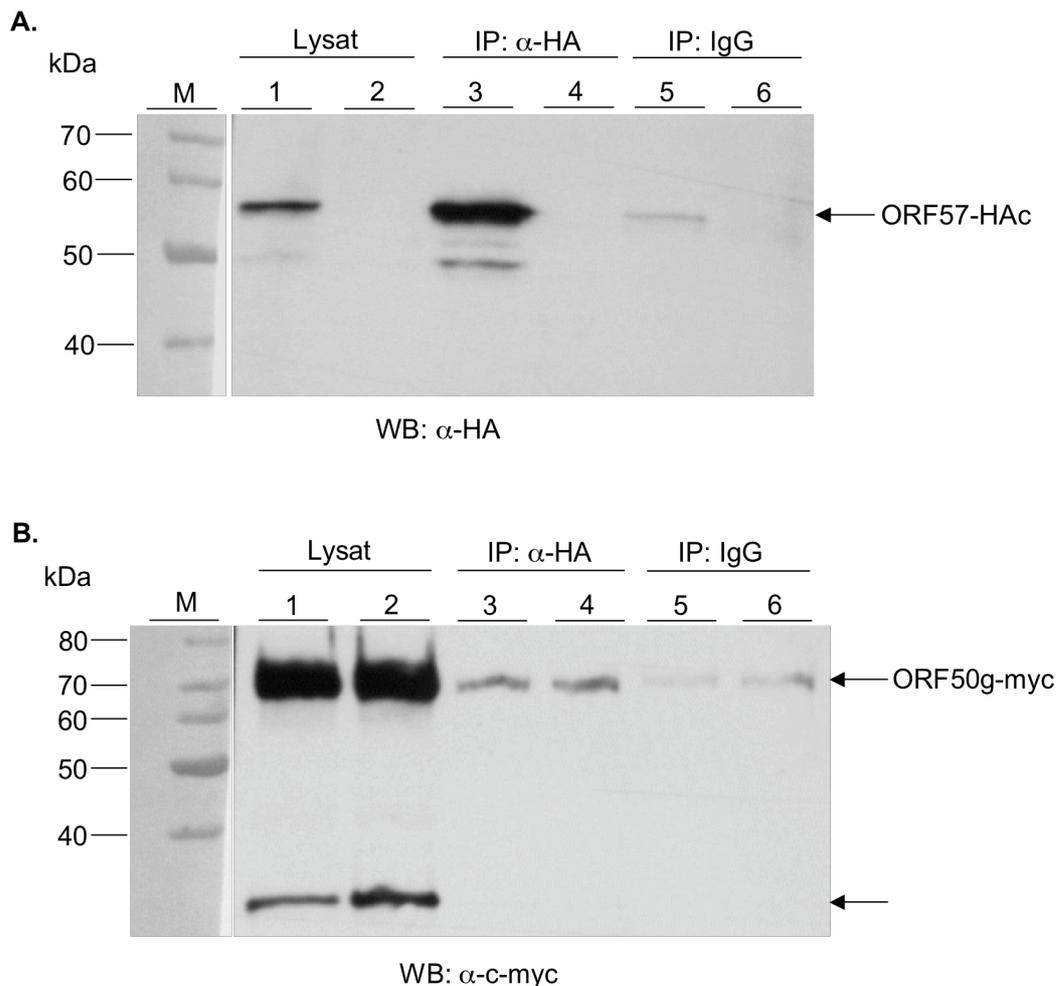


Abb. 38: ORF50 bindet nicht C-terminal markiertes ORF57 in Koimmunpräzipitaten. 293-Graham-Zellen wurden entweder mit den Expressionsplasmiden pCR57-HAc und pCMV50g-myc (A/B, Spuren 1, 3, 5) oder dem Kontrollplasmid pCMV-HA und pCMV50g-myc (A/B Spuren 2, 4, 6) kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellextrakte gewonnen und C-terminal HA-markiertes ORF57-Protein mit einem anti-HA Antikörper aus Kaninchen präzipitiert (A; IP: Spur 3). Als Negativkontrolle wurde IgG aus Kaninchen als präzipitierender Antikörper verwendet (A; IP: IgG, Spur 5). Nach Auftrennung und Blotten der Proteine wurde HA-markiertes ORF57-Protein (A) mit einem anti-HA Antikörper und c-Myc-markiertes ORF50-Protein (B) mit einem anti-c-Myc Antikörper aus Maus detektiert. Im ORF57-Präzipitat konnte ORF50-Protein detektiert werden (B; IP: Spur 3). Im Kontrollansatz wurde eine ORF57-Proteinbande ähnlicher Intensität nachgewiesen (B; IP: Spur 4). In den Rohlysaten konnte die Expression von ORF57 (A; Lysat: Spur 1) und ORF50 (B; Lysat: Spuren 1, 2) gezeigt werden.

Da auch in den Ansätzen mit normalem Kaninchenserum Proteinbanden im Westernblot auftraten, konnte eine Interaktion zwischen ORF50 und ORF57 von PLHV-1 nicht eindeutig nachgewiesen werden.

5.2.7 Untersuchungen zur molekularen Wechselwirkung zwischen humanen und porzinen γ -Herpesviren

Um eine mögliche Interaktion zwischen EBV und PLHV-1 auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde die Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren durch EBV BZLF1 und BRLF1 untersucht. Umgekehrt wurde die Aktivierung ausgewählter EBV-Promotoren durch

PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h getestet. Die Größe der klonierten EBV-Promotorbereiche wurde basierend auf publizierten Daten ausgewählt und enthielt die zu dem Zeitpunkt bekannten Sequenzbindeelemente für Transkriptionsfaktoren der Promotoren der EBV-Gene orfBZLF1, orfBRLF1, orfBMLF1 und orfBMRF1 (siehe Abschnitt 5.1.2.2).

5.2.7.1 Aktivierung von EBV-Promotoren durch EBV BRLF1 und BZLF1

Die Aktivierbarkeit der klonierten Promotorbereiche wurde zunächst durch EBV BRLF1 und BZLF1 mittels Luziferase-Reporterassay in zwei verschiedenen Zelllinien überprüft. Die Koftransfektion der Zellen erfolgte mit den Expressionskonstrukten pCMV-BZLF1, pCMV-BRLF1 bzw. dem Kontrollplasmid pCR-NS und jeweils einem der Reporterplasmide pGL-pBZLF1, pGL-pBRLF1, pGL-pBMRF1 bzw. pGL-pBMLF1.

EBV BRLF1 führte zu einer starken Aktivierung von EBV-Promotoren in 293-Graham-Zellen (Abb. 39). Besonders stark wurde die Aktivität der Promotoren orfBMLF1 (197-fach) und orfBMRF1 (155-fach) induziert. Dagegen war die Stimulation der EBV-Promotoren orfBZLF1 (13-fach) und orfBRLF1 (22-fach) durch EBV BRLF1 deutlich niedriger. In PK15-Zellen konnten ähnliche Tendenzen im Aktivierungsmuster der Promotoren gemessen werden, doch mit geringeren Aktivierungsraten (2-14-fach).

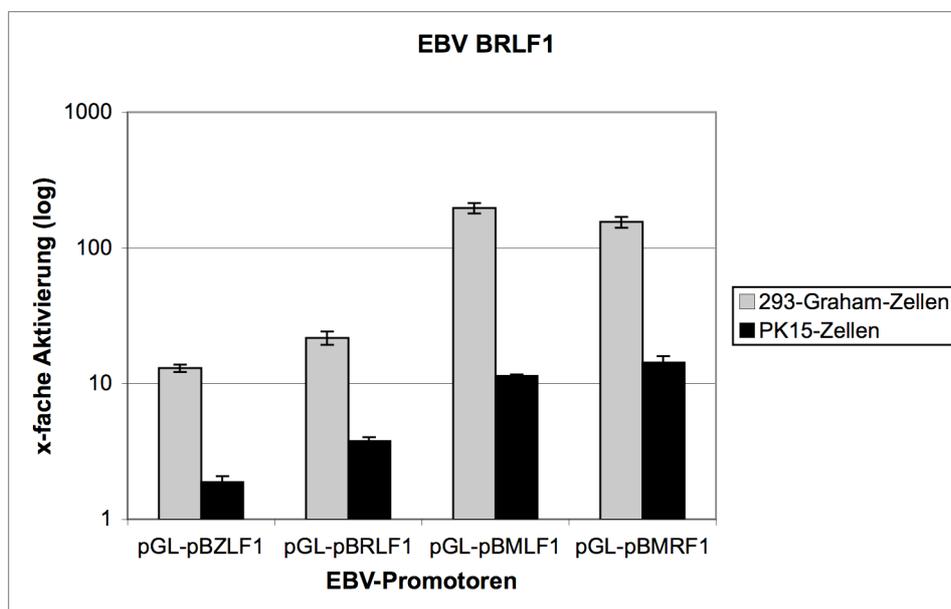


Abb. 39: Aktivierung von EBV-Promotoren durch EBV BRLF1. 293-Graham- und PK15-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCMV-BRLF1 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der EBV-Reporterplasmide (pGL-p) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte gewonnen und die Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität gemessen. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die mit dem Expressionsplasmid erhaltenen normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Im Gegensatz zu EBV BRLF1 führte EBV BZLF1 mit Ausnahme des orfBMRF1-Promotors (295-fach) zu einer geringeren Aktivierung der EBV-Promotoren (Abb. 40). Diese lag in 293-Graham-Zellen zwischen 2,5- und 11-fach, wobei der Promotor von orfBMLF1 am geringsten stimuliert wurde. In PK15-Zellen führte EBV BZLF1 zu einer deutlich geringeren Aktivierung der EBV-Promotoren (3-81-fach). Dabei wurden die Promotoren der Gene orfBZLF1 und orfBMLF1 nicht durch BZLF1 induziert.

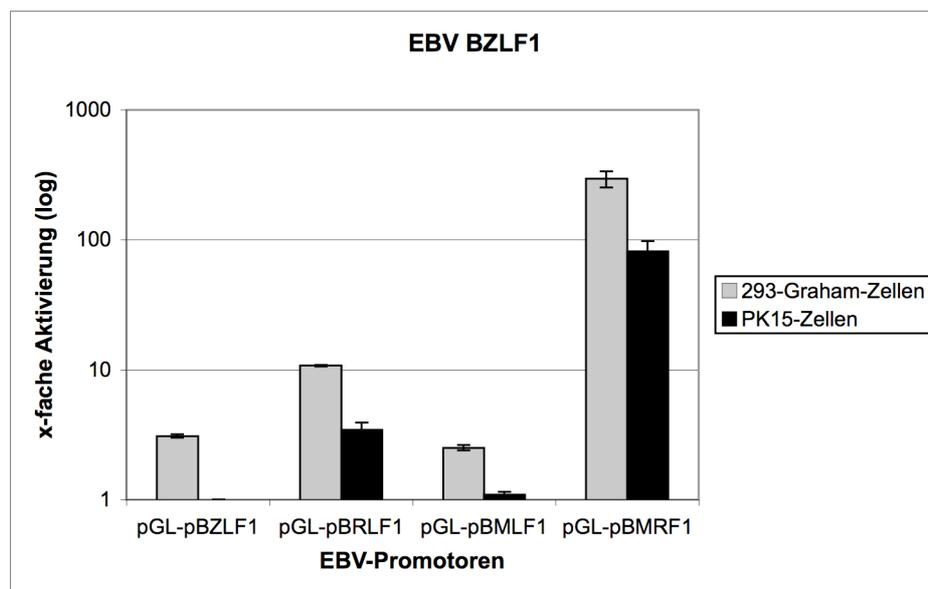


Abb. 40: Aktivierung von EBV-Promotoren durch EBV BZLF1. Die Transfektion von 293- und PK15-Zellen erfolgte mit dem Expressionsplasmid pCMV-BZLF1 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der EBV-Reporterplasmide (pGL-p). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität der Zellextrakte gemessen. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die normalisierten Luziferasewerte des Expressionsvektors wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Diese Versuche zeigten, dass die klonierten EBV-Promotorbereiche die essentiellen Regulationssequenzelemente für eine direkte bzw. indirekte Aktivierung durch BZLF1 bzw. BRLF1 tragen.

5.2.7.2 Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch EBV BRLF1 und BZLF1

Die Koftransfektion von 293-Graham- und PK15-Zellen erfolgte mit den Expressionsplasmiden pCMV-BZLF1, pCMV-BRLF1 bzw. dem Kontrollplasmid pCR-NS und jeweils einem der PLHV-1-Reporterplasmide pGL-p50, pGL-pA6, pGL-p57, pGL-p59, pGL-Dpol bzw. pGL-gB. EBV BRLF1 führte zu einer starken Induktion der PLHV-1-Promotoren in 293-Graham-Zellen (Abb. 41). Besonders stark wurde die Promotoraktivität von orf57 (50-fach) und orf59 (72-fach) durch EBV BRLF1 induziert. Interessanterweise wurden die Promotoren der PLHV-1-Gene orf50 und orf57 durch EBV BRLF1 (22/50-fach) deutlich stärker aktiviert als durch PLHV-1 ORF50 (5/34-fach; siehe Tab. 17). Eine geringe

Aktivierungsrate von 5-8-fach wurde für die Promotoren der PLHV-1-Gene orfA6/BZLF1_n, orf09/DPOI und orf08/gB gemessen. In PK15-Zellen war die BRLF1-vermittelte Induktion der PLHV-1-Promotoraktivität mit einer 4-8-fachen Aktivierungsrate deutlich niedriger (Abb. 41).

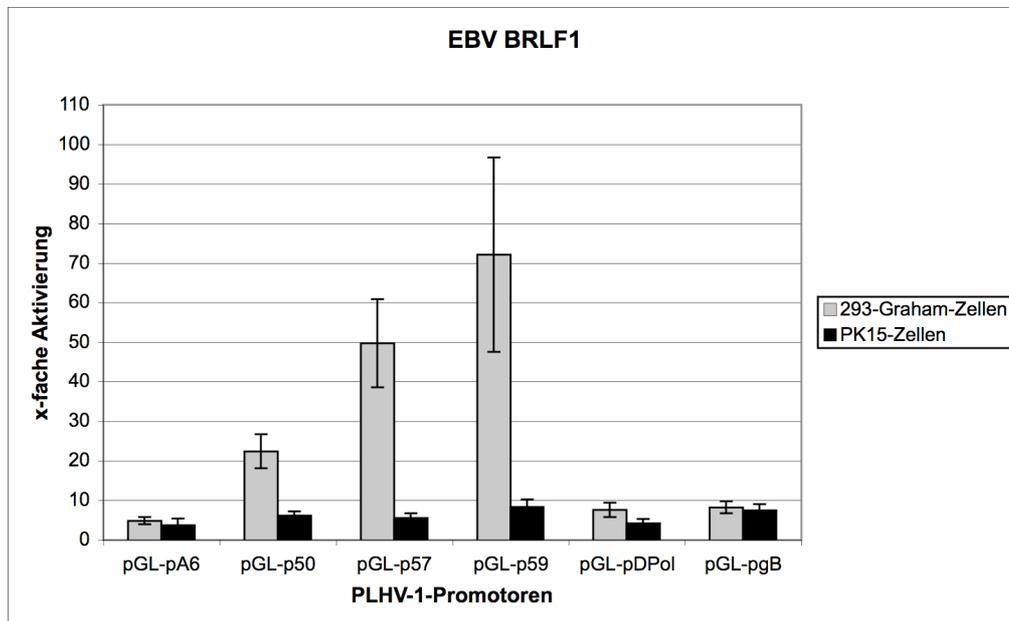


Abb. 41: Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch EBV BRLF1. 293-Graham- und PK15-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCMV-BRLF1 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der PLHV-1-Reportergenplasmide (pGL-p) transfiziert. Die Lyse der Zellen mit nachfolgender Messung der Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität erfolgte 48 h nach der Transfektion. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die mit dem Expressionsplasmid erhaltenen normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen gewonnen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Im Gegensatz zu EBV BRLF1 führte EBV BZLF1 zu einer deutlich geringeren Aktivierung (3-10-fach) von PLHV-1-Promotoren in 293-Graham-Zellen (Abb. 42). Dabei wurden die Promotoren der PLHV-1-Gene orf57 (6-fach) und orf08/gB (10-fach) am stärksten in 293-Graham-Zellen aktiviert. Im Vergleich zu PLHV-1 ORFA6/BZLF1_n führte EBV BZLF1 zu einer stärkeren Induktion der Promotoraktivität von PLHV-1 orf57- bzw. orf08/gB (siehe Tab. 17). In PK15-Zellen wurden ähnliche Tendenzen im Aktivierungsmuster der PLHV-1-Promotoren ermittelt, doch mit geringeren Aktivierungsraten (1-4-fach).

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der Aktivierung von PLHV-1-Promotoren im homologen und heterologen System zusammengefasst.

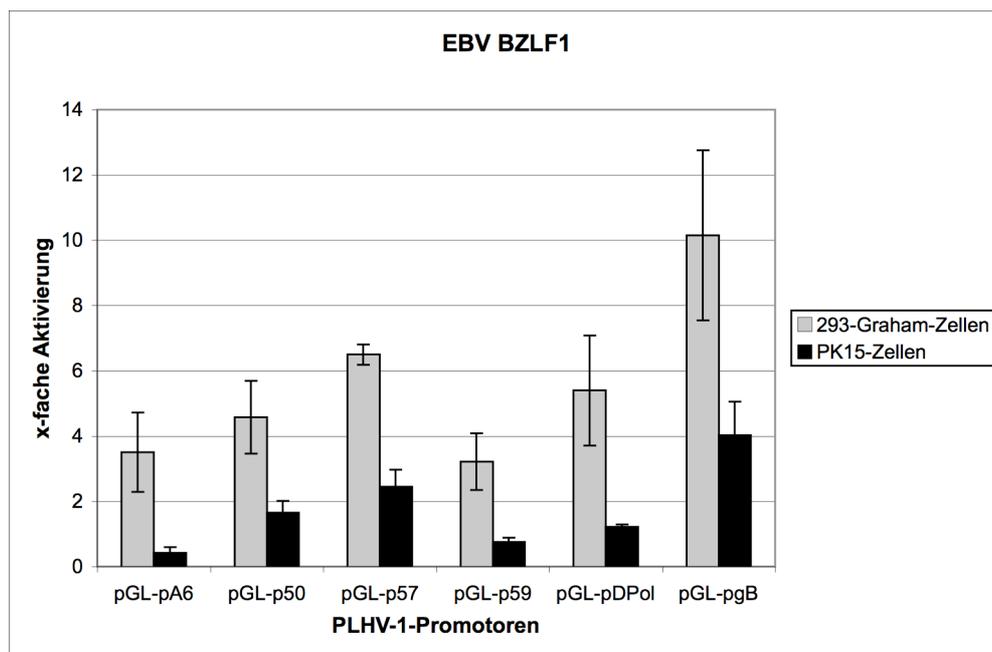


Abb. 42: Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch EBV BZLF1. Die Transfektion von 293-Graham- und PK15-Zellen erfolgte mit dem Expressionsplasmid pCMV-BZLF1 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der PLHV-1-Reportergenplasmide (pGL-p). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte gewonnen und die Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität gemessen. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die mit dem Expressionsplasmid erhaltenen normalisierten Luziferasewerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Die EBV-Transkriptionsaktivatoren BZLF1 und BRLF1 führten zu einer Aktivierung von verschiedenen PLHV-1-Promotoren. Vor allem EBV BRLF1 induzierte eine starke PLHV-1-Promotoraktivität.

Tabelle 17: Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren im homologen und heterologen System

	<i>x-fache Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren durch</i>			
	PLHV-1 ORF50	PLHV-1 ORFA6/BZLF1 _h	EBV BRLF1	EBV BZLF1
293-Graham-Zellen				
pGL-pA6	144 ± 19	9 ± 2,5	5 ± 1	3,5 ± 1
pGL-p50	5 ± 0,5	4 ± 0,5	22 ± 4	5 ± 1
pGL-p57	34 ± 6	2,5 ± 0,3	50 ± 11	6,5 ± 0,3
pGL-p59	94 ± 18	4 ± 0,4	72 ± 25	3 ± 1
pGL-pDPol	39 ± 9	4,5 ± 0,7	8 ± 2	5 ± 2
pGL-pgB	289 ± 45	5 ± 1	8 ± 2	10 ± 3

	<i>x-fache Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren durch</i>			
	PLHV-1 ORF50	PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h	EBV BRLF1	EBV BZLF1
PK15-Zellen				
pGL-pA6	134 ± 47	3 ± 0,3	4 ± 2	0,4 ± 0,2
pGL-p50	3 ± 0,6	3 ± 0,6	6 ± 1	2 ± 0,4
pGL-p57	7 ± 2	1,5 ± 0,2	6 ± 1	2,5 ± 0,5
pGL-p59	44 ± 2	2 ± 0,2	8 ± 2	1 ± 0,1
pGL-pDPol	40 ± 3,5	3 ± 0,3	4 ± 1	1 ± 0,1
pGL-pgB	83 ± 25	2,5 ± 0,4	7,5 ± 2	4 ± 1
IPAM-Zellen				
pGL-pA6	29 ± 7	1,5 ± 0,2	-	-
pGL-p50	2,2 ± 0,4	2 ± 0,4	-	-
pGL-p57	2 ± 0,4	1 ± 0,1	-	-
pGL-p59	12 ± 2	1 ± 0,1	-	-
pGL-pDPol	5 ± 1,4	1 ± 0,2	-	-
pGL-pgB	25 ± 6	2 ± 0,6	-	-

5.2.7.3 Aktivierung von EBV-Promotoren durch PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h

Um den Einfluss der PLHV-1-Aktivatorproteine ORF50 und ORFA6/BZLF1_h auf die Stimulation der EBV-Promotoren orfBZLF1, orfBRLF1, orfBMRF1 und orfBMLF1 zu untersuchen, wurden zunächst 293-Graham-Zellen mit den Expressionskonstrukten pCR-50, pCR-A6/BZLF1g bzw. dem Kontrollplasmid pCR-NS und jeweils einem der Reportergenplasmide pGL-pBZLF1, pGL-pBRLF1, pGL-pBMRF1 bzw. pGL-pBMLF1 kotransfiziert. PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h führte in 293-Graham-Zellen zu einer 2,5- bis 4,5-fachen Aktivierung der EBV-Promotoren, wobei die Aktivität des orfBMRF1-Promotors am stärksten stimuliert wurde (Abb. 43; Tab. 18). In PK15-Zellen zeigte PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h das gleiche Aktivierungsmuster der EBV-Promotoren, nur in geringerer Stärke (1,3-2,2-fach). Dagegen induzierte PLHV-1 ORF50 weder die Aktivität der EBV-Promotoren in 293-Graham-Zellen noch in PK15-Zellen (Abb. 44). In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der Transaktivierung von EBV-Promotoren im homologen und heterologen System zusammengefasst.

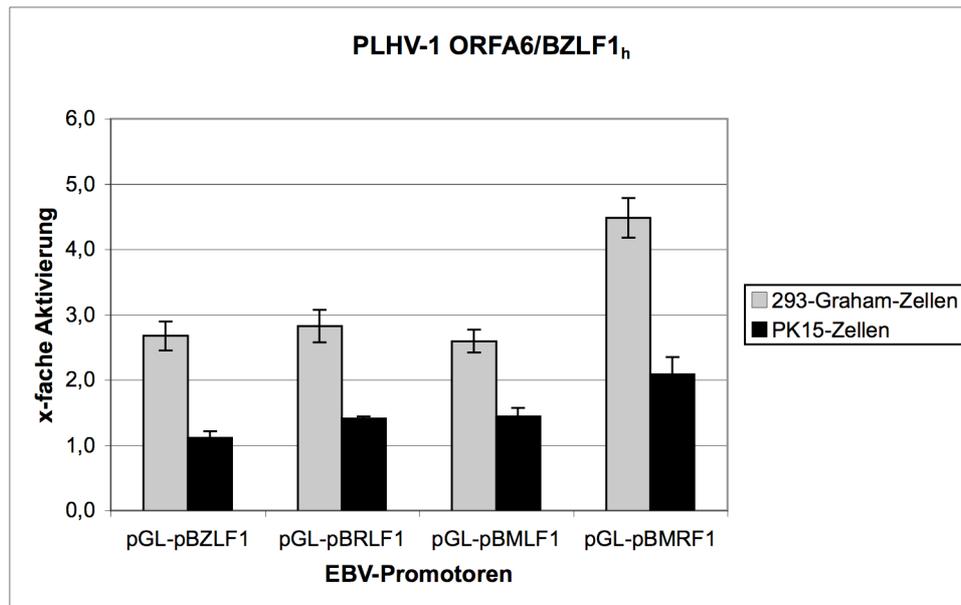


Abb. 43: Aktivierung von EBV-Promotoren durch PLHV-1 ORF6/BZLF1_h. 293-Graham- und PK15-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCR-A6/BZLF1g bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der EBV-Reportergenplasmide (pGL-p) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Luziferase- und β -Galactosidase-Aktivität gemessen. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die mit dem Expressionsplasmid erhaltenen normalisierten Luziferaseaktivitätswerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen gewonnen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

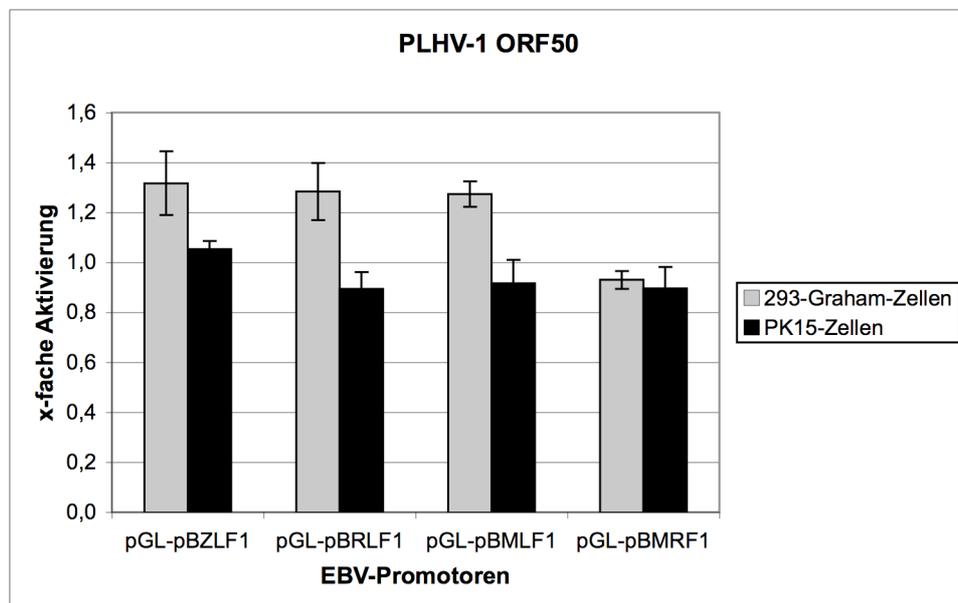


Abb. 44: Aktivierung von EBV-Promotoren durch PLHV-1 ORF50. Die Transfektion von 293-Graham- und PK15-Zellen erfolgte mit dem Expressionsplasmid pCR-50 bzw. dem Kontrollvektor pCR-NS und jeweils einem der EBV-Reportergenplasmide (pGL-p). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte gewonnen und die Luziferase- und β -Galactosidaseaktivität ermittelt. Alle Luziferasewerte wurden auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte als interner Standard bezogen. Die mit dem Expressionsplasmid erhaltenen normalisierten Luziferaseaktivitätswerte wurden auf die des Kontrollvektors pCR-NS bezogen, der dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Tabelle 18: Transaktivierung von EBV-Promotoren im homologen und heterologen System

	<i>x-fache Transaktivierung von EBV-Promotoren durch</i>			
	EBV BRLF1	EBV BZLF1	PLHV-1 ORF50	PLHV-1 ORFA6/BZLF1 _h
293-Graham-Zellen				
pGL-pBZLF1	13 ± 0,8	3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,7 ± 0,2
pGL-pBRLF1	22 ± 2	11 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,8 ± 0,3
pGL-pBMLF1	197 ± 18	2,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,6 ± 0,2
pGL-pBMRF1	155 ± 14	295 ± 42	0,9 ± 0	4,5 ± 0,3
PK15-Zellen				
pGL-pBZLF1	2 ± 0,2	0,6 ± 0	1,1 ± 0	1,1 ± 0,1
pGL-pBRLF1	4 ± 0,3	3 ± 0,5	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0
pGL-pBMLF1	11 ± 0,4	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1
pGL-pBMRF1	14 ± 2	81 ± 16	0,9 ± 0,1	2,1 ± 0,3

PLHV-1 ORF50 führte zu keiner Aktivierung von EBV-Promotoren. Dagegen induzierte ORFA6/BZLF1_h eine schwache EBV-Promotoraktivität. Eine Wechselwirkung zwischen beiden Gammaherpesviren konnte in diesen Experimenten nachgewiesen werden.

5.2.8 Versuche zur Reaktivierung von PLHV-3 und EBV

5.2.8.1 Optimierung der Elektroporation von B-Zellen

Für die Transfektion von B-Zellen wurde die Methode der Elektroporation favorisiert, da bei Einsatz von Reagenzien wie Effectene bzw. GenePorterTM2 nur ein geringer Anteil (< 5%) der Zellen transfiziert wurde. Um eine möglichst hohe Transfektionsrate zu erreichen, wurden zunächst verschiedene Parameter wie Spannung (220, 250, 270 V), DNA-Menge (10, 15, 20 µg) und Zelldichte (1x10⁷/ml, 2x10⁷/ml) unter Verwendung von zwei verschiedenen Elektroporationsmethoden (EP-Methode 1 bzw. 2) optimiert. Zur Messung der Transfektionseffizienz wurden latent infizierte porcine B-Zellen (L23) bzw. latent infizierte Krallenaffen-B-Zellen (B95-8) mit dem GFP-Expressionsplasmid pEGFP-N3 transfiziert und nach 48 h einer FACS-Analyse unterzogen.

Folgende Elektroporationsmethoden wurden angewandt:

EP-Methode 1:

Je 500 µl Suspensionszellen einer Zelldichte von 1 x 10⁷/ml bzw. 2 x 10⁷/ml in serumfreien Medium (37°C) wurden in eine raumtemperierte Elektroporationsküvette überführt, in welche

10-20 μg DNA vorgelegt wurden. Nach Elektroporation bei 960 μF und 220-270 V erfolgte die sofortige Zugabe von 500 μl vorgewärmten FKS. Nach vorsichtigem Pipettieren zur Vereinzelnung der Zellen wurden die Zellen in vorgewärmtes Medium mit 10% FKS überführt und im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

EP-Methode 2:

Je 500 μl Suspensionszellen wurden auf eine Zelldichte von $1 \times 10^7/\text{ml}$ bzw. $2 \times 10^7/\text{ml}$ in eisgekühltem, serumfreien Medium eingestellt. Die Zellen wurden in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt, in welche 10-20 μg DNA vorgelegt wurden. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Elektroporation bei 960 μF und Spannungen von 220-270 V. Die elektroporierten Zellen wurden für weitere 10 min auf Eis inkubiert und nach vorsichtigem Pipettieren zur Vereinzelnung der Zellen anschließend in vorgewärmtes Medium mit 20% FKS überführt.

5.2.8.1.1 Optimierung der Elektroporation von L23-Zellen

Die Suspensionszellen der porzinen B-Zelllinie L23 wurden mit Hilfe der unter 5.2.8.1 genannten Elektroporationsmethoden und unterschiedlichen DNA-Mengen (10, 15, 20 μg) sowie bei Spannungen von 220, 250, bzw. 270 V mit dem Expressionsplasmid pEGFP-N3 transfiziert. Die Kapazität wurde nicht verändert und lag bei 960 μF . Die Analyse der L23-Zellen nach Zellgröße und Granularität ergab zwei Zellpopulationen, die mehrheitlich entweder die toten (R1) oder die lebenden Zellen (R4) darstellten (Abb. 45 A). Zur Markierung der toten Zellen wurde vor der FACS-Analyse der Farbstoff Propidiumiodid hinzugefügt, so dass die Eigenfluoreszenz toter Zellen im Propidiumiodid-Kanal gemessen werden kann (Abb. 45 B,C). Als Negativkontrolle dienten zum einen nicht-stimulierte L23-Zellen bzw. Zellen, die mit dem Kontrollplasmid pCR-NS transfiziert wurden. Abbildung 45 B zeigt beispielhaft Zellen, die mit pCR-NS transfiziert wurden und im Propidiumiodid- bzw. GFP-Kanal vermessen wurden. Wie erwartet konnte keine GFP-Fluoreszenz gemessen werden (Abb. 45 B). Bei Transfektion von L23-Zellen mit pEGFP-N3 konnte eine deutliche GFP-Fluoreszenz ermittelt werden (Abb. 45 C). Die Überlagerung der GFP-Fluoreszenzwerte der Kontrollzellen und GFP-exprimierenden Zellen ist in Abbildung 45 D dargestellt. Zur Ermittlung des Anteils GFP-transfizierter Zellen bzw. toter Zellen der Gesamtzellpopulation wurden alle Zellen (R1+R4) ausgewertet. Um den Anteil GFP-transfizierter Zellen an der lebenden Zellpopulation zu ermitteln, wurde nur die mit R4 benannte Zellpopulation ausgewertet. Tabelle 19 gibt einen Überblick über die ermittelten Transfektionseffizienzen bei Verwendung unterschiedlicher Elektroporationsparameter. Dabei wurden L23-Zellen bei Spannungen von 220, 250 bzw. 270 V, DNA-Mengen von 10, 15 bzw. 20 μg und zweier Elektroporationsmethoden (EP-Methode 1, 2) transfiziert.

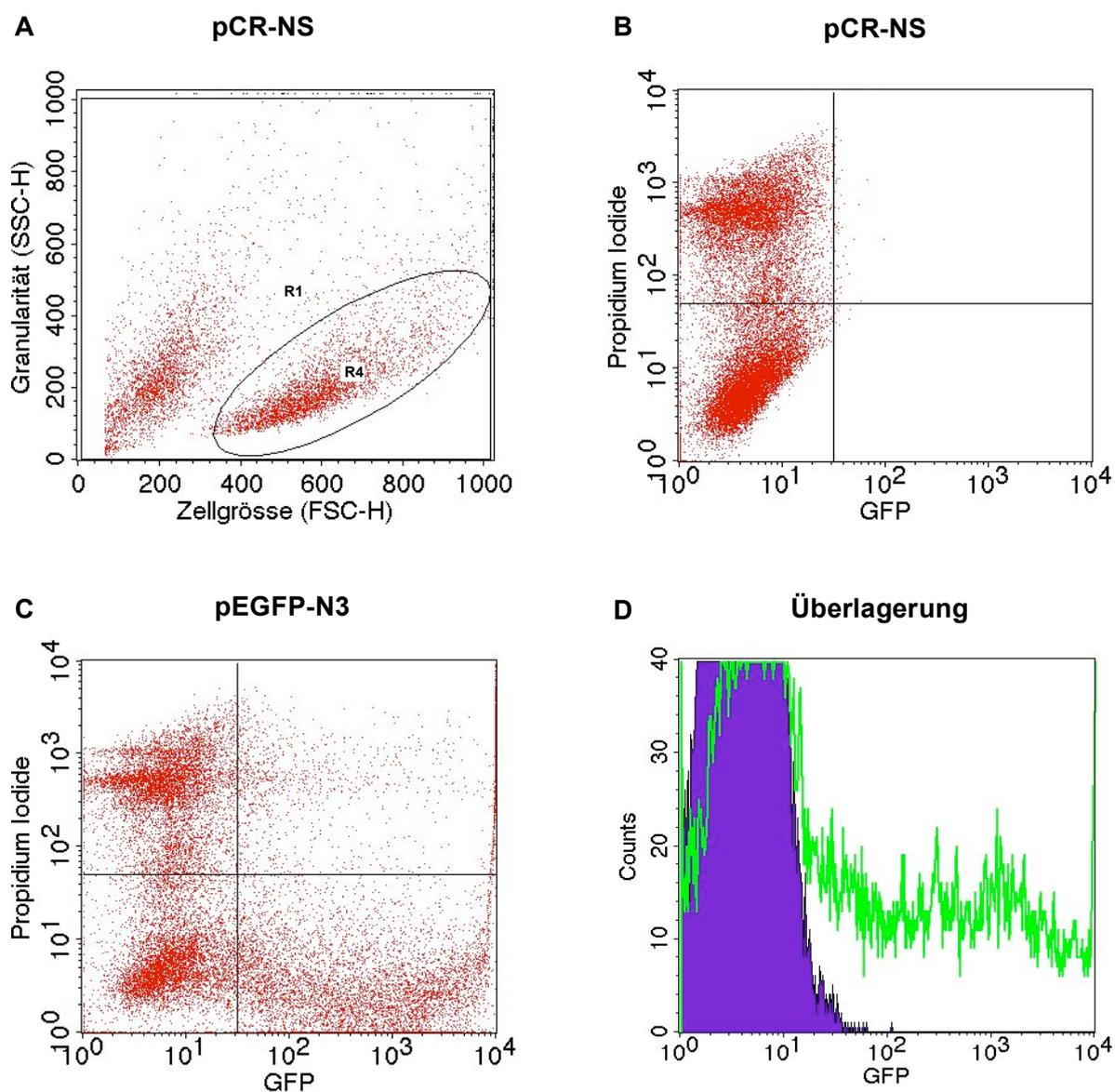


Abb. 45: Ermittlung der Transfektionseffizienz von porzinen B-Zellen mittels FACS-Analyse.

Porzine L23-Zellen wurden mit 15 μg Kontrollplasmid pCR-NS (A, B) bzw. 15 μg Expressionsplasmid pEGFP-N3 (C) unter Verwendung der EP-Methode 1 bei 250 V, 960 μF transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Isolation der Zellen mit nachfolgender FACS-Analyse. Die Zellen wurden nach Zellgröße/Granularität (A), GFP-Fluoreszenz bzw. tote/lebende Zellen (B, C) unterschieden. Unter (D) ist die GFP-Fluoreszenz (grün) überlappend mit den Kontrollzellen (blau) dargestellt.

Tabelle 19: Ermittlung der Transfektionseffizienz von L23-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher Elektroparationsparameter

Probe (Spannung (V) / Kapazität (μF); Methodentyp)	DNA (μg)	tote Zellen (%) von R1+R4 *	GFP-transfizierte Zellen (%) von R1+R4 *	tote Zellen (%) von R4 **	GFP-transfizierte Zellen (%) von R4 **
NK	-	▶ 28,0	-	3,76	-
220V / 960 μF Methode 1					
pEGFP-N3	10	38,1	20,5	5,6	32,7
pEGFP-N3	15	35,6	25,5	5,5	39,1
pEGFP-N3	20	36,6	24,4	6,0	38,2

Probe (Spannung (V) / Kapazität (µF); Methodentyp)	DNA (µg)	tote Zellen (%) von R1+R4 *	GFP-transfizierte Zellen (%) von R1+R4 *	tote Zellen (%) von R4 **	GFP-transfizierte Zellen (%) von R4 **
250V / 960 µF Methode 1					
pCR-NS	15	40,7	-	4,1	-
pEGFP-N3	10	43,4	27,2	4,8	51,4
pEGFP-N3	15	▶ 40,8	▶ 30,1	5,2	▶ 53,3
pEGFP-N3	20	46,9	28,5	6,3	56,5
270V / 960 µF Methode 1					
pEGFP-N3	10	40,7	28,6	3,8	51,0
pEGFP-N3	15	48,6	28,7	6,8	58,9
pEGFP-N3	20	50,3	26,6	7,6	59,7
220V / 960 µF Methode 2					
pEGFP-N3	10	35,1	6,5	3,6	10,0
pEGFP-N3	15	41,9	7,9	3,6	14,2
pEGFP-N3	20	42,7	9,5	3,9	16,8
250V / 960 µF Methode 2					
pCR-NS	15	46,0	-	2,9	-
pEGFP-N3	10	41,0	8,7	2,1	16,5
pEGFP-N3	15	▶ 43,8	▶ 15,1	2,7	29,0
pEGFP-N3	20	45,8	18,4	3,9	35,9
270V / 960 µF Methode 2					
pEGFP-N3	10	49,8	14,7	2,9	34,0
pEGFP-N3	15	57,2	14,5	5,6	37,9
pEGFP-N3	20	58,5	15,1	6,7	39,9

* R1+R4 als Gesamtpopulation definierte Zellpopulation

** R4 als lebend definierte Zellpopulation

▶ markierte Ziffern im Text erwähnt

Die Analyse unstimulierter Kontrollzellen ergab einen Anteil von ca. 28% toter Zellen der Gesamtzellpopulation, deren Anteil sich mit steigender Spannung erhöhte (Tab. 19). Unter Verwendung der EP-Methode 1 konnten deutlich höhere Transfektionsraten erreicht werden als bei Verwendung der EP-Methode 2. So wurden bei Einsatz von 10-20 µg DNA, 250 V und Verwendung der EP-Methode 1 ca. 30% der Gesamtzellpopulation transfiziert (Tab. 19). Die Auswertung der lebenden Zellpopulation ergab eine Transfektionseffizienz von über 50%. Dabei lag der Anteil toter Zellen der Gesamtzellpopulation bei über 40%. Im Gegensatz dazu wurde mit Hilfe der EP-Methode 2 nur eine Transfektionseffizienz von ca. 15% erreicht, wenn die Zellen mit 10-20 µg DNA bei 250 V transfiziert wurden (Tab. 19). Der Anteil toter Zellen der Gesamtzellpopulation lag bei über 40%. Durch Variation der Spannung und der DNA-Konzentration konnte die Transfektionseffizienz weiter optimiert werden. Unabhängig von der Art der EP-Methode wurde bei Erhöhung der Spannung von 220 V auf 250 V die Transfektionseffizienz deutlich gesteigert. Bei einer weiteren Erhöhung der Spannung auf 270 V und Verwendung der EP-Methode 1 konnte die Transfektionsrate von ca. 30% nicht weiter gesteigert werden (siehe Tab. 19). Dafür stieg der Anteil toter Zellen der Gesamtzellpopulation leicht an. Die Variation der DNA-Menge von 10, 15 bzw. 20 µg hatte im Gegensatz zur Spannung einen geringeren Einfluss auf die Transfektionsrate. Bei einer

Zelldichte von 5×10^6 war der Anteil toter Zellen etwas höher als bei einer Zelldichte von 1×10^7 (Daten nicht gezeigt).

Nach der Optimierung der Elektroporation wurden folgende Bedingungen für die Elektroporation der porzinen L23-Zellen erarbeitet:

Methode	Spannung (Volt)	Kapazität (μF)	Zelldichte	DNA-Menge (μg)
EP-Methode 1	250	960	1×10^7	15

Zur Überprüfung, ob die Transfektionseffizienz unter gleichen Bedingungen in mehreren Ansätzen konstant bleibt, wurde die Transfektionsrate von L23-Zellen in drei Parallelansätzen gemessen. Aus Tabelle 20 wird ersichtlich, dass unter gleichen Elektroporationsbedingungen der Anteil GFP-exprimierender Zellen relativ konstant bleibt und bei ca. 30% der Gesamtzellpopulation liegt. Der Anteil toter Zellen der Gesamtzellpopulation lag dagegen bei ca. 40%. Um zu gewährleisten, dass der Anteil transfizierter Zellen pro Ansatz gleich ist, wurden zunächst Zellen aus vier Elektroporationsküvetten mit je 1×10^7 Zellen nach der Elektroporation vereinigt und anschließend auf zwei Zellkulturflaschen verteilt. Die Lyse der Zellen bzw. die Abnahme der Überstände erfolgte dann nach zwei bzw. vier Tagen.

Tabelle 20: Ergebnisse der Elektroporation von L23-Zellen bei Verwendung der EP-Methode 1, 250 V und 960 μF

Plasmid	DNA (μg)	tote Zellen (%) von R1+R4 *			GFP-transfizierte Zellen (%) von R1+R4 *			tote Zellen (%) von R4 **			GFP-transfizierte Zellen (%) von R4 **		
		Exp1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3
pCR-NS	15	40,7	43,1	40,5	-	-	-	4,1	5,2	4,6	-	-	-
pEGFP-N3	10	43,4	39,1	41,3	27,2	25,2	24,7	4,8	6,6	6,0	51,4	41,6	41,0
pEGFP-N3	15	40,8	39,1	43,6	30,1	31,5	28,9	5,2	7,4	7,9	53,3	50,8	49,2
pEGFP-N3	20	46,9	41,9	42,8	28,5	29,6	28,1	6,3	8,6	7,8	56,5	49,4	45,7

* R1+R4 als Gesamtpopulation definierte Zellpopulation

** R4 als lebend definierte Zellpopulation

fett hervorgehoben: Transfektionseffizienz der Gesamtzellpopulation aus 3 Experimenten

5.2.8.1.2 Optimierung der Elektroporation von B95-8-Zellen

In Analogie zur Optimierung der Elektroporation der L23-Zellen wurden ebenfalls die Elektroporationsbedingungen für die Krallenaffen-B-Zelllinie B95-8 optimiert. Die Elektroporation erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie bereits für die L23-Zellen

beschrieben. In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der Elektroporation von B95-8-Zellen zusammengefasst. Es zeigte sich, dass der Anteil toter Zellen im Allgemeinen deutlich geringer war als bei den porzinen L23-Zellen. Bei unstimulierten Zellen und solchen, die mit der EP-Methode 1 bei 250 V, 960 μ F und 10-20 μ g DNA transfiziert wurden, lag der Anteil der toten Zellen bei unter 10% (Tab. 21).

Tabelle 21: Ermittlung der Transfektionseffizienz von B95-8-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher Elektroporationsparameter

Probe (Spannung (V) / Kapazität (μ F) Methodentyp)	DNA (μ g)	tote Zellen (%) von R1+R4 *	gfp-transfizierte Zellen (%) von R1+R4 *	tote Zellen (%) von R4 **	gfp-transfizierte Zellen (%) von R4 **
NK	-	▶ 7,8	-	1,1	-
220V / 960 μF Methode 1					
pEGFP-N3	10	5,7	18,6	0,8	19,1
pEGFP-N3	15	6,8	24,6	0,8	25,7
pEGFP-N3	20	6,0	32,8	0,7	34,5
250V / 960 μF Methode 1					
pCR-NS	15	7,7	-	1,7	-
pEGFP-N3	10	5,9	31,4	0,9	32,6
pEGFP-N3	15	6,9	45,2	0,8	48,5
pEGFP-N3	20	6,5	46,5	0,7	49,3
270V / 960 μF Methode 1					
pCR-NS	15	11,1	-	2,9	-
pEGFP-N3	10	8,9	39,8	2,7	41,7
pEGFP-N3	15	▶ 10,1	▶ 46,2	3,6	▶ 48,5
pEGFP-N3	20	10,3	49,8	3,9	51,2
220V / 960 μF Methode 2					
pEGFP-N3	10	23,2	3,8	2,8	4,8
pEGFP-N3	15	23,6	4,5	2,8	5,9
pEGFP-N3	20	21,1	5,5	2,5	6,8
250V / 960 μF Methode 2					
pCR-NS	15	24,0	-	2,6	-
pEGFP-N3	10	21,1	6,2	2,2	8,2
pEGFP-N3	15	▶ 22,3	▶ 9,5	2,6	11,9
pEGFP-N3	20	20,8	16,0	2,4	20,1

* R1+R4 als Gesamtpopulation definierte Zellpopulation

** R4 als lebend definierte Zellpopulation

▶ markierte Ziffern im Text erwähnt

Die Analyse der Zellen nach Zellgrösse und Granularität ergab ebenfalls zwei Zellpopulationen, die zum einen die überwiegend toten (R1) bzw. lebenden (R4) Zellen darstellten (Abb. 46 A). Abbildung 46 B zeigt beispielhaft Kontrollzellen, die mit pCR-NS transfiziert wurden und kein GFP exprimieren. Wie bei den porzinen L23-Zellen konnte unter Verwendung der EP-Methode 1 die höchste Transfektionseffizienz erzielt werden. Bei 270 V und 10-20 μ g DNA stieg die Transfektionsrate auf über 45% der Gesamtzellpopulation (Abb. 46 C, Tab. 21). Die Auswertung der lebenden Zellpopulation ergab eine Transfektionseffizienz von ca. 50% (Tab. 21). Mit Hilfe der EP-Methode 2 konnten nur ca. 10% der Zellen transfiziert werden, wenn mit 10-20 μ g DNA und 250 V elektroporiert wurde (Tab. 21). Dabei lag der Anteil toter Zellen mit ca. 20% etwa doppelt so hoch als bei

Verwendung der EP-Methode 1. Vergleicht man die beiden Zelllinien miteinander, so scheinen die Zellen der Krallenaffen-B-Zelllinie B95-8 besser transfizierbar zu sein und weniger sensitiv auf höhere Spannungen zu reagieren.

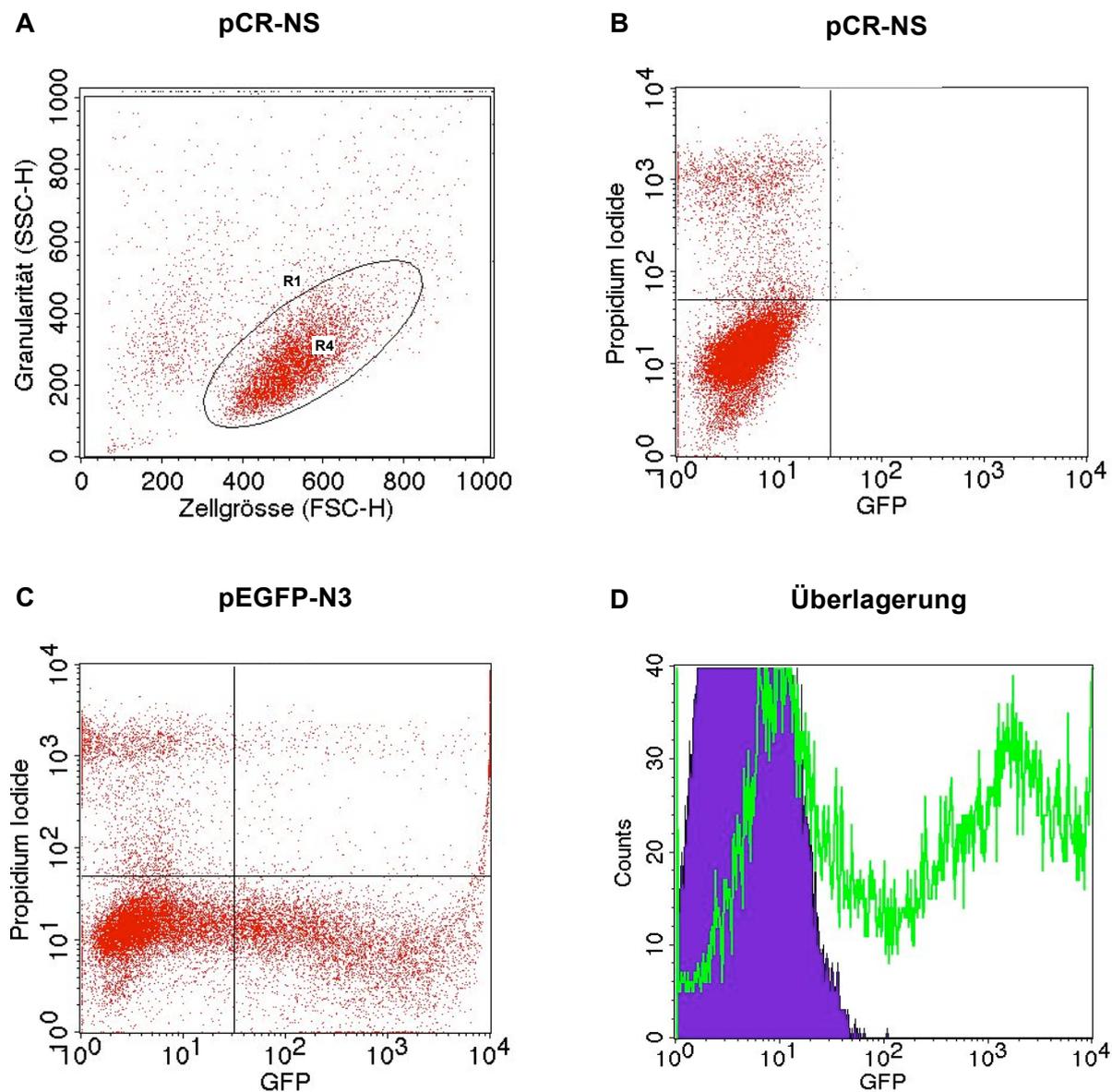


Abb. 46: Ermittlung der Transfektionseffizienz von B-Zellen der Krallenaffenlinie B95-8 mittels FACS-Analyse.

B95-8-Zellen wurden mit 20 μ g Kontrollplasmid pCR-NS (A, B) bzw. 20 μ g Expressionsplasmid pEGFP-N3 (C) unter Verwendung der EP-Methode 1 bei 270 V und 960 μ F transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen isoliert und mittels FACS analysiert. Die Zellen wurden nach Zellgröße/Granularität (A), GFP-Fluoreszenz bzw. tote / lebende Zellen (B, C) unterschieden. Unter (D) ist die GFP-Fluoreszenz (grün) überlappend mit den Kontrollzellen (blau) dargestellt.

Nach der Optimierung der Parameter wurden folgende Bedingungen für die Elektroporation der B95-8-Zellen erarbeitet:

Methode	Spannung (Volt)	Kapazität (μF)	Zelldichte	DNA-Menge (μg)
EP-Methode 1	270	960	1×10^7	20

5.2.8.2 Versuche zur Reaktivierung von EBV

Eine Möglichkeit, den lytischen Infektionszyklus von Herpesviren zu induzieren, besteht darin, Regulatorproteine der *immediate early*-Genexpression in latent Virus-infizierten Zellen im Überschuss zu exprimieren, um den Übergang von der Latenz in die lytische Infektionsphase anzuregen.

Zur Induktion der lytischen EBV-Replikation wurden latent EBV-infizierte B95-8-Zellen mit den EBV-Expressionsplasmiden pCMV-BZLF1 bzw. pCMV-BRLF1 oder beiden (pCMV-BZ+BRLF1) unter Verwendung der optimierten Elektroporationsbedingungen transfiziert (siehe 5.2.8.1.2). Außerdem wurden B95-8-Zellen mit den PLHV-1-Expressionsplasmiden pCR-50 bzw. pCR-A6/BZLF1g oder beiden (pCR-50+A6/BZLF1g) elektroporiert um eine mögliche heterologe Transaktivierung zu untersuchen. Als Positivkontrolle dienten B95-8-Zellen, die mit TPA induziert wurden. Unstimulierte Zellen oder Zellen, die mit pCR-NS transfiziert wurden, dienten als Negativkontrolle. Nach zwei bzw. vier Tagen wurden die Zellen und Überstände geerntet und die Viruslast mittels real time-PCR bestimmt. Dazu wurde die DNA einer intergenischen EBV-Region quantitativ bestimmt, um die relative Erhöhung der EBV-Kopienzahl zu messen. Zur Ermittlung der Standardkurve wurde das Plasmid pTOPO-EBVint in 10-fach Verdünnungen ($1 \cdot 10^5$ Kopien/ μl) in der real time-PCR eingesetzt und die C_T -Werte ermittelt. Als zelluläres Referenzgen diente Cyclophilin A, das in denselben Proben gemessen wurde. Als Standard wurde das Plasmid pTOPO-CycA verwendet, welches ebenfalls in 10-fach Verdünnungen in der real time-PCR eingesetzt wurde. Abbildung 47 zeigt die Standardkurven zur Ermittlung der EBV- bzw. Cyclophilin A-Kopienzahlen. Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden (EBVint=-3,6; CycA=-3,34) wurde die Effizienz der PCR-Reaktion berechnet, die mit Werten um 2 nahe dem theoretischen Optimum lagen.

Nach Normalisierung der erhaltenen EBV-Kopienzahlen auf die jeweilige Cyclophilin A-Kopienzahl in den Zellproben wurde die Kopienzahl der Negativkontrolle (pCR-NS) dem Wert 1 gleichgesetzt. Die normalisierte EBV-Kopienzahl aus den TPA-induzierten Proben wurde auf die normalisierte Kopienzahl der unstimulierten Kontrollzellen bezogen, die ebenfalls dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die EBV-Kopienzahl in den Überständen wurde zunächst pro ml ermittelt und anschließend auf die Zellzahl bezogen. Die normalisierten Kopienzahlen aller Proben aus den Zellen und Überständen wurden auf die der entsprechenden Negativkontrolle bezogen, um die Viruskopienvermehrung über der Negativkontrolle darzustellen.

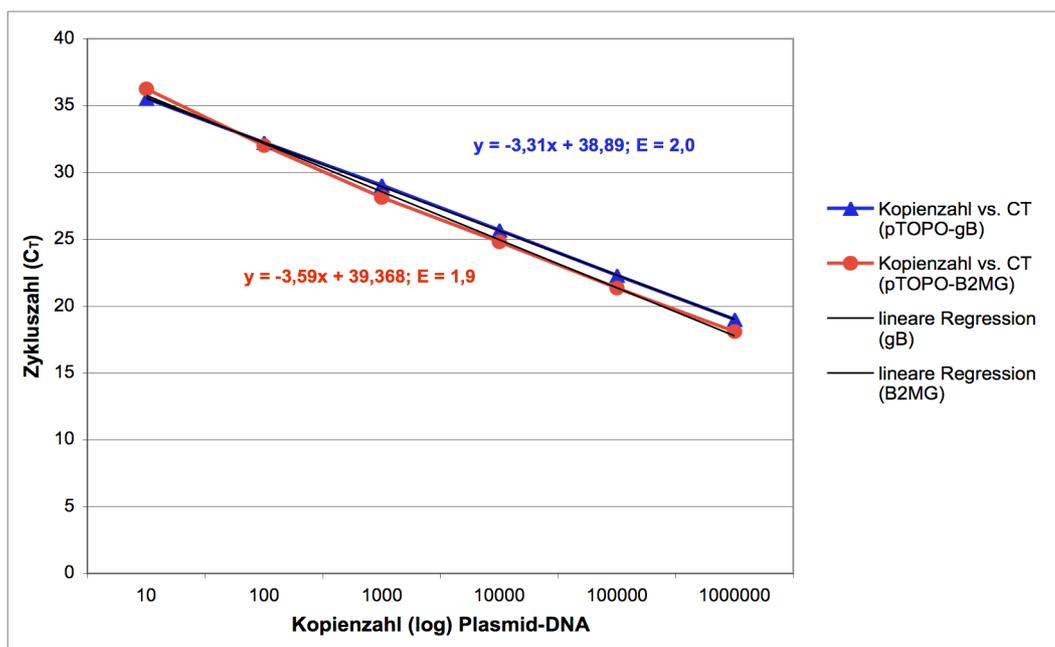


Abb. 47: Standardkurven des Zielgens (EBVint) bzw. des Referenzgens (CycA) zur Ermittlung der EBV- bzw. Cyclophilin A-Kopienzahl. Die Plasmide pTOPO-EBVint bzw. pTOPO-CycA wurden in 10-fach-Verdünnungen ($10 \cdot 10^6$ Kopien/Ansatz) in der real-time PCR eingesetzt und die intergenische EBV-Region (blau) bzw. Cyclophilin A (rot) in jeder Probe amplifiziert. Als Maß für die amplifizierte DNA-Menge in jeder Probe wurde der C_T-Wert angegeben, der den PCR-Zyklus charakterisiert, bei dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal einen bestimmten Schwellenwert übertritt. Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden wurde die PCR-Effizienz (E) ermittelt. Aus den Gleichungen der Geraden und dem entsprechenden C_T-Wert einer Probe kann die in der Probe enthaltene EBV- bzw. Cyclophilin A-Kopienzahl ermittelt werden.

Betrachtet man die EBV-Viruslast in den Zellen und Überständen, so sind unterschiedliche Tendenzen nach zwei bzw. vier Tagen erkennbar (Abb. 48 A, B). Während zumindest in den Zellen nach zwei Tagen eine 2-5-fache Vermehrung der EBV-Kopienzahlen zu erkennen ist, konnte keine erhöhte Viruslast in den Überständen nach zwei Tagen gemessen werden (Abb. 48 A). Bei Transfektion der Zellen mit dem Plasmid pCMV-BZLF1 erhöhte sich die EBV-Kopienzahl in den Zellen nach zwei Tagen um das ca. 5-fache der Negativkontrolle (Abb. 48 A). Bei Stimulation mit TPA steigerte sich die Viruslast in den Zellen um den Faktor 3,5 (Abb. 48 B). Eine 2-3-fache Steigerung der EBV-Kopienzahl wurde bei Transfektion der Zellen mit den Plasmiden pCMV-BRLF1, pCMV-BZ+BRLF1 und pCR-50 gemessen (Abb. 48 A). Dagegen konnte bei Transfektion der Zellen mit pCR-A6/BZLF1g keine Steigerung in der Viruskopienzahl ermittelt werden. Nach vier Tagen wurde in Zellen, die mit den verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert wurden, keine weitere Steigerung der Viruslast im Vergleich zu Tag 2 gemessen (Abb. 48 A). Die Werte entsprachen denen von Tag 2 oder lagen leicht darunter. Bei Transfektion mit pCMV-BZLF1 sank die Viruslast nach vier Tagen sogar um die Hälfte in Bezug auf Tag 2. Im Gegensatz dazu steigerte sich die EBV-Kopienzahl in den TPA-stimulierten Zellen auf das ca. 7-fache der Negativkontrolle (Abb. 48 B).

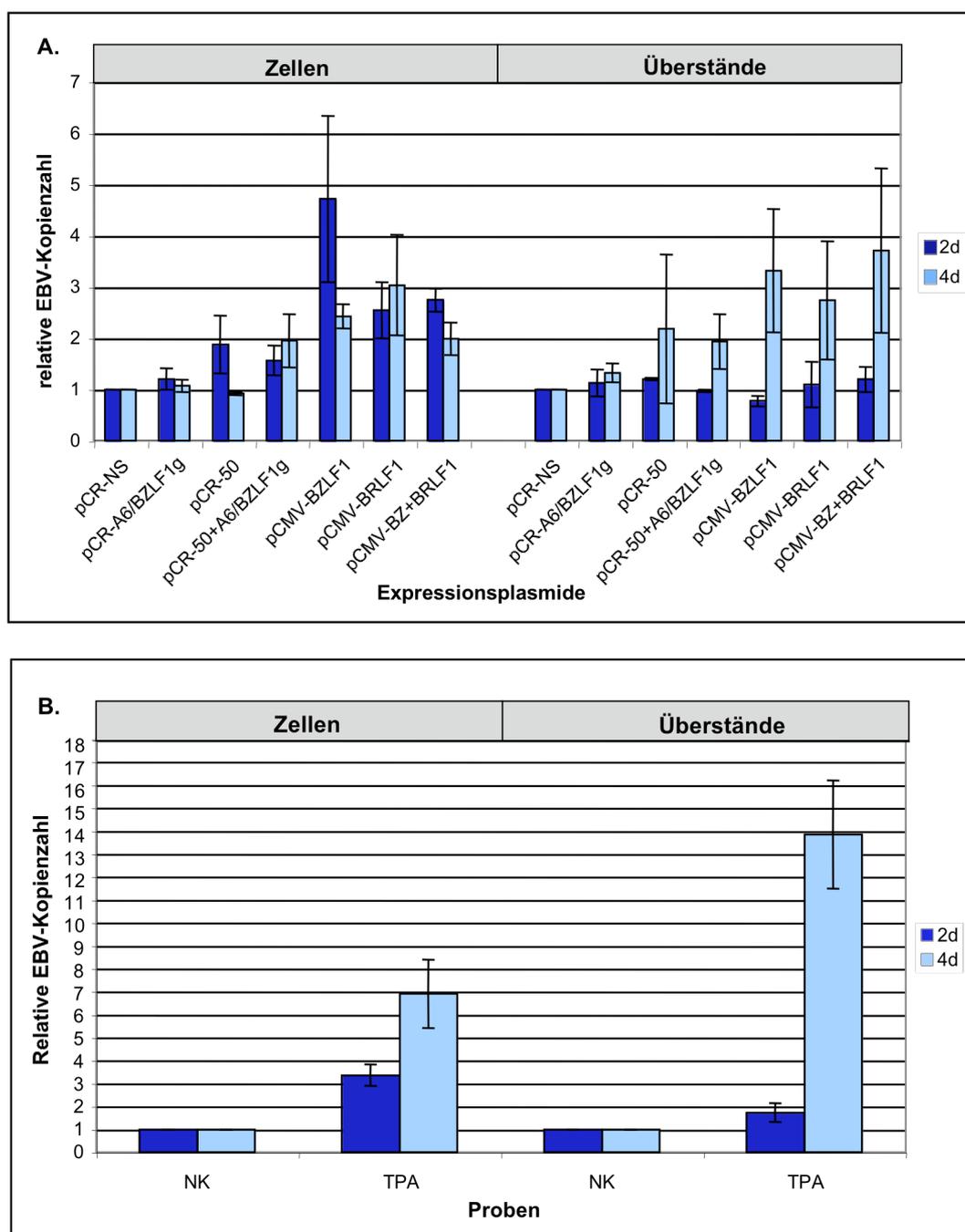


Abb. 48: Stimulation von EBV in B95-8-Zellen nach Transfektion von Expressionsplasmiden (A) bzw. nach chemischer Induktion (B). B95-8-Zellen wurden mit den oben aufgeführten Expressionsplasmiden (A) transfiziert oder mit TPA (B) induziert. Nach zwei bzw. vier Tagen erfolgte die Ernte der Zellen bzw. die Abnahme der Überstände. Nach Extraktion der viralen DNA wurde mit den Primern 2816s/as eine intergenische Region als Maß für die EBV-Genomvermehrung mittels real time-PCR quantifiziert. Als Negativkontrolle dienten entweder B95-8-Zellen, die mit dem Plasmid pCR-NS (A) transfiziert wurden oder unstimulierte Zellen (B). Neben der Quantifizierung der EBV-Kopienzahl wurde Cyclophilin A mit den Primern 3351s/as als zelluläres Referenzgen quantifiziert. Die normalisierten EBV-Kopienzahlen jeder Probe wurden auf die jeweilige normalisierte Kopienzahl der Kontrolle bezogen, die dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen gewonnen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Betrachtet man dagegen die EBV-Viruslast in den Überständen, so wurde nach vier Tagen eine bis zu 4-fache Erhöhung der EBV-Kopienzahl in den Zellen gemessen, die mit den Expressionsplasmiden transfiziert wurden (Abb. 48 A). Eine 3-4-fache Steigerung der EBV-

Viruslast wurde in den Überständen ermittelt, deren Zellen mit pCMV-BZLF1, pCMV-BRLF1 oder pCMV-BZ+BRLF1 transfiziert waren. Etwas geringer (ca. 2-fach) war die Viruslast in den Überständen von Zellen, die mit den PLHV-1-Expressionsplasmiden pCR-50 bzw. pCR-50+A6/BZLF1g transfiziert wurden (Abb. 48 A). Keine Steigerung der EBV-Kopienzahl wurde dagegen in den Überständen von Zellen ermittelt, die mit pCR-A6/BZLF1g transfiziert wurden. Die höchste EBV-Kopienzahl (ca. 14-fach) wurde nach vier Tagen in den Überständen TPA-stimulierter Zellen gemessen (Abb. 48 B). Dennoch ist die Herkunft der Virus-DNA in den Überständen nicht eindeutig, da in allen Überständen auch genomische DNA nachgewiesen wurde. Es bleibt also unklar, wie viel Virus-DNA tatsächlich aus produzierten Viruspartikeln oder aus zugrunde gegangenen Zellen oder Zelltrümmern stammte, in denen das Virus latent vorlag.

Die Expression von EBV BZLF1 bzw. BZLF1+BRLF1 in B95-8-Zellen führte zu einer moderaten Induktion der EBV-Replikation. ORF50 von PLHV-1 induzierte eine leichte (ca. 2-fach) Erhöhung der EBV-Viruskopienzahl in den Zellen und Überständen. Im Gegensatz dazu führte die Expression von PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h zu keiner Steigerung der EBV-Kopienzahl. Die stärkste Induktion der EBV-Replikation wurde durch TPA erreicht.

5.2.8.3 Versuche zur Reaktivierung von PLHV-3

Nachdem die Induktion der EBV-Replikation durch Überexpression von BZLF1 in B95-8-Zellen gezeigt wurde, sollten vergleichbare Induktionsversuche in den L23-Zellen erfolgen, die latent mit PLHV-3 infiziert waren. Vorherige Versuche, die Virusproduktion mit verschiedenen chemischen Stimulantien in diesen Zellen anzuregen, verliefen erfolglos (Chmielewicz, 2002).

Zur Induktion der lytischen PLHV-3-Replikation wurden L23-Zellen mit den PLHV-1-Expressionsplasmiden pCR-50, pCR-A6/BZLF1g bzw. beiden Plasmiden (pCR-50+A6/BZLF1g) unter Verwendung der optimierten Elektroporationsbedingungen (Abschnitt 5.2.8.1.1) transfiziert. Zur Untersuchung einer möglichen heterologen Transaktivierung wurden L23-Zellen außerdem mit den EBV-Expressionsplasmiden pCMV-BZLF1, pCMV-BRLF1 bzw. beiden Plasmiden (pCMV-BZ+BRLF1) elektroporiert. Obwohl eine Stimulation mit TPA keine nennenswerte Induktion der PLHV-3-Replikation induziert hatte (Chmielewicz, 2002), wurde TPA als Stimulanz verwendet, um Vergleiche zu den EBV-Induktionsversuchen ziehen zu können. Als Negativkontrolle dienten L23-Zellen, die mit dem Kontrollplasmid pCR-NS transfiziert wurden. Nach zwei bzw. vier Tagen wurden die Zellen und Überstände auf ihren Virusgehalt untersucht. Dazu wurde die DNA des gB-Gens als Maß für die relative Erhöhung der PLHV-3-Kopienzahl mittels real time-PCR quantifiziert. Zur Ermittlung der

Standardkurve wurde der PLHV-3-Standard pTOPO-gB in 10-fach Verdünnungen ($1 \cdot 10^5$ Kopien/ μ l) in der real time-PCR eingesetzt und die C_T -Werte gemessen. Neben der PLHV-3-Kopienzahl wurde β 2-Microglobulin als zelluläres Referenzgen in den Zellproben quantifiziert. Als Standard wurde das Plasmid pTOPO-B2MG verwendet, das ebenfalls in 10-fach Verdünnungsstufen in der real time-PCR eingesetzt wurde. In Abbildung 49 sind die Standardkurven zur Ermittlung der gB- bzw. β 2-Microglobulin-Kopienzahl dargestellt. Der Anstieg der Regressionsgeraden diente zur Berechnung der PCR-Effizienz, die mit Werten um 2 nahe dem theoretischen Optimum lagen.

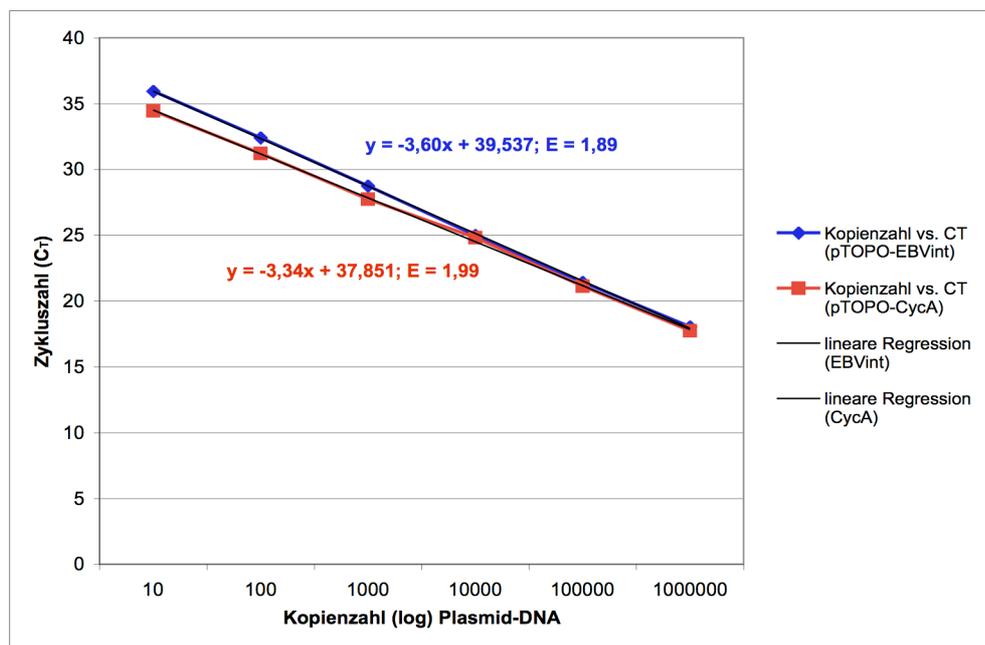


Abb. 49: Standardkurven des Zielgens (gB) bzw. des Referenzgens (B2MG) zur Ermittlung der PLHV-3-Kopienzahl. Die Plasmide pTOPO-gB bzw. pTOPO-B2MG wurden in 10-fach-Verdünnungen ($10 \cdot 10^6$ Kopien/Ansatz) in der real time-PCR eingesetzt und ein Teil des orf08/gB-Gens (blau) bzw. von β 2-Microglobulin (rot) in jeder Probe amplifiziert. Als Maß für die amplifizierte DNA-Menge in jeder Probe wurde der C_T -Wert angegeben, der den PCR-Zyklus charakterisiert, bei dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal einen bestimmten Schwellenwert übertritt. Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden wurde die PCR-Effizienz (E) ermittelt. Aus den Gleichungen der Geraden und dem entsprechenden C_T -Wert einer Probe wurde die in der Probe enthaltene PLHV-3-Kopienzahl bzw. β 2-Microglobulin-Kopienzahl ermittelt.

Nach Normalisierung der erhaltenen PLHV-3-Kopienzahlen auf die jeweilige β 2-Microglobulin-Kopienzahl in den Zellproben wurde die Kopienzahl der Negativkontrolle (pCR-NS) dem Wert 1 eingesetzt. Die normalisierten Kopienzahlen der TPA-stimulierten Zellen wurden auf die normalisierten Kopienzahlen der unstimulierten Zellen bezogen, die ebenfalls dem Wert 1 gleichgesetzt wurden. Die PLHV-3-Kopienzahlen in den Überständen wurde zunächst pro ml ermittelt und anschließend auf die Zellzahl bezogen. Die normalisierten Kopienzahlen aller Proben aus den Zellen und Überständen wurden auf die der entsprechenden Negativkontrollen bezogen, um die relative Erhöhung der PLHV-3-Kopienzahl über der Negativkontrolle darzustellen. Die Transfektion der PLHV-1- bzw. EBV-Expressionsplasmide führten weder in den Zellen noch in den Überständen zu einer

verstärkten Produktion von PLHV-3 (Abb. 50 A). Auch die durch TPA nach vier Tagen induzierte ca. 2-fache Viruskopienzahl im Überstand ist gegenüber der Kontrolle zu vernachlässigen (Abb. 50 B).

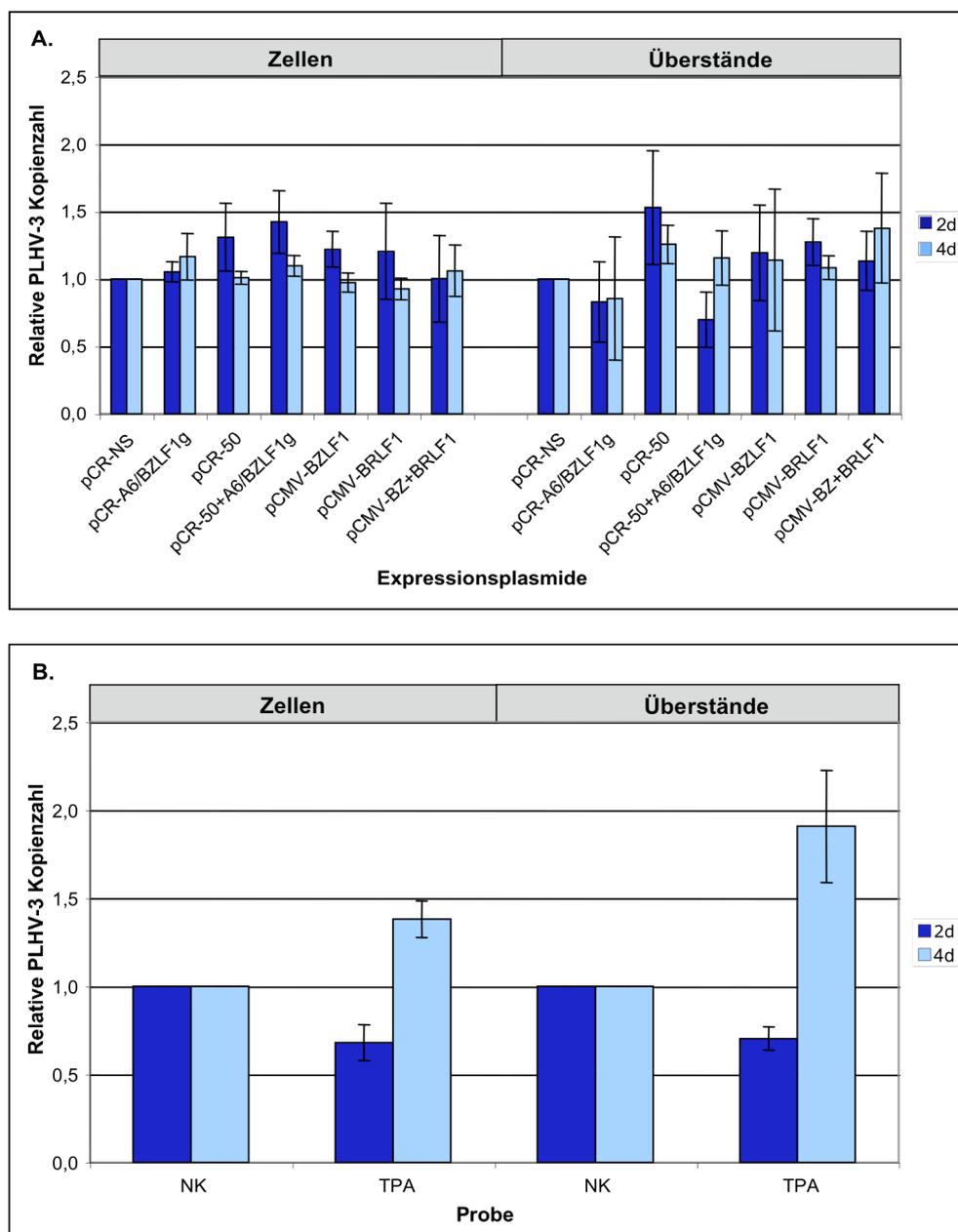


Abb. 50: Stimulation von PLHV-3 in L23-Zellen nach Transfektion von Expressionsplasmiden (A) bzw. nach chemischer Induktion (B). L23-Zellen wurden mit den oben aufgeführten Expressionsplasmiden (A) transfiziert oder mit TPA (B) induziert. Nach zwei bzw. vier Tagen erfolgte die Ernte der Zellen bzw. die Abnahme der Überstände. Nach Extraktion der viralen DNA wurde mit den Primern 1156s/as ein Teil des gB-ORFs als Maß für die PLHV-3-Genomvermehrung mittels real time-PCR quantifiziert. Als Negativkontrolle dienten entweder L23-Zellen, die mit dem Plasmid pCR-NS (A) transfiziert wurden oder unstimulierte Zellen (B). Neben der Quantifizierung des gB-ORFs wurde β 2-Microglobulin mit den Primern 059s/as als zelluläres Referenzgen quantifiziert. Die normalisierten PLHV-3-Kopienzahlen jeder Probe wurden auf die jeweilige normalisierte Kopienzahl der Kontrolle bezogen, die dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Weder die Expression der PLHV-1-Proteine ORF50, ORFA6/BZLF1_h oder beider PLHV-1-Proteine bzw. die Expression der EBV-Proteine BZLF1, BRLF1 oder beider EBV-Proteine führte zu einer signifikanten Reaktivierung von PLHV-3 mit vermehrter Virusproduktion in L23-Zellen.

5.2.8.4 Versuche zur Virusreaktivierung mittels Kokultivierung

Zur Anwendung kamen die PLHV-3 latent infizierte B-Zelllinie L23 und die EBV-positive Krallenaffen-B-Zelllinie B95-8. In bisherigen Versuchen konnte PLHV-3 in L23-Zellen nicht reaktiviert werden. In diesem Versuch wurde die potentielle Reaktivierung von PLHV-3 durch EBV untersucht. In einem Teil der B95-8-Zellen befindet sich EBV immer in der produktiven, lytischen Phase, so dass eine potentielle Reaktivierung von PLHV-3 durch infektiöse EBV-Partikel gewährleistet ist. Dazu wurden jeweils 1×10^6 L23-Zellen und 1×10^6 B95-8-Zellen kokultiviert. Als Positivkontrolle dienten L23- bzw. B95-8-Zellen, die mit TPA stimuliert wurden. Unstimulierte L23- bzw. B95-8-Zellen dienten als Negativkontrolle. Parallel dazu erfolgte die Kokultivierung unter Zugabe von TPA, um die lytische EBV-Replikation zu maximieren und damit eine eventuelle Reaktivierung von PLHV-3 zu erreichen. Nach zwei bzw. vier Tagen erfolgte die Extraktion der DNA aus Zellen und Überständen und die Ermittlung der Viruskopienzahlen. Die Berechnung der EBV- bzw. PLHV-3-Kopienzahlen in den Zellproben erfolgte wie unter 5.2.8.2 bzw. 5.2.8.3 beschrieben. Für die Ermittlung der Viruslast in den Überständen wurde die absolute EBV- bzw. PLHV-3-Kopienzahl pro ml Überstand berechnet. Die Viruskopienzahl wurde hier nicht auf die Zellzahl bezogen, da bei einer Kokultivierung nicht zwischen den verschiedenen Zelllinien unterschieden werden konnte.

Die Ergebnisse der Kokultivierung von B95-8- und L23-Zellen sind in Abbildung 51 dargestellt. Weder nach zwei noch nach vier Tagen konnte in den L23-Zellen eine vermehrte PLHV-3-Produktion festgestellt werden (Abb. 51 A). Auch in den Überständen der kokultivierten L23-Zellen wurde keine Steigerung der PLHV-3-Kopienzahl gemessen (Abb. 51 B). In Übereinstimmung mit vorherigen Versuchen führte auch die Zugabe von TPA zu keiner Reaktivierung von PLHV-3 in den L23-Zellen. Im Gegensatz dazu wurde in den TPA-stimulierten B95-8-Zellen nach zwei Tagen eine ca. 4-fache Steigerung in der EBV-Kopienzahl ermittelt, die sich nach vier Tagen auf das ca. 6-fache der Negativkontrolle erhöhte (Abb. 51 A). In den Überständen dieser Proben steigerte sich die EBV-Viruslast von ca. 2-fach auf ca. 8-fach nach vier Tagen (Abb. 51 B). Diese Tendenzen stimmen gut mit den bereits ermittelten Ergebnissen aus Abschnitt 5.2.8.2 überein. Die Kokultivierung von B95-8-Zellen mit L23-Zellen führte ebenfalls zu keiner vermehrten EBV-Produktion in den Zellen oder Überständen (Abb. 51 A, B). Die zusätzliche Gabe von TPA führte zu einer ähnlichen

Steigerung der EBV-Kopienzahlen in den Zellen und Überständen wie es für die TPA-induzierten B95-8-Zellen gezeigt wurde.

Durch Kokultivierung von L23- und B95-8-Zellen konnte weder eine Reaktivierung von PLHV-3 noch von EBV induziert werden.

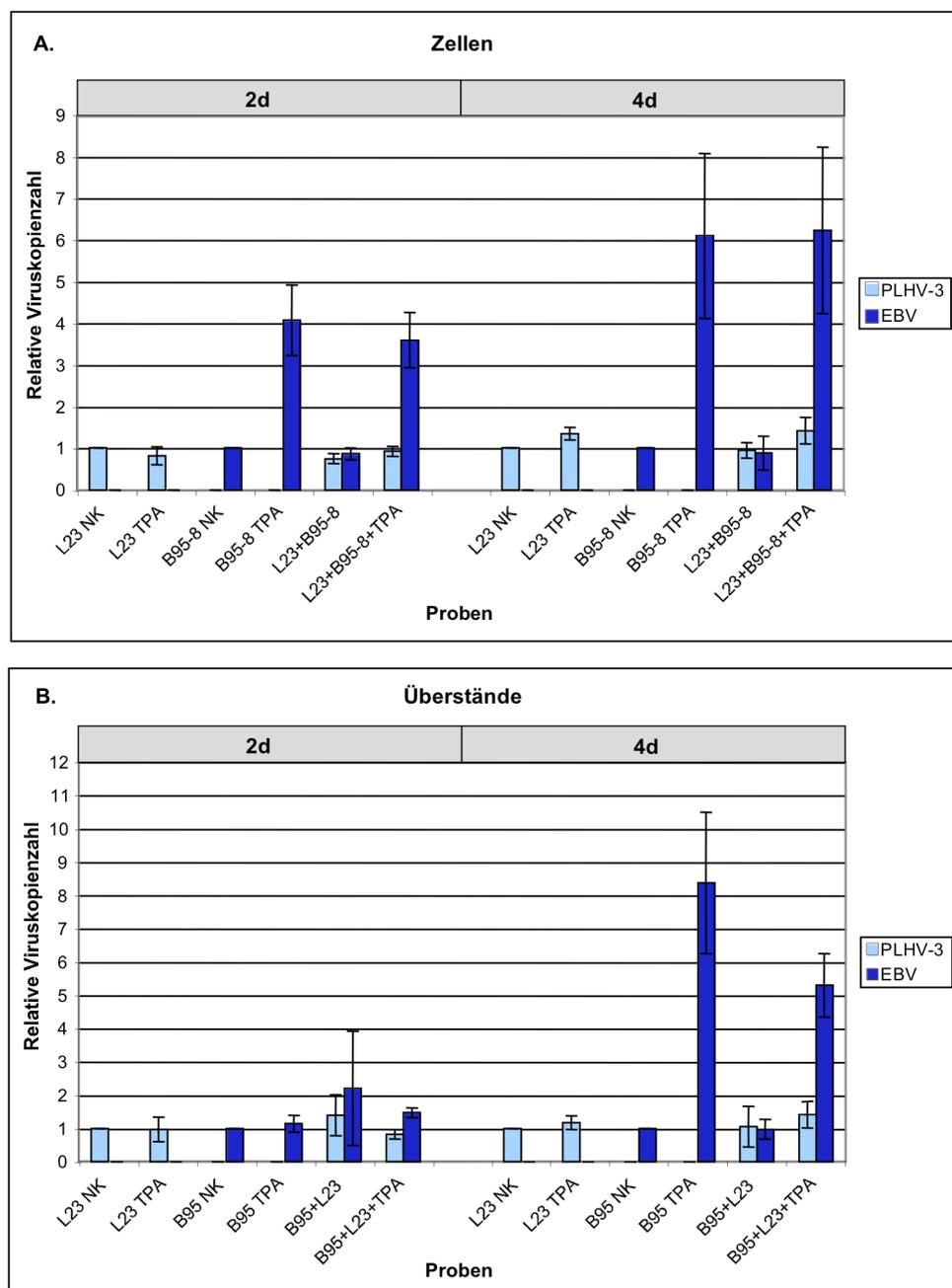


Abb. 51: Ergebnisse der Virusreaktivierung nach Kokultivierung von L23- bzw. B95-8-Zellen. PLHV-3-positive L23-Zellen wurden mit EBV-positiven B95-8-Zellen kokultiviert. Als Positivkontrolle dienten L23- bzw. B95-8 Zellen, die mit TPA stimuliert wurden. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach zwei bzw. vier Tagen erfolgte die Ernte der Zellen bzw. die Abnahme der Überstände mit nachfolgender Extraktion der viralen DNA. Mittels real time-PCR erfolgte die Quantifizierung von PLHV-3 bzw. EBV in Zellen (A.) bzw. Überständen (B.). Dabei wurde gB als PLHV-3-Gen bzw. die intergenische EBV-Region als Maß für die PLHV-3- bzw. EBV-Genomvermehrung quantifiziert. Nach Normalisierung der Viruskopienzahlen auf die entsprechenden Referenzgenkopienzahlen wurden die Viruskopienzahlen der Negativkontrollen dem Wert 1 gleichgesetzt. Die normalisierten PLHV-3- bzw. EBV-Kopienzahlen jeder Probe wurden auf die jeweilige normalisierte Kopienzahl der Kontrolle bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

6. Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es, die Funktion putativer *immediate early*-Proteine von PLHV-1 näher zu charakterisieren. Die herpesviralen *immediate early*-Proteine sind molekulare Schalter für den Übergang von der Latenz in die lytische Replikationsphase. Durch die Charakterisierung solcher Proteine besteht die Möglichkeit, Untersuchungen zur Reaktivierung von Herpesviren aus der Latenz durchzuführen und Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Herpesviren zu studieren. Schon in der Alлотransplantation führt die Reaktivierung von Herpesviren zu Komplikationen im transplantierten Patienten. Bedingt durch die Immunsuppression können ruhende Herpesviren wie z.B. HCMV, HHV-6, EBV reaktiviert werden, die ernsthafte Sekundärerkrankungen wie z.B. Pneumonie oder Enzephalitis im Patienten auslösen können und zu einer vorzeitigen Abstoßung des Transplantates führen können (Razonable & Paya, 2002; Singh, 2005). Darüber hinaus entwickeln Herpesviren ihr pathogenes Potenzial oft erst nach Übertragung auf eine andere Spezies. PLHV-1 stellt daher ein mögliches Zoonoserisiko für den immunsupprimierten Patienten dar. Die Erkenntnisse zu den Reaktivierungsmechanismen sollten zudem genutzt werden, ein Zellkultursystem für die PLHV aufzubauen, um infektiöse Viruspartikel in der Zellkultur zu gewinnen. Dies bietet die Möglichkeit, die biologischen Eigenschaften der Viren in Infektionsversuchen mit humanen Zelllinien oder virusfreien Tieren zu untersuchen. Transaktivierungsstudien mit heterologen Promotoren sollten außerdem Hinweise darauf ergeben, ob eine Reaktivierung zwischen verschiedenen Herpesviren möglich ist. Bei einer Xenotransplantation wären potentielle Interaktionen zwischen porcinen Herpesviren wie PLHV-1 mit anderen im Patienten persistierenden Herpesviren wie z.B. VZV, HHV-6, HCMV, EBV oder HHV-8 vorstellbar (Mueller & Fishman, 2004). Über 90% der menschlichen Population ist beispielsweise mit HHV-6 und EBV infiziert. In Folge von Reaktivierungen könnten kritisch verlaufende Sekundärinfektionen die Gesundheit des Organrezipienten und den Erfolg der Transplantation gefährden. Durch Rekombination könnten schließlich neue Virusspezies mit humanpathogenen Eigenschaften entstehen. Diese Untersuchungen sollten einen Beitrag zur Abschätzung des Gefährdungspotentials von PLHV-1 in der Xenotransplantation leisten.

6.1 Auswahl der Regulatorproteine und Promotoren

Im Genom von PLHV-1 wurden zwei Gene (orfA6/BZLF1_h, orf50) identifiziert, die Homologie zu den bekannten Transaktivatorgenen des EBV (orfBRLF1 und orfBZLF1) bzw. des HHV-8 (orf50 und orfK-bzip) zeigen. Die Genprodukte wirken als essentielle Regulatorproteine für den Übergang von der Latenz in die lytische Replikationsphase von EBV bzw. HHV-8 (Sun et al., 1998; Countryman & Miller, 1985; Ragoczy et al., 1998). In HHV-8 wurde K-bzip als

BZLF1-homologes Protein identifiziert, dessen Überexpression in latent HHV-8-infizierten Zellen nicht zu einer Reaktivierung von HHV-8 führt (Lin et al., 1999; Polson et al., 2001). PLHV-1 orf57 wurde als drittes Gen identifiziert, das Übereinstimmungen zu den orf57-homologen Genen in EBV (orfBMLF1) und HHV-8 (orf57) zeigt. In EBV und HHV-8 wirkt ORF57 vorrangig als posttranskriptionaler Aktivator.

Die Analyse der Aminosäuresequenz der PLHV-1-Proteine ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57 zeigte bereits viele strukturelle Übereinstimmungen mit den homologen Proteinen aus anderen γ -Herpesviren (Abschnitte 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3). Neben diesen Sequenz- und Strukturhomologien sollte geklärt werden, ob funktionelle Ähnlichkeiten zu den homologen Proteinen aus EBV und HHV-8 bestehen. In Reporterstudien sollte die potentielle Funktion von PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57 als Transkriptionsaktivator untersucht werden. Dazu wurden die PLHV-1-Promotoren der putativen, *immediate early*-Gene orfA6/BZLF1_h, orf50, der *early*-Gene orf57, orf59, orf09/DNA-Polymerase und des *late*-Gens orf08/Glykoprotein B (gB) in Reportervektoren kloniert. Deren entsprechende Promotoren in EBV und HHV-8 werden bis auf wenige Ausnahmen durch HHV-8 ORF50 bzw. EBV BRLF1 und BZLF1 aktiviert.

6.2 Prüfung der Funktionalität der ausgewählten PLHV-1-Regulatoren

Zur Kontrolle der Funktionalität der verwendeten Expressionsplasmide pCR-50, pCR-A6/BZLF1g bzw. pCR-A6/BZLF1sp und pCR-57 wurde die Transkription der klonierten, viralen Gene mittels RACE-PCR überprüft. Nach der Transfektion der Plasmide in 293-Graham-Zellen konnten alle viralen Transkripte nachgewiesen werden. Die mittels RACE-PCR erhaltenen Amplifikate stimmten mit den berechneten Größen überein.

Da der ORF50 als Flag-Fusionsprotein nicht zur Expression gebracht werden konnte, wurde sowohl die gespleißte als auch die genomische Variante von orf50 in den Vektor pCMV-myc kloniert. Beide Klone führten zur Expression von ORF50. Das mit einem c-Myc-tag markierte ORF50-Protein konnte mit einer Hauptproteinbande bei ca. 72 kDa im Westernblot detektiert werden. Diese Größe weicht ungefähr um 12 kDa von der mittels MacVector errechneten Proteingröße von 60,3 kDa ab. Dieser Größenunterschied könnte durch posttranslationale Modifikationen am Protein verursacht sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass das homologe Protein HHV-8 ORF50 an multiplen Phosphorylierungsstellen (Serin- und Threoninreste) am C-Terminus durch Proteinkinasen phosphoryliert wird (Lukac et al., 1999; Gwack et al., 2003). Diese Modifikationen führen zu einer Abweichung von mehr als 30 kDa vom vorhergesagten Molekulargewicht. Während für HHV-8 ORF50 eine Größe von 73,7 kDa vorhergesagt wurde, lag die tatsächliche Größe im Westernblot bei 110 kDa. Neben der beschriebenen Hauptproteinbande von PLHV-1 ORF50 wurde eine schwächere Bande bei ca. 38 kDa ermittelt. Da diese Proteinbande nach wiederholter Expression des Proteins

unterschiedlich stark im SDS-Gel vertreten war, könnte es sich um ein Abbauprodukt handeln. Darüber hinaus könnte es sich auch um eine zweite Spleißvariante von ORF50 handeln, die bereits mittels RACE-PCR identifiziert wurde (Lindner et al., 2007).

Die Transfektion von Zellen mit den Plasmiden pCRA6/BZLF1sp-HAn bzw. pCRA6/BZLF1sp-HAc führte zu keiner Expression von ORFA6/BZLF1_h. Dies stimmt mit Ergebnissen des Luziferase-Reportergenassay überein, indem keine Transkriptionsaktivität der klonierten gespleißten ORFA6/BZLF1_h-Variante festgestellt wurde. Mittels RACE-PCR wurde allerdings die Transkription des gespleißten orfA6/BZLF1_h gezeigt, wenn Zellen mit dem Konstrukt pCR-A6/BZLF1sp transfiziert wurden. Es gibt jedoch Hinweise, dass der Spleißprozess der prä-mRNA für eine nachfolgende, effiziente Proteinexpression notwendig ist (Huang & Gorman, 1990). Dies könnte erklären, warum die gespleißte Form des orfA6/BZLF1_h zu keiner nachweisbaren Proteinexpression führte.

Die genomische Variante des ORFA6/BZLF1_h-Proteins wurde mit einem Hämagglutinin-tag am N- bzw. C-Terminus markiert und die Expression der Fusionsproteine im Westernblot untersucht. Die Größen der Proteine von ca. 24 kDa (N-terminal) bzw. 22 kDa (C-terminal) stimmten gut mit den mittels MacVector errechneten Molekulargewichten von ca. 22 kDa überein. Dies könnte daraufhin deuten, dass das ORFA6/BZLF1_h-Protein möglicherweise nicht posttranslational modifiziert ist. Im Gegensatz dazu wurden bei den ORFA6/BZLF1_h-homologen Proteinen in HHV-8 bzw. EBV Abweichungen zwischen vorhergesagtem und tatsächlichem Molekulargewicht festgestellt. Während für HHV-8 K-bzip eine Größe von ca. 27 kDa vorhergesagt wurde, lag die tatsächliche Größe im SDS-Gel bei 37 kDa. Dieser Größenunterschied wird durch posttranslationale Modifikationen wie z.B. der Phosphorylierung des Proteins am Serinrest 167 ausgelöst (Polson et al., 2001). EBV BZLF1 besitzt ein Molekulargewicht von 40-42 kDa und ist an mehreren Serin-(S186, S167) und Threoninresten (T159) phosphoryliert (Daibata et al., 1992; Baumann et al., 1998; El-Guindy & Miller, 2006). Die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren ist ein wichtiger Mechanismus, die Transkriptionsaktivität dieser Proteine zu regulieren (El-Guindy & Miller, 2004). HHV-8 K-bzip und EBV BZLF1 sind außerdem sumoylierte Proteine (Adamson & Kenney, 2001; Izumiya et al., 2005). SUMO-1 (*small ubiquitin-related modifier 1*) ist ein kleines zelluläres Protein, das über spezifische Lysinreste an Proteine gebunden wird. Eine SUMO-Modifikation konnte auch für die zellulären Proteine c-Jun und p53 gezeigt werden (Muller et al., 2000). Die Sumoylierung kann die Lokalisation, die Stabilität und die transkriptionale Aktivität von Proteinen beeinflussen.

Zur Detektion von ORF57 im Westernblot wurde das Protein ebenfalls am N- bzw. C-Terminus mit einem Hämagglutinin-tag markiert. Mittels Westernblot konnte die Expression von N- und C-terminal markierten ORF57-Protein nachgewiesen werden. Die Proteine mit einer molekularen Masse von 57 bzw. 54 kDa stimmten gut mit denen mittels MacVector

errechneten Größen von ca. 51 kDa überein und liegen im Größenbereich bekannter homologer ORF57-Proteine. Das ORF57-homologe Protein aus HHV-8 hat eine Größe von ca. 50 kDa und ist phosphoryliert. EBV BMLF1 ist ebenfalls ein phosphoryliertes Polypeptid mit einer molekularen Masse von ca. 53 kDa (Cook et al., 1994).

Die Analyse der Aminosäuresequenz der PLHV-1-Proteine ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57 zeigte, dass alle Proteine ein oder mehrere Kernlokalisierungssignale enthalten. In Übereinstimmung mit den homologen Proteinen aus EBV und HHV-8 konnte mittels Immunfluoreszenz die Lokalisation der PLHV-1-Proteine im Zellkern gezeigt werden. Die PLHV-1-Proteine befanden sich immer außerhalb der Nukleoli.

6.3 Transkriptionsaktivität von PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57

PLHV-1 ORF50 führte mit Ausnahme seines eigenen Promotors zu einer starken Aktivierung der PLHV-1-Promotoren in 293-Graham- und PK15-Zellen. Dabei waren die Aktivierungsraten in 293-Graham-Zellen (5-289-fach) ca. 2-fach höher als in PK15- (3-134-fach) und IPAM-Zellen (2-29-fach). Diese Unterschiede können nicht auf unterschiedliche Transfektionseffizienzen in den Zelllinien zurückgeführt werden, da alle Luziferasewerte auf die entsprechenden β -Galactosidasewerte bezogen wurden. Die unterschiedlichen Aktivierungsraten in 293-Graham-, PK15- und IPAM-Zellen liegen wahrscheinlich in der Präsenz von spezifischen, zellulären Faktoren begründet, die in 293-Graham-Zellen die Transaktivierung der Promotoren verstärken. Daneben könnten diese Effekte auch zelllinienspezifisch oder speziebedingt sein. Die konzentrationsabhängige Transaktivierung der Promotoren *orf50*, *orfA6/BZLF1_h*, *orf57* und *orf59* bestätigte, dass die Stärke der Aktivierung der PLHV-1-Promotoren direkt mit der Konzentration von PLHV-1 ORF50 korreliert ist. Betrachtet man die Stärke der Transaktivierungen der verschiedenen PLHV-1-Promotoren, so lassen sich einige Gemeinsamkeiten zur Aktivierung der entsprechenden Promotoren in HHV-8 und EBV durch die ORF50-homologen Proteine erkennen. Tabelle 22 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Transaktivierung von PLHV-1-, EBV- und HHV-8-Promotoren durch die entsprechenden ORF50-homologen Proteine aus PLHV-1, EBV und HHV-8. Die Aktivierungsraten sind nicht direkt vergleichbar, da die Daten mit Ausnahme von PLHV-1 aus Publikationen stammen, die unterschiedliche Zelllinien verwendet haben. Dennoch sind signifikante Effekte erkennbar. Die starke Aktivierung des *orfA6/BZLF1_h*-bzw. *orf57*-Promotors durch PLHV-1 ORF50 wurde beispielsweise auch für die homologen ORF50-Proteine aus HHV-8 und EBV gezeigt. Sowohl HHV-8 ORF50 als auch EBV BRLF1 führte zu einer starken Induktion der Promotoraktivität der entsprechenden Gene *orfK-bzip/BZLF1* bzw. *orf57/BMLF1* (Lukac et al., 1999; Lukac et al., 2001; Byun et al., 2002; Adamson et al., 2000; Holley-Guthrie et al., 1990).

Tabelle 22: Aktivierung von PLHV-1-, EBV- bzw. HHV-8-Promotoren durch die homologen ORF50-Proteine aus PLHV-1, EBV bzw. HHV-8

Homologer Promotor in PLHV-1, EBV bzw. HHV-8	Induktion der Promotoraktivität durch die ORF50-homologen Proteine aus		
	PLHV-1	EBV	HHV-8
p_orf50	+	(+)++	+
p_orfA6/BZLF1 _h	++++	++	++++
p_orf57	++	++++	++
p_orf59	+++	++++	++
p_orf09/DNA-Polymerase	++	++	+
p_orf08/gB	++++	+++	++++

+ schwach (bis 5-fach)
 ++ mittel (5-50-fach)
 +++ stark (50-100-fach)
 ++++ sehr stark (> 100-fach)

Quellen: Holley-Guthrie et al., 1990; Ragoczy et al., 1998; Lukac et al., 1999; Lukac et al., 2001; Adamson et al., 2000; Feederle et al., 2000; Byun et al., 2002

Die in PLHV-1, HHV-8 und EBV beobachtete Stimulation der orfK-bzip- bzw. orf57-homologen Gene spricht für einen Aktivierungsmechanismus, der in γ -Herpesviren konserviert sein könnte. Die Aktivierung des orf59-Promotors durch PLHV-1 ORF50 ist auch für EBV BRLF1 und HHV-8 ORF50 belegt (Ragoczy et al., 1998; Lukac et al., 1998). Der ORF59 ist in EBV (BMRF1) und HHV-8 (ORF59) eine Komponente der aktiven DNA-Polymerase und damit essentiell für die virale DNA-Replikation. Die geringe Autostimulation des PLHV-1 orf50-Promotors durch PLHV-1 ORF50 stimmt ebenfalls mit Ergebnissen der Autoregulation von HHV-8 ORF50 und EBV BRLF1 überein (Byun et al., 2002; Zalani et al., 1992). Allerdings ist die Stärke der Autoregulation durch EBV BRLF1 etwas höher im Vergleich zu PLHV-1 bzw. HHV-8 ORF50 (Tab. 22). Die Aktivierung der DNA-Polymerase bzw. des Glykoprotein B (gB) durch PLHV-1 ORF50 korreliert mit Reporterstudien aus EBV und HHV-8. EBV BRLF1 stimuliert indirekt die Expression der DNA-Polymerase (BALF5) bzw. die des Glykoproteins gp350 (Liu et al., 1996; Feederle et al., 2000). Die sehr starke Induktion der gB-Promotoraktivität wurde auch für HHV-8 ORF50 gezeigt (Damania et al., 2004). Die ORF50-vermittelte Aktivierung von Genen verläuft in HHV-8 und EBV entweder direkt über *Rta-response elements* (RRE) oder indirekt unter Beteiligung von zellulären Transkriptionsfaktoren (siehe Abschnitt 2.5.1.1). Da Bindungsstudien (EMSA) für PLHV-1 ORF50 an die Promotorsequenzen nicht durchgeführt wurden, kann eine Aussage zur Art der Aktivierung der PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORF50 nicht getroffen werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Aktivierung der PLHV-1-Promotoren auch entweder über direkte Bindung von ORF50 an spezifische RRE-ähnliche Bindemotive oder aber indirekt unter Beteiligung von zellulären Faktoren erfolgt. Die Ergebnisse zeigen, dass

PLHV-1 ORF50 ein starker Transkriptionsaktivator von PLHV-1-Promotoren ist, welche die Expression wichtiger früher und später Proteine kontrollieren.

Im Vergleich zu EBV BZLF1 und HHV-8 K-bzip nimmt PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h eine mittlere Stellung ein. Während EBV BZLF1 als starker Transkriptionsaktivator von lytischen EBV-Genen wirkt, konnte für HHV-8 K-bzip keine direkte Aktivierung von HHV-8-Promotoren gezeigt werden (Lacoste et al., 2004). Dagegen führte PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h zu einer moderaten Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren, die in 293-Graham-Zellen eine ca. 3-8-fache Aktivierungsrate erreichte. Eine Übersicht zur Transaktivierung der entsprechenden PLHV-1-, EBV- und HHV-8-Promotoren durch die ORFA6/BZLF1_h-homologen Proteine aus PLHV-1, EBV und HHV-8 zeigt Tabelle 23. Die Daten zu EBV und HHV-8 wurden unterschiedlichen Veröffentlichungen entnommen und können aufgrund unterschiedlicher Zellsysteme nicht direkt verglichen werden. Signifikante Unterschiede sind dennoch gut erkennbar.

Tabelle 23: Aktivierung von PLHV-1-, EBV- bzw. HHV-8-Promotoren durch die homologen ORFA6/BZLF1_h-Proteine aus PLHV-1, EBV bzw. HHV-8

Homologer Promotor in PLHV-1, EBV bzw. HHV-8	Induktion der Promotoraktivität durch die ORFA6/BZLF1 _h -homologen Proteine aus		
	PLHV-1	EBV	HHV-8
p_orf50	+	++	-
p_orfA6/BZLF1 _h	++	+	-
p_orf57	+	+	-
p_orf59	+	+++	-
p_orf09/DNA-Polymerase	+	+	-
p_orf08/gB	+	+++	-

- keine Aktivierung
- + schwach (bis 5-fach)
- ++ mittel (5-10-fach)
- +++ stark (über 50-fach)

Quellen: Flemington & Speck, 1990a; Holley-Guthrie et al., 1990; Feederle et al., 2000; Liu & Speck, 2003

Die beobachtete Autostimulation des orfA6/BZLF1_h-Promotors durch PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h wurde auch für EBV BZLF1 beschrieben (Flemington & Speck, 1990). Die Aktivierung der PLHV-1-Promotoren orf50, orf57 und orf59 durch ORFA6/BZLF1_h stimmen ebenfalls mit Ergebnissen aus Reporterstudien mit EBV BZLF1 überein. EBV BZLF1 bindet direkt an ZRE in den Promotoren der EBV-Gene orfBRLF1, orfBMLF1 und orfBMRF1 und führt nachfolgend zu deren Aktivierung (Liu & Speck, 2003; Kenney et al., 1989; Holley-Guthrie et al., 1990; Kolman et al., 1996). Die Stimulation der Expression der DNA-

Polymerase (BALF5) und gB (BALF4) aus EBV wurde ebenfalls für EBV BZLF1 gezeigt (Feederle et al., 2000). In PK15-Zellen wurden mit ORFA6/BZLF1_h deutlich niedrigere Aktivierungsraten als in 293-Graham-Zellen ermittelt. Dagegen wurde in IPAM-Zellen keine Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren durch ORFA6/BZLF1_h festgestellt. Die in 293-Graham-Zellen deutlich erhöhten Aktivierungsraten sind wie bereits erwähnt wahrscheinlich zelltyp- oder speziesspezifisch. Die konzentrationsabhängige Aktivierung der PLHV-1-Promotoren orf50, orfA6/BZLF1_h, orf57 und orf59 zeigte auch hier, dass die Stärke der Aktivierung dieser Promotoren mit der Konzentration von ORFA6/BZLF1_h korreliert. Da eine Bindung von ORFA6/BZLF1_h an die PLHV-1-Promotoren nicht untersucht wurde, kann auch hier keine Aussage zur Art der Aktivierung der PLHV-1-Promotoren getroffen werden. Sie könnte entweder direkt über ZRE-ähnliche Bindemotive für ORFA6/BZLF1_h oder über zelluläre Proteine vermittelt werden.

PLHV-1 ORF57 führte nicht zu einer Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren. Dies ist übereinstimmend mit Ergebnissen aus HHV-8 und EBV, in denen die ORF57-homologen Proteine kaum oder keine transaktivierenden Eigenschaften besitzen. In HHV-8 wurde eine sehr geringe (2-fach) Transaktivierung von verschiedenen HHV-8-Promotoren ermittelt (Kirshner et al., 2000). Untersuchungen von EBV BMLF1 und HVS ORF57 zeigten, dass die ORF57-vermittelte Akkumulation von Transkripten im Zytoplasma von der An- bzw. Abwesenheit von Introns abhängt (Ruvolo et al., 1998; Whitehouse et al., 1998). Dabei fördert ORF57 die Expression meist viraler Transkripte, die keine Introns enthalten, in dem es den zytoplasmatischen Transport dieser mRNAs vermittelt. In Folge werden solche Transkripte verstärkt translatiert (Whitehouse et al., 1998). Auch HHV-8 ORF57 wirkt zusammen mit zellulären Proteinen als RNA-transportierendes Protein (Malik et al., 2004b). Experimente, inwieweit PLHV-1 ORF57 den Transport von mRNAs beeinflusst, wurden nicht durchgeführt.

6.4 PLHV-1-Promotoraktivität bei Koexpression von ORF50 und ORFA6/BZLF1_h

Aus vorangegangenen Reporterstudien ging hervor, dass PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h in unterschiedlicher Stärke zu einer Aktivierung von PLHV-1-Promotoren führten. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Koexpression von beiden Proteinen zu einer synergistischen Aktivierung der PLHV-1-Promotoren führen sollte, da beide Proteine offenbar direkt oder indirekt die Transkription der viralen PLHV-1 Gene bewirken. In EBV werden beispielsweise die Promotoren der EBV-Gene orfBMRF1 und orfBRLF1 durch BZLF1 und BRLF1 synergistisch aktiviert (Quinlivan et al., 1993; Liu & Speck, 2003). Koexpressionsexperimente in 293-Graham-Zellen zeigten allerdings, dass der ORFA6/BZLF1_h promotorabhängig die Transkriptionsaktivität von ORF50 beeinflusst

(Abschnitt 5.2.4.1). Bei Koexpression von ORF50 und ORFA6/BZLF1_h wurde eine konzentrationsabhängige Reduktion in der ORF50-vermittelten Aktivierung der Promotoren orfA6/BZLF1_h, orf57 und orf59 beobachtet (Tab. 24). Dagegen führte die alleinige Expression von ORF50 zu einer starken Aktivierung der PLHV-1-Promotoren. Im Gegensatz dazu wurde bei simultaner Expression von ORF50 und ORFA6/BZLF1_h nur eine leichte Kostimulation des orf50-Promotors gemessen (Tab. 24). Es ist nicht davon auszugehen, dass die Ergebnisse einem Titrationseffekt zu Grunde liegen, da in Abhängigkeit des Promotors unterschiedliche Effekte gemessen wurden.

Tabelle 24: Einfluss von PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h auf das Transaktivierungspotential von ORF50 in 293-Graham-Zellen

PLHV-1-Promotor	<i>x-fache Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren durch</i>		
	ORF50 (300 ng)	ORFA6/BZLF1 _h (300 ng)	ORF50 + ORFA6/BZLF1 _h (je 300 ng)
pGL-pA6	159 ± 39	3,3 ± 0,2	37 ± 10 ↓
pGL-p50	4,5 ± 0,5	3,6 ± 0,3	5 ± 0,8 ↑
pGL-p57	31 ± 6	2,3 ± 0,5	27 ± 5 ↓
pGL-p59	136 ± 43	3 ± 0,2	54 ± 8 ↓

↓ Reduktion der Promotoraktivität

↑ Stimulation der Promotoraktivität

Die Daten wurden dem Ergebnisteil 5.2.4.1 Abbildungen 28 A, C und 29 A, C entnommen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse zeigen, dass ORFA6/BZLF1_h als Antagonist bei der ORF50-vermittelten Induktion einiger PLHV-1-Promotoren wirkt. ORFA6/BZLF1_h könnte das Transaktivierungspotential von ORF50 in Abhängigkeit des Promotors modulieren. In HHV-8 wird die ORF50-vermittelte Aktivierung von HHV-8-Promotoren ebenfalls durch das ORFA6/BZLF1_h-homologe Protein K-bzip beeinflusst. Bei Koexpression von HHV-8 ORF50 und K-bzip wurde die Transaktivierung der HHV-8-Promotoren orfK-bzip und orf57 konzentrationsabhängig gehemmt (Izumiya et al., 2003b; Liao et al., 2003). Die Aktivierung des PAN RNA-Promotors wurde dagegen nicht beeinflusst (Izumiya et al., 2003b). K-bzip stimuliert selbst keinen dieser HHV-8-Promotoren. Weitere Untersuchungen ergaben, dass K-bzip über seine Leucizipperdomäne direkt mit HHV-8 ORF50 interagiert (Liao et al., 2003). Bei HHV-8 ORF50 wurde die Aminosäureregion 499-550 am C-Terminus als interagierende Domäne identifiziert (Izumiya et al., 2003b). Für HHV-8 K-bzip wurde die Funktion als transkriptionaler Repressor der ORF50-vermittelten Genexpression postuliert (Izumiya et al., 2003b). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass HHV-8 K-bzip sumoyliert ist und diese Modifikation die Repressorfunktion von K-bzip vermittelt (Izumiya et al., 2005). Die Bindung von SUMO an K-bzip könnte zur Bindung von Histondeacetylasen

(HDAC) führen, die durch Modifikation der Chromatinstruktur die Transkriptionsaktivität von ORF50 vermindern. Neben der Bindung von SUMO fungiert K-bzip auch als Adaptermolekül für das E2 SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 (Izumiya et al., 2005). Ubc9 modifiziert ebenfalls die Chromatinstruktur, die den Transkriptionskomplex umgibt, so dass in Folge die Transkriptionsaktivität von HHV-8 ORF50 vermindert wird.

Ähnliche Ergebnisse sind für EBV BZLF1 ermittelt worden. Die SUMO-Modifikation von BZLF1 führte zu einer Hemmung in der Aktivierung des orfBMRF1- und orfBRLF1-Promotors (Adamson, 2005). BZLF1 hemmt außerdem die BRLF1-vermittelte Aktivierung des orfBLRF2- bzw. orfBHLF1-Promotors (Giot et al., 1991; Ragoczy & Miller, 1999). BRLF2 ist eine Komponente der Virionen und wird als spätes Gen exprimiert. Die Funktion des BHLF1-Proteins ist dagegen unbekannt (Gruffat et al., 1990). Die Repressorfunktion von BZLF1 wird außerdem durch die Phosphorylierung am Serinrest 173 und 167 vermittelt (El-Guindy & Miller, 2004).

Interessanterweise konnte die PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h induzierte Hemmung der Transkriptionsaktivität von ORF50 in PK15-Zellen nicht beobachtet werden (Abschnitt 5.2.4.2). Hier führte die Koexpression von ORF50 und ORFA6/BZLF1_h, unabhängig davon, welcher Transaktivator in gesteigerter Konzentration eingesetzt wurde, zu einer synergistischen Aktivierung der PLHV-1-Promotoren. Die unterschiedlichen Ergebnisse in den verwendeten Zelllinien deuten daraufhin, dass zelluläre Proteine beteiligt sind, die in PK15-Zellen fehlen oder inaktiv sind und somit die in 293-Graham-Zellen beobachtete Repressorfunktion von ORFA6/BZLF1_h nicht auftritt. Zelluläre Proteine können z.B. Proteinkinasen oder Phosphatasen sein, die den Phosphorylierungsgrad des Transkriptionsfaktors verändern und damit die Interaktionsfähigkeit mit anderen Proteinen beeinflussen. Somit wird reguliert, ob Koaktivatoren mit HAT-Aktivität, die die Transkription einleiten, oder Korepressoren mit HDAC-Aktivität, die die Transkription unterdrücken, am Promotor binden. Darüber hinaus könnten diese Effekte zelllinien- oder speziesspezifisch sein. Die Ergebnisse deuten an, dass PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h die Transkriptionsaktivität von ORF50 promotorabhängig beeinflusst. Damit könnte ORFA6/BZLF1_h als Modulator der Transkriptionsaktivität von ORF50 wirken und die ORF50-vermittelte Transkription fein regulieren. Die herpesvirale Genexpression erfolgt in einer strengen, zeitlichen Reihenfolge, in der die Expression von Genen in verschiedenen Phasen stimuliert bzw. reprimiert werden muß. Die Regulation der ORF50-vermittelten Genexpression ist daher essentiell für den erfolgreichen Ablauf des herpesviralen Replikationszyklus und der Produktion reifer Virionen.

6.5 PLHV-1-Promotoraktivität bei Koexpression von ORF57 und ORF50

Die Reporterstudien im homologen System ergaben, dass PLHV-1 ORF57 kein Transkriptionsaktivator ist. Diese Eigenschaft teilt es mit ORF57-homologen Proteinen aus

anderen Herpesviren wie EBV BMLF1, HHV-8 ORF57 oder HSV-1 ICP27, in denen es vorrangig als posttranskriptionaler Aktivator fungiert (Abschnitt 2.5.3.1). HHV-8 ORF57 beeinflusst außerdem die Transkriptionsaktivität von ORF50 in Abhängigkeit des Promotors. Bei Koexpression von HHV-8 ORF50 und ORF57 wurde die Aktivierung des PAN RNA-, Kaposin- und orf50-Promotors synergistisch verstärkt (Kirshner et al., 2000; Malik et al., 2004a). Im Gegensatz dazu wurde die Aktivität des Thymidinkinase-(TK) Promotors nicht beeinflusst (Kirshner et al., 2000). Die Verstärkung der Transkriptionsaktivität von ORF50 konnte später eindeutig auf eine Wechselwirkung zwischen ORF50 und ORF57 zurückgeführt werden (Malik et al., 2004a).

Die Experimente zur Aktivierung der PLHV-1-Promotoren orf50, orfA6/BZLF1_n, orf57 und orf59 bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORF57 zeigten, dass auch PLHV-1 ORF57 die Transkriptionsaktivität von ORF50 verstärkt (Tab. 25). Sowohl in 293-Graham-Zellen als auch in PK15-Zellen führte schon eine geringe Zugabe von ORF57 (150 ng) bei einer konstanten DNA-Menge von ORF50 (300 ng) zu einer synergistischen Aktivierung von verschiedenen PLHV-1-Promotoren gegenüber der singulären Stimulation durch ORF50. Dabei führte ORF57 allein nicht zu einer Induktion der PLHV-1-Promotoren.

Tabelle 25: Einfluss von PLHV-1 ORF57 auf das Transaktivierungspotential von ORF50 in 293-Graham-Zellen

PLHV-1-Promotor	<i>x-fache Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren durch</i>		
	ORF50 (300 ng)	ORF57 (300 ng)	ORF50 + ORF57 (je 300 ng)
pGL-pA6	108 ± 43	-	688 ± 162 ↑
pGL-p50	1,6 ± 0,1	-	2,7 ± 0,3 ↑
pGL-p57	15 ± 2	-	112 ± 4 ↑
pGL-p59	9 ± 2	-	40 ± 9 ↑

↑ Stimulation der Promotoraktivität

Die Daten wurden dem Ergebnisteil 5.2.5.1 Abbildungen 32 A, C und 33 A, C entnommen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

In beiden Zelllinien wurde besonders die Aktivierung des orfA6/BZLF1_n-Promotors bei Koexpression von ORF50 und ORF57 verstärkt, gefolgt von der Induktion des orf57- bzw. orf59-Promotors. Umso stärker die Transaktivierung durch ORF50 verläuft, umso höher scheint auch die synergistische Aktivierung durch ORF57 zu sein. Im Gegensatz dazu wurde der orf50-Promotor in beiden Zelllinien kaum oder nur sehr gering (2-3fach) bei Koexpression von ORF50 und ORF57 induziert. Dieser Promotor wird wiederum durch ORF50 auch nur sehr gering stimuliert. In 293-Graham-Zellen trat nach der anfänglichen, starken Aktivierung der Promotoren durch Zugabe von pCR-57 eine Reduktion in der Promotoraktivität aller getesteten PLHV-1-Promotoren auf (Abschnitt 5.2.5.1). Dieser Effekt könnte theoretisch einer Übertitrierung mit ORF57 zugrunde liegen, allerdings wurde im

gleichen Experimentansatz in PK15-Zellen keine Hemmung, sondern nur eine Stagnation in der Promotoraktivität beobachtet (Abschnitt 5.2.5.2). Somit kann ein inhibitorischer Effekt durch Übertitrierung weitgehend ausgeschlossen werden.

Diese unterschiedlichen Tendenzen in 293-Graham- und PK15-Zellen legen den Schluss nahe, dass in 293-Graham-Zellen zelluläre Proteine involviert sind, die den durch ORF57-ausgelösten hemmenden Effekt unterstützen. Ein speziesspezifischer oder zelllinienbedingter Effekt ist ebenfalls denkbar. Die beobachtete, synergistische Transaktivierung der PLHV-1-Promotoren kann zum einen einer direkten Interaktion zwischen ORF50 und ORF57 zu Grunde liegen, so wie es für die homologen Proteine in HSV-1, VZV und HHV-8 gezeigt wurde (Panagiotidis et al., 1997; Spengler et al., 2000; Malik et al., 2004 a). ORF57 könnte durch seine Interaktion mit ORF50 dessen DNA-Bindungsaffinität erhöhen und damit die ORF50-vermittelte Aktivierung der PLHV-1-Promotoren verstärken. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass ORF57 posttranskriptional wirkt. Die ORF57-homologen Proteine aus HHV-8 und EBV transportieren vorrangig gespleißte virale RNAs ins Zytoplasma der Zelle (Abschnitt 2.5.3.1). Da in den Kotransfektionsexperimenten ein ORF50-Expressionsplasmid (pCR-50sp) verwendet wurde, das den gespleißten *orf50* trägt, könnte PLHV-1 ORF57 theoretisch zu einer zytoplasmatischen Akkumulation der *orf50*-mRNA führen. Die verstärkte Expression von ORF50 würde dann die verstärkte Transaktivierung der PLHV-1-Promotoren erklären. In HHV-8 führte ORF57 allerdings nicht zu einer Akkumulation der *orf50*-mRNA mit nachfolgender verstärkter Expression von ORF50 (Kirshner et al., 2000). Die Funktion von PLHV-1 ORF57 als RNA-Exportfaktor müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

6.6 Interaktion zwischen PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h

Bisherige Reporterstudien in 293-Graham-Zellen zeigten, dass ORFA6/BZLF1_h die ORF50-vermittelte Aktivierung von einigen PLHV-1-Promotoren hemmt. In PK15-Zellen wurde dagegen ein synergistischer Effekt bei Koexpression von ORFA6/BZLF1_h und ORF50 beobachtet. Dies deutet daraufhin, dass zelluläre Proteine beteiligt sind, die in Abhängigkeit von der Zelllinie eine inhibitorische bzw. aktivierende Funktion von ORFA6/BZLF1_h bewirken. ORFA6/BZLF1_h könnte dabei direkt oder indirekt über zelluläre Faktoren unabhängig von ORF50 an bestimmte Sequenzbindeelemente binden. Daneben wäre eine direkte Interaktion von ORFA6/BZLF1_h mit ORF50 möglich, die bereits für die homologen Proteine bei HHV-8 beschrieben wurde (Liao et al., 2003; Izumiya et al., 2003b).

Mittels Koimmunpräzipitation konnte eine direkte Assoziation zwischen PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h nicht eindeutig gezeigt werden. Die Verwendung eines Waschpuffers mit 0,1 % Ovalbumin und verschiedenen Konzentrationen von Tween 20 konnte zwar die unspezifischen Bindungen von ORF50 an die Protein-G-Sepharose reduzieren, jedoch nicht vollständig eliminieren. Die in der Negativkontrolle vorhandene ORF50-Bande könnte auch

einem Ausfallen des ORF50-Proteins während der Immunpräzipitation zugrunde liegen. Da die ORFA6/BZLF1_h-, ORF50- und ORF57-homologen Proteine aus HHV-8 und EBV phosphoryliert sind und diese Phosphorylierung möglicherweise für die Interaktion zwischen den Proteinen wichtig ist, wurde dem Lysis- und Waschpuffer Phosphataseinhibitoren wie Natriumfluorid und Natriumorthovanadat zugesetzt. Um eine Degradation der Proteine zu vermeiden, wurden außerdem Proteinkinaseinhibitoren wie PMSF und ein spezieller Protease-Inhibitorcocktail von Roche verwendet. Trotz dieser Maßnahmen blieb die Frage nach einer Interaktion zwischen ORF50 und ORFA6/BZLF1_h unbeantwortet.

6.7 Interaktion zwischen PLHV-1 ORF50 und ORF57

Zuvor durchgeführte Luziferase-Reporterassays zeigten, dass die simultane Koexpression von ORF50 und ORF57 zu einer synergistischen Transaktivierung von einigen PLHV-1-Promotoren führte. Eine direkte Assoziation zwischen den PLHV-1-Proteinen wäre vorstellbar. In VZV konnte die Bindung zwischen dem ORF50-homologen IE62 und dem ORF57-homologen IE4 gezeigt werden (Spengler et al., 2000). Die Interaktion zwischen beiden Proteinen soll die Bindung von IE62 an den spezifischen Promotor verstärken. Auch in HSV-1 konnte eine Interaktion des ORF57-homologen Proteins ICP27 mit dem ORF50-homologen ICP4 gezeigt werden (Panagiotidis et al., 1997). ICP27 moduliert über seine Bindung an ICP4 dessen Fähigkeit stabil an DNA zu binden. Malik et al. (2004a) konnte die Wechselwirkung zwischen HHV-8 ORF50 und ORF57 erstmalig in einem γ -Herpesvirus zeigen. Für die Bindung zwischen HHV-8 ORF57 und ORF50 scheint die N-terminale Aminosäureregion (17-215) von ORF57 involviert zu sein (Malik et al., 2004a).

Mittels Koimmunpräzipitation konnte weder die Bindung zwischen N-terminal noch zwischen C-terminal markiertem ORF57-Protein und ORF50 gezeigt werden. Wie bereits unter 6.6 erläutert, kam es auch hier zu einer unspezifischen Bindung von ORF50 an Protein-G-Sepharose oder zu einem Ausfallen des Proteins während der Koimmunpräzipitation. In den Kontrollansätzen war ORF50 immer als schwache Proteinbande nachweisbar, die sich in ihrer Intensität nicht signifikant von der ORF50-Bande im ORF57-Präzipitat unterschied. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit Hilfe der Koimmunpräzipitation eine Interaktion zwischen den PLHV-1-Proteinen nicht eindeutig gezeigt werden konnte. Eine weitere Möglichkeit, Proteininteraktionen zu detektieren, bestünde in der Durchführung anderer Methoden wie z.B. des Yeast-Two-Hybrid-Systems, eines Pull-Down-Assays oder mittels Biacore.

6.8 Induktion der EBV-Promotoraktivität im homologen System

Die Induktion der klonierten EBV-Promotoren wurde zunächst im homologen System getestet. EBV BRLF1 führte zu einer starken (ca. 10-200-fach) Transaktivierung der EBV-Promotoren in 293-Graham-Zellen. Im Allgemeinen war die Stimulation der EBV-Promotor-Aktivität in PK15-Zellen deutlich niedriger und beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Präsenz spezifischer zellulärer Proteine, die die Aktivierung der Promotoren in 293-Graham-Zellen verstärken. Zudem könnte dieser Effekt zelllinien- oder speziesspezifisch sein. Die Stimulation der EBV-Promotoren orfBMRF1 (Holley-Guthrie et al., 1990) und orfBMLF1 (Kenney et al., 1989a) erfolgt direkt durch Bindung von BRLF1 an RRE (*Rta response element*). Dagegen werden die Promotoren der EBV-Gene orfBZLF1 und orfBRLF1 indirekt durch BRLF1 unter Beteiligung von zellulären Faktoren wie ATF-2/c-jun bzw. Sp1 und Sp3 induziert (Liu et al., 1997; Darr et al., 2001; Ragozy & Miller, 2001). Die Induktion des orfBZLF1-Promotors durch BRLF1 geschieht beispielsweise über die Aktivierung von MAPK (*mitogen-activated proteinkinase*) bzw. JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), die nachfolgend zu einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie ATF-2 und c-jun führen (Adamson et al., 2000). Die Bindung dieser Faktoren trägt zur Aktivierung des Promotors von orfBZLF1 bei.

Im Gegensatz zu EBV BRLF1 führte BZLF1 zu einer schwachen Aktivierung (3-10-fach) seines eigenen Promotors und des orfBRLF1-Promotors. Für die Autostimulation des orfBZLF1-Promotors wurde die Promotorregion von -221 bis +12 als absolut notwendig charakterisiert (Flemington & Speck, 1990a). Diese Region enthält die für die Stimulation durch BZLF1 essentiellen ZRE-Bindemotive (ZIIIA, ZIIIB), an die BZLF1 als Homodimer bindet (Abschnitt 5.1.3.2). Daneben gibt es zahlreiche Bindemotive für zelluläre Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sp1, Sp3, MEF2D u.a. (Liu et al., 1997). Die relativ geringe Stimulation der Promotoren der Gene orfBZLF1 bzw. orfBRLF1 durch BZLF1 stimmt mit Ergebnissen anderer Veröffentlichungen überein. In HeLa-Zellen wurde eine 2-fache Induktion von orfBZLF1 bzw. 10-fache Induktion von orfBRLF1 durch BZLF1 gemessen (Huang et al., 2006). Im Gegensatz dazu führte EBV BZLF1 zu einer starken Aktivierung der Promotoren orfBMRF1 und orfBMLF1 (bis 295-fach), die ebenfalls für HeLa-Zellen belegt ist (Quinlivan et al., 1993). Die Induktion der Genexpression geschieht hier durch direkte Bindung von BZLF1 an ZRE bzw. AP-1 Bindemotive, die in den Promotoren der EBV-Gene orfBRLF1, orfBMRF1 und orfBMLF1 identifiziert wurden (Flemington & Speck, 1990b; Liu & Speck, 2003; Quinlivan et al., 1993; Kenney et al., 1989; Kolman et al., 1996). Die Ergebnisse der Transaktivierung von EBV-Promotoren durch BZLF1 und BRLF1 verdeutlichen, dass die klonierten EBV-Promotorregionen die für die Aktivierung notwendigen Sequenzbindeelemente für Transkriptionsfaktoren tragen.

6.9 Induktion der EBV-Promotoraktivität durch PLHV-1-Proteine

Um eine mögliche Interaktion zwischen PLHV-1 und EBV auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde die Transaktivierung von EBV-Promotoren durch PLHV-1 ORF50 und ORFA6/BZLF1_h untersucht. Interessanterweise führte PLHV-1 ORF50 zu keiner Aktivierung von EBV-Promotoren. Offenbar fehlen in den klonierten Promotorbereichen Sequenzmotive für die direkte Bindung von PLHV-1 ORF50 und/oder für zelluläre Proteine, die in Kooperation mit ORF50 eine indirekte Aktivierung der Promotoren vermitteln. Im Gegensatz dazu zeigten Reporterstudien, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dario di Luca (Universität Ferrara, Italien) erarbeitet wurden, dass PLHV-1 ORF50 ein Transaktivator von HHV-8-Promotoren ist. PLHV-1 ORF50 führte in 293-Graham-Zellen zu einer moderaten Aktivierung (ca. 2-7-fach) von HHV-8-Promotoren (Santoni et al., 2006). In stabil transfizierten 293-Graham-Zellen konnte eine bis zu 27-fache Aktivierung der HHV-8-Promotoren durch PLHV-1 ORF50 ermittelt werden. HHV-8 ORF50 führte umgekehrt zu einer starken Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren (Santoni et al., 2006). Diese Ergebnisse zeigen, dass die klonierten HHV-8-Promotorregionen offenbar Sequenzmotive tragen, die für eine Induktion durch PLHV-1 ORF50 notwendig sind. In den klonierten EBV-Promotorregionen scheinen äquivalente Bindemotive nicht präsent zu sein. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Auswahl der Promotorregionen sein. Bei der Klonierung der HHV-8-Promotoren wurden die Promotorregionen kloniert, die den homologen PLHV-1-Promotorregionen entsprachen. Im Gegensatz dazu korrelieren die Promotorregionen der EBV-Promotoren nicht mit denen der PLHV-1- bzw. HHV-8-Promotoren. Die Klonierung der EBV-Promotoren erfolgte basierend auf publizierten Bindemotiven für Transkriptionsfaktoren (Abschnitt 5.1.2.2). Aus diesem Grund variierte auch die Größe der klonierten EBV-Promotoren stärker als die der PLHV-1- oder HHV-8-Promotoren.

Im Gegensatz zu PLHV-1 ORF50 führte ORFA6/BZLF1_h zu einer moderaten Aktivierung (bis 4,5-fach) der EBV-Promotoren. Diese Aktivierung könnte über ZRE-ähnliche Bindemotive oder aber über zelluläre Proteine vermittelt werden. PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h stimulierte dagegen nicht die Aktivierung von HHV-8-Promotoren (Santoni et al., 2006). Die Versuche zeigen, dass die Funktion als Transkriptionsaktivator zwischen PLHV-1 ORF50, HHV-8 ORF50 und EBV BRLF1 konserviert ist. Die Ergebnisse geben den ersten Hinweis, dass EBV mit PLHV-1 interagieren könnte. Im Rahmen der Xenotransplantation besteht damit das Risiko einer gegenseitigen Reaktivierung dieser Viren.

6.10 Induktion der PLHV-1-Promotoraktivität durch EBV-Proteine

EBV BRLF1 führte zu einer starken Aktivierung von PLHV-1-Promotoren (5-72-fach) in 293-Graham-Zellen. Vor allem die Aktivität der Promotoren orf57 und orf59 wurde induziert. Wie

schon im homologen System beobachtet, waren auch hier die Aktivierungsraten der PLHV-1-Promotoren in PK15-Zellen deutlich niedriger als in 293-Graham-Zellen. Im Vergleich zum homologen PLHV-1-System stimulierte EBV BRLF1 die Aktivierung des PLHV-1 orf50- und orf57-Promotors deutlich stärker als PLHV-1 ORF50. Dies deutet darauf hin, dass EBV BRLF1 entweder direkt an RRE-ähnliche Sequenzen im Promotor dieser PLHV-1-Gene bindet oder aber zelluläre Proteine die Induktion der Promotoren vermitteln. Die Reporterstudien im heterologen System deuten an, dass EBV BRLF1 den lytischen Infektionszyklus von PLHV-1 induzieren könnte.

Im Gegensatz zu EBV BRLF1 führte BZLF1 zu einer deutlich schwächeren (3-10-fach) Aktivierung der PLHV-1-Promotoren. Am stärksten wurden die Promotoren der PLHV-1-Gene orf57 und orf08/gB durch BZLF1 induziert. Die Aktivierungsraten dieser Promotoren lagen deutlich über denen, die mit PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h erhalten wurden. Möglicherweise existieren in diesen Promotoren Bindemotive für BZLF1, die aber nicht von PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h erkannt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PLHV-1-Promotoren Sequenzbindemotive enthalten, die von EBV BZLF1 bzw. BRLF1 erkannt werden oder aber Bindesequenzen für zelluläre Faktoren darstellen, die die Transaktivierung durch BZLF1 bzw. BRLF1 vermitteln. Diese Reporterstudien geben einen deutlichen Hinweis, dass EBV mit PLHV-1 wechselwirken könnte.

6.11 Reaktivierung von Herpesviren

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein Zellkultursystem für PLHV-3 zu etablieren. Nach erfolgreicher Kultivierung von Viren können die Infektiosität, die Zellpathogenität und andere Charakteristika der Viren untersucht werden. Die Herstellung von Knock-out-Mutanten ermöglicht die Funktionsbestimmung von Virusproteinen und deren Bedeutung für das Virus. Auch für Infektionsversuche an virusnegativen Tieren ist die Anzucht und Gewinnung von infektiösen Viruspartikeln unerlässlich. γ -Herpesviren lassen sich im Gegensatz zu α -Herpesviren nur schwer anzüchten. Für OvHV-2 (Ovines Herpesvirus 2) wurde bis vor kurzem kein Zellkultursystem beschrieben, in dem sich die Viren effizient replizieren. Inzwischen gelang es OvHV-2-positive T-Zellen bzw. PBMC zu kultivieren, in denen der lytische Infektionszyklus durch Chemikalien induziert werden konnte (Thonur et al., 2006). Auch für EBV und HHV-8 bestehen nur Zelllinien, die latent mit EBV bzw. HHV-8 infiziert sind, und in denen der lytische Replikationszyklus durch bestimmte Stimulantien wie TPA (*12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat*), n-Butyrat, Ionomycin, INF- γ u.a. induziert werden kann (Luka et al., 1979; Miller et al., 1997; Renne et al., 1996; Yu et al., 1999). Vorherige Versuche, PLHV-3 mit verschiedenen Induktoren wie z.B. TPA, n-Butyrat, Ionomycin u.a. in latent mit PLHV-3 infizierten L23-Zellen zu induzieren, verliefen ohne Erfolg (Chmielewicz, 2002). Auch eine Kokultivierung von viruspositiven, primären PBMC

(*peripheral blood mononuclear cells*) mit verschiedenen permanenten Zelllinien vom Schwein, Affe oder Mensch führte zu keiner Infektion der adhärenen Zellen (Chmielewicz, 2002). Eine weitere Möglichkeit, den lytischen Infektionszyklus zu induzieren, besteht darin, bestimmte Regulatorproteine der *immediate early*-Genexpression in latent Virus-infizierten Zellen im Überschuss zu exprimieren und somit den Eintritt in die lytische Phase zu bewirken. Durch Transfektion eines BZLF1-Expressionsplasmides in EBV-positive Zellen konnte der lytische Infektionszyklus von EBV induziert werden (Countryman & Miller, 1985; Takada et al., 1986; Grogan et al., 1997). Auch die Überexpression von HHV-8 ORF50 in HHV-8 latent infizierten Zellen führte zur Initiation der lytischen Virusreplikation (Lukac et al., 1998; Sun et al., 1998; Gradoville et al., 2000). Neben der Virusreaktivierung durch viruseigene Transaktivatoren konnte die Induktion des lytischen Infektionszyklus auch durch Überexpression von ORF50-homologen Proteinen aus anderen Herpesviren gezeigt werden. Die Reaktivierung von MHV-68 in latent mit MHV-68 infizierten Zellen wurde beispielsweise durch die Transfektion der Zellen mit HHV-8 orf50 induziert (Rickabaugh et al., 2005). Umgekehrt konnte der lytische Infektionszyklus von HHV-8 durch die ORF50-homologen Proteine aus MHV-68 und RRV induziert werden (Damania et al., 2004). Diese Studien und eigene Reporterassays gaben Anlass zu der Hoffnung, dass PLHV-3 in L23-Zellen durch Überexpression von PLHV-1 ORF50 oder EBV BRLF1 bzw. BZLF1 reaktiviert werden könnte.

6.11.1 Reaktivierung des lytischen Infektionszyklus von EBV

Als Vorversuch für die Reaktivierung von PLHV-3 wurden zunächst EBV-positive B95-8 Zellen mit den für EBV BZLF1 oder EBV BRLF1 kodierenden Expressionsplasmiden mittels Elektroporation transfiziert. Die Quantifizierung der Virus-DNA mittels quantitativer PCR erfolgte nach zwei bzw. vier Tagen in den Zellen und Überständen. Um die Vermehrung von viraler DNA zu messen, wurde mittels real time-PCR eine intergenische Region von EBV quantifiziert (Solassol et al., 2001). Von der Quantifizierung eines viralen Transkriptes wurde abgesehen, da so nur eine Aussage über die Expression eines bestimmten viralen Gens getroffen werden kann. Die verstärkte Expression eines viralen *immediate early*-Gens gibt jedoch keine Auskunft, ob die Induktion des lytischen Replikationszyklus tatsächlich zur viralen DNA-Replikation führt. Aus diesen Gründen wurde nur virale DNA quantifiziert, um die Vermehrung von Virusgenomen als Folge der lytischen Replikation nachzuweisen. Die Überexpression von BZLF1 in den B95-8-Zellen führte nach zwei Tagen zu einer ca. 5-fachen Erhöhung der EBV-Kopienzahl in den Zellen gegenüber den Kontrollzellen. In Zellen, die mit pCMV-BRLF1 bzw. pCMV-BRLF1+pCMV-BZLF1 transfiziert wurden, erhöhte sich die EBV-Kopienzahl um den Faktor 2,5. Betrachtet man den Einfluss der PLHV-1-Proteine, so konnte zumindest in den Zellen ein leichter Anstieg der EBV-Kopienzahl (ca. 2-fach)

gemessen werden, wenn eine Kotransfektion mit den Plasmiden pCR-50 bzw. pCR50 + pCR-A6/BZLF1g erfolgte. Die singuläre Expression von ORFA6/BZLF1_h in B95-8-Zellen führte dagegen zu keiner Erhöhung der EBV-Kopienzahl. Betrachtet man die EBV-Kopienzahl in den Überständen, so konnte erst nach vier Tagen eine Erhöhung der Viruslast festgestellt werden, wenn die Zellen mit den verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert worden waren. Bei Transfektion der B95-8-Zellen mit den EBV-Expressionsplasmiden wurde eine ca. 3-4-fache Steigerung der EBV-Kopienzahl gemessen. In Analogie zur Viruskopienzahl in den Zellen wurde nach vier Tagen eine schwache (2-fach) Erhöhung der Viruslast in den Überständen von Zellen gemessen, die mit den PLHV-1-Expressionsplasmiden pCR-50 und pCR-50+pCR-A6/BZLF1g transfiziert wurden. Die stärkste Stimulation der EBV-Replikation konnte nach vier Tagen durch TPA (14-fach) erreicht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die lytische EBV-Replikation in B95-8-Zellen am effektivsten durch TPA induziert werden konnte. Die Überexpression von BZLF1 bzw. BRLF1 führte eindeutig zu einer Reaktivierung von EBV aus der Latenz, aber nicht zu einer TPA-vergleichbaren Reaktivierung.

Für die im Vergleich zu TPA relativ geringe Induktion der EBV-Replikation durch die Überexpression von BZLF1 könnte es mehrere Erklärungen geben. Zum einen liegt die Transfektionseffizienz der B95-8-Zellen nur bei ca. 40-50%, während alle Zellen prinzipiell durch TPA stimulierbar waren. Durch das Wachstum der Zellen nimmt außerdem die Plasmidanzahl pro Zelle ab. Darüber hinaus haben nicht-transfizierte Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber transfizierten Zellen, so dass die Expressionsrate der plasmidkodierten Proteine im Laufe der Zeit abnimmt. In den TPA-induzierten Proben waren die Zellen über den gesamten Zeitraum mit derselben Konzentration an TPA ausgesetzt. Zum anderen ist bekannt, dass nicht jede latent Virus-infizierte Zelllinie durch mehrere Induktoren stimulierbar ist. Die hier verwendete Zelllinie B95-8 ist z.B. besonders gut durch TPA stimulierbar, während andere EBV-positive Zelllinien wie z.B. HHV14-16 nur durch Trichostatin A (TSA) und n-Butyrat, aber nicht durch TPA, stimulierbar sind (Gradoville et al., 2002; El-Guindy et al., 2002). Die Induktion der lytischen EBV-Replikation durch Überexpression von BZLF1 wurde bisher nur in einigen EBV-positiven Burkitt-Lymphomzelllinien wie z.B. Raji, Akata, BL41/C116, HH514-16 oder EBV-positiven Epithelzelllinien wie NPC-KT, D98/HE-R1 gezeigt (Zalani et al., 1996; Rooney et al., 1989; Ragoczy et al., 1998). Eine Reaktivierung von EBV mit Hilfe von TPA in der Zelllinie BL41/C116 blieb dagegen erfolglos (Rooney et al., 1989). Durch Transfektion eines BRLF1-Plasmides konnte die lytische EBV-Replikation in einigen epithelialen Zelllinien wie z.B. NPC-KT, D98/HE-R1 und EBV-positiven Burkitt-Lymphomzellen wie HH514-16 gezeigt werden (Zalani et al., 1996; Ragoczy et al., 1998). Dies verdeutlicht, dass die Wahl der virusinfizierten Zelllinien je nach Induktionsvariante entscheidend ist.

Darüber hinaus könnten Mutationen im Genom der verwendeten Zelllinie auftreten, die z.B. bestimmte Proteine von Signalkaskaden betreffen, so dass in Folge die Induktionsfähigkeit durch einen bestimmten Induktor nachlässt oder verloren gehen kann. Die TPA-induzierte virale DNA-Replikation wird über intrazelluläre Signalkaskaden vermittelt. TPA ist ein potenter Aktivator der Proteinkinase C (PKC), die über die Aktivierung der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) bzw. JNK (*c-Jun n-terminal kinase*) zur Phosphorylierung von zellulärem c-Jun führt (Gao et al., 2001). Phosphoryliertes c-Jun bindet c-Fos unter Bildung des Faktors AP-1, der nachfolgend an AP-1- oder TRE (*TPA response elements*)-Bindemotive im Promotor des BZLF1-Gens bindet (Flemington & Speck, 1990a). Damit wird die Expression von BZLF1 eingeleitet, das die Transkription weiterer *immediate early*-Gene wie z.B. BRLF1 stimuliert.

Die Induktion des lytischen Zyklus kann jedoch auch unabhängig von der PKC erfolgen. Die nur durch TSA und n-Butyrat stimulierbare EBV-positive Zelllinie HHV14-16 wird unter Ausschluss des PKC-Signalweges aktiviert (Gradoville et al., 2002). N-Butyrat und TSA sind Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren, die durch Hemmung dieser Enzyme eine Acetylierung von Histonen bewirken und nachfolgend eine Auflockerung der Chromatinstruktur ermöglichen (Jenkins et al., 2000). Dies bedeutet, dass die PKC-vermittelte Aktivierung des lytischen Infektionszyklus nur einen Mechanismus von vielen darstellt.

Eine weitere Erklärung für die geringere EBV-Stimulation in B95-8-Zellen bei Überexpression von BZLF1 könnte mit der Regulation des BZLF1-Promotors (Zp) zusammenhängen. Für die Reaktivierung von EBV wurde folgendes Modell postuliert. Der Zp-Promotor des BZLF1-Gens ist während der Latenz negativ reguliert. Verschiedene negative Sequenzbindemotive im Zp-Promotor wie z.B. ZV (Kraus et al., 2001), ZIIR (Liu et al., 1998) und ZIA-ZID (Flemington & Speck, 1990a; Liu et al., 1997) binden zelluläre Proteine wie z.B. Sp1, Sp3 oder MEF2D, die wiederum Proteine rekrutieren, die als HDAC wirken und die Transkription von BZLF1 unterdrücken. Die HDAC bewirken eine Deacetylierung der Histone, wodurch die Chromatinstruktur verdichtet wird und nachfolgend eine Bindung von Transkriptionsfaktoren reprimiert wird (Wolffe, 1996; Gruffat et al., 2002b). Die TPA-induzierte Aktivierung von Signalkaskaden führt durch einen unbekanntem Mechanismus zur Verdrängung der HDAC und zur Bindung von Koaktivatoren am Zp-Promotor. EBV BZLF1 interagiert beispielsweise mit dem Koaktivator CREB (Adamson & Kenney, 1999), der zur Histonacetylierung und Dekondensation des Chromatins führt. Dies führt zur initialen Expression von BZLF1, das nachfolgend an ZRE (ZIIIA, ZIIIB) im Zp-Promotor bindet und über die Autoregulation zu einer verstärkten Transkription vom Zp-Promotor führt (Flemington & Speck, 1990a). BZLF1 bindet dann an die ZRE (ZRE-1, ZRE-2) im Promotor des BRLF1-Gens (Rp) und stimuliert die Expression dieses *immediate early*-Proteins (Liu & Speck, 2003). BZLF1 und BRLF1

induzieren dann die weitere Expression von frühen und späten Genen. Über die Transfektion von Expressionsplasmiden in latent virusinfizierte Zellen wird möglicherweise die Induktion dieser intrazellulären Signalkaskaden umgangen. Die durch Transfektion des BZLF1-Expressionsplasmides verursachte Überexpression von BZLF1 in den B95-8-Zellen könnte möglicherweise nur unzureichend die Chromatinstruktur um den Zp-Promotor öffnen und die initiale Transkription von endogenem BZLF1 induzieren. Kolman et al. (1996) und Le Roux et al. (1996) zeigten, dass die Transfektion eines BZLF1-Expressionsplasmides in latent EBV-infizierten Zellen die lytische EBV-Replikation induziert, aber der endogene Zp-Promotor nicht aktiviert wird. Eine Veröffentlichung von Deng et al. (2003) untermauerte allerdings, dass exogenes BZLF1 an den Zp-Promotor in latent infizierten Zellen bindet.

Diese zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse spiegeln die komplizierten Regulationsmechanismen wider, die je nach Zelllinie unterschiedlich sind. Mit den Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Reaktivierung von EBV in B95-8-Zellen durch TPA aber auch durch Überexpression von BZLF1 bzw. BRLF1 möglich ist. Um die Induktion der lytischen EBV-Replikation auch auf Transkript- bzw. Proteinebene dazustellen, wäre es sinnvoll gewesen, parallel die Expression eines Markergens darzustellen. Bei EBV dient das BMRF1-Protein als Marker der lytischen EBV-Replikation (Zalani et al., 1996; Ragoczy et al., 1998). BMRF1 ist eine Komponente der aktiven viralen DNA-Polymerase und wird als frühes Gen sehr stark exprimiert. In latent EBV-infizierten Zellen wird BMRF1 dagegen nicht exprimiert. Die Detektion der BMRF1-mRNA mittels Northernblot oder der Nachweis des BMRF1-Proteins im Westernblot hätten die mittels real time-PCR erhaltenen Ergebnisse untermauern können. Der zusätzliche Nachweis des BMRF1-Proteins hätte vor allem die Interpretation von real time-PCR-Daten erleichtert, die eine schwache Viruslast ergaben. Zellen, die mit PLHV-1 ORF50 bzw. ORF50+ORFA6/BZLF1_h transfiziert worden waren, zeigten in den Zellen und den Überständen eine sehr schwache Erhöhung der EBV-Kopienzahl, die als nicht signifikant interpretiert wurde. Die zusätzliche Detektion von BMRF1 in diesen Zellen hätte die real time-PCR-Daten bestätigt und so eine eindeutigere Interpretation der Daten erlaubt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PLHV-1 nicht oder nur schwach zur Induktion des lytischen Infektionszyklus von EBV in B95-8-Zellen führte. Dies liegt mit großer Wahrscheinlichkeit an der Zelllinie B95-8, die besonders gut durch TPA stimulierbar ist. Dagegen scheint diese B-Zelllinie weniger gut für Induktionsversuche geeignet, in denen *immediate early*-Proteine überexprimiert werden. In einem anderen Zellsystem führte allerdings die Überexpression von PLHV-1 ORF50 bzw. ORFA6/BZLF1_h auch zu keiner Reaktivierung von EBV aus der Latenz (Prof. Dr. W. Hammerschmidt, persönliche Mitteilung). Die Frage bleibt somit unbeantwortet, ob PLHV-1 ORF50 den lytischen Infektionszyklus von EBV induzieren könnte.

6.11.2 Reaktivierung des lytischen Infektionszyklus von PLHV-3

Vorherige Versuche den lytischen Replikationszyklus von PLHV-3 in latent Virus-infizierten L23-Zellen mit TPA, n-Butyrat, Ionomycin u.a. zu reaktivieren, schlugen fehl (Chmielewicz, 2002). Ein weiterer Versuch den lytischen Infektionszyklus von PLHV-3 zu induzieren, sollte darin bestehen, die zuvor identifizierten Transkriptionsaktivatoren PLHV-1 ORF50 bzw. ORFA6/BZLF1_h in L23-Zellen überzuexprimieren um nachfolgend die lytische Virusreplikation zu bewirken. Besondere Hoffnung lag dabei auf PLHV-1 ORF50, dessen homologes Protein in HHV-8, EBV, MHV-68 und HVS zur Reaktivierung der Herpesviren führt (Sun et al., 1998; Feederle et al., 2000; Wu et al., 2000).

Zur Reaktivierung von PLHV-3 wurden PLHV-3-positive L23-Zellen zum einen mit den PLHV-1-Expressionsplasmiden pCR-50 und/oder pCR-A6/BZLF1g transfiziert und die Zellen für vier Tage kultiviert. Nach zwei bzw. vier Tagen wurde die Virus-DNA aus den Zellen und Überständen präpariert und die Viruslast der Proben mittels real time-PCR bestimmt. Als Maß für die PLHV-3-Replikation wurde ein Teil des Glykoprotein B-Gens quantifiziert (Chmielewicz, 2002). Darüber hinaus erfolgte die Transfektion der L23-Zellen mit den EBV-Expressionsplasmiden pCMV-BZLF1 und/oder pCMV-BRLF1. Heterologe Reporterassays hatten zuvor gezeigt, dass EBV BRLF1 und BZLF1 zu einer Transaktivierung von verschiedenen PLHV-1-Promotoren führte. Dies gab Anlass zu der Hoffnung, dass die EBV-Transaktivatoren die lytische PLHV-3-Replikation induzieren könnten. Weder die Transfektion des ORF50- bzw. ORFA6/BZLF1_h-Expressionsplasmides, noch die Kombination von beiden Plasmiden führte zur Reaktivierung von PLHV-3 in den L23-Zellen. Ein Anstieg der Viruslast konnte daher weder in den Zellen noch in den Überständen ermittelt werden. Auch die Transfektion der L23-Zellen mit den EBV-Expressionsplasmiden pCMV-BRLF1 bzw. pCMV-BZLF1 oder die Kombination von beiden Plasmiden führte zu keiner nennenswerten PLHV-3-Replikation. Bei Verwendung des Phorbolesters TPA konnte lediglich ein ca. 2-facher Anstieg der PLHV-3-Kopienzahl im Überstand gemessen werden. Diese schwache PLHV-3-Induktion ist übereinstimmend mit früheren Ergebnissen der PLHV-3-Induktion (Chmielewicz, 2002).

Die Unstimulierbarkeit von PLHV-3 in den L23-Zellen könnte zum einen darin liegen, dass das Virus im Laufe der Kultivierung der Zellen einen Teil des Genoms verloren hat. PCR-Analysen von B. Chmielewicz verdeutlichten jedoch, dass der bis zu diesem Zeitpunkt sequenzierte Genombereich von orf03-49 keine größeren Deletionen oder Insertionen enthält (Chmielewicz, 2002). Allerdings könnten Punktmutationen im Genom vorhanden sein, die so nicht identifiziert wurden und Proteinprodukte betreffen, die in Signalkaskaden involviert sind.

Eine weitere Möglichkeit für die negative Virusreaktivierung in L23-Zellen durch die verwendeten Expressionsplasmide könnte daraus resultieren, dass nicht putative *immediate*

early-Gene von PLHV-3, sondern von PLHV-1 kloniert wurden. Dies lag der Tatsache zugrunde, dass zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeit die Kartierung des Genoms von PLHV-1 am weitesten fortgeschritten war und nur eine Klonierung von PLHV-1-Genen möglich war. Außerdem lag keine latent mit PLHV-1 infizierte Zelllinie vor. Das ORF50-Protein aus PLHV-1 besitzt ca. 71 % Übereinstimmung zum ORF50-Protein aus PLHV-3 (Abschnitt 2.5.1, Tab. 3). Die geringere phylogenetische Verwandtschaft zwischen PLHV-1 und PLHV-3 könnte theoretisch die Ursache für die erfolglose PLHV-3-Reaktivierung in L23-Zellen sein. Die Arbeiten von Damania et al. (2004) zeigten allerdings, dass der lytische Infektionszyklus von HHV-8 durch die ORF50-homologen Proteine aus dem Murinen Herpesvirus Typ 68 (MHV-68) und dem Rhesusaffen Rhadinovirus (RRV) induziert werden kann. Die Homologie zwischen HHV-8 ORF50 und MHV-68 bzw. RRV ORF50 ist mit 43% bzw. 55% deutlich geringer als zwischen PLHV-1 und PLHV-3. Eine weitere Veröffentlichung konnte die Reaktivierung von MHV-68 durch HHV-8 ORF50 darlegen (Rickabaugh et al., 2005). Daraus ergibt sich, dass die Verwendung von PLHV-1 ORF50 bzw. ORFA6/BZLF1_h für die Reaktivierung von PLHV-3 sicher nicht optimal war, jedoch aufgrund der nahen Verwandtschaft zwischen PLHV-1 und PLHV-3 nicht die Ursache für die Unstimulierbarkeit der PLHV-3-positiven L23-Zellen sind.

Eine weitere Ursache für die Unstimulierbarkeit der L23-Zellen könnte darin bestehen, dass Mutationen in zellulären Genen vorliegen, deren Genprodukte wichtige Funktionen in Signalkaskaden ausüben. Ein solcher Defekt könnte eine Virusreaktivierung verhindern. Bedingt durch einen viralen oder zellulären Genomdefekt könnte auch der Replikations- oder Reifungsprozess der Viruspartikel gestört sein. Dass ein zellulärer oder viraler Gendefekt in den PLHV-3-positiven L23-Zellen vorliegt, wird auch von der Tatsache unterstützt, dass die Expression von PLHV-1 ORF50 in latent HHV-8 infizierten BC-3-Zellen zu einer erhöhten Transkription von orfnut-1 (PAN RNA) führte (Santoni et al., 2006). Die Transkription der PAN RNA dient als Marker für die lytische HHV-8-Replikation. Diese Ergebnisse deuten an, dass PLHV-1 ORF50 regulatorische Eigenschaften besitzt und den lytischen Infektionszyklus von HHV-8 in BC-3-Zellen induzieren könnte. Im Gegensatz dazu führte weder die Expression von PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h noch von ORF57 in BC-3-Zellen zu einer verstärkten Transkription der PAN RNA (Santoni et al., 2006).

6.11.3 Virusreaktivierung mittels Kokultivierung

Zur Anzucht der PLHV wurden bereits erfolglos PLHV-positive PBMC mit virusnegativen primären Zellen vom Schwein kokultiviert (Chmielewicz, 2002). Eine weitere Möglichkeit, Herpesviren aus der Latenz zu reaktivieren, besteht darin, Zellen zu kokultivieren, die mit Herpesviren infiziert sind. Durch Kokultivierung von HHV-6-infizierten T-Zellen mit HHV-8-infizierten BCBL-Zellen konnte beispielsweise die lytische HHV-8- Replikation induziert

werden (Lu et al., 2005). Zur Reaktivierung von PLHV-3 wurden latent mit PLHV-3 infizierte L23-Zellen mit latent EBV-infizierten B95-8-Zellen kokultiviert. Ein Teil der B95-8-Zellen befindet sich immer in der lytischen Replikationsphase, so dass freigesetztes EBV theoretisch zu einer Infektion der L23-Zellen führen könnte. In Folge der Infektion der L23-Zelle mit EBV könnte so der lytische Infektionszyklus von PLHV-3 induziert werden. Um die EBV-Viruslast im Überstand zu erhöhen, wurde außerdem TPA als chemischer Induktor für die EBV-Replikation verwendet. Nach zwei bzw. vier Tagen wurden die Zellen und Überstände gewonnen und Virus-DNA präpariert. In den Proben wurde sowohl die PLHV-3- als auch die EBV-Kopienzahl bestimmt. Weder in den L23-Zellen noch im Überstand konnte nach einer Kokultivierung mit B95-8 Zellen eine erhöhte PLHV-3-Kopienzahl ermittelt werden. Die Kokultivierung der beiden Zelllinien führte auch nicht zu einer Stimulation der EBV-Replikation. Auch die Zugabe von TPA erbrachte keine nennenswerte Steigerung in der PLHV-3-Kopienzahl. Eine starke Induktion der lytischen EBV-Replikation konnte wie erwartet durch TPA erzielt werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine lytische Vermehrung von PLHV-3 in L23-Zellen auch durch Kokultivierung erfolglos blieb.

Eine mögliche Ursache für die negative PLHV-3-Stimulation durch EBV könnte darin liegen, dass EBV nicht porcine L23-Zellen infizieren kann, weil der entsprechende Rezeptor für die Adsorption von EBV fehlt. Es ist bekannt, dass EBV über den Glykoproteinkomplex gp350/220 an den CD21/CD22-Rezeptor der Zellmembran humaner B-Zellen adsorbiert und in diesen lebenslang persistiert. Bei der Primärinfektion wird außerdem von einer Infektion der Epithelzellen der Mund- und Rachenschleimhaut ausgegangen, allerdings konnte der klassische B-Zellrezeptor auf diesen Zellen nicht nachgewiesen werden (Crawford, 2001). Somit ist bis heute unklar, ob sich EBV tatsächlich in diesen Epithelzellen lytisch vermehrt. Das zu den γ -Herpesviren gehörende EBV hat ein sehr enges Wirtszellspektrums, so dass die Möglichkeit besteht, dass die porcinen B-Zellen der Linie L23 nicht durch EBV infizierbar sind.

6.12 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der ORF50 von PLHV-1 als starker Transkriptionsaktivator identifiziert. Aufgrund von Homologien in der Aminosäuresequenz, des Spleißens, der Lokalisation und der Transkriptionsaktivität von PLHV-1 ORF50 zu anderen homologen ORF50-Proteinen aus EBV, HHV-8 und MHV-68 ist davon auszugehen, dass auch in PLHV-1 der ORF50 ein essentielles Regulatorprotein für den Übergang von der Latenz in die lytische Phase ist. Der letzte Beweis kann allerdings nur durch die Reaktivierung von PLHV-1 durch ORF50 belegt werden. Alle bisherigen Versuche zur Virusanzucht in L23-Zellen blieben ohne Erfolg. Für Infektionsversuche mit humanen Zellen oder im Tiermodellsystem bleibt die Gewinnung von infektiösen Viruspartikeln daher

oberstes Ziel. Eine weitere Möglichkeit *immediate early*-Proteine in virusinfizierten Zellen zu exprimieren, besteht in der Verwendung von rekombinanten Adenoviren. Durch Infektion von EBV-positiven B-Zellen mit rekombinanten Adenoviren, die für EBV BZLF1 kodierten, konnte der lytische Replikationszyklus von EBV induziert werden (Feng et al., 2002; Chen et al., 2005).

Die Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen PLHV-1 und EBV ergaben, dass zumindest auf molekularer Ebene EBV PLHV-1 und *vice versa* transaktiviert. Eine gegenseitige Reaktivierung der Viren im Zellkultursystem konnte jedoch nicht gezeigt werden. In Bezug auf die Xenotransplantation stellt PLHV-1 neben den porcinen endogenen Herpesviren ein weiteres Risiko für die Virussicherheit dar. Unter den immunsupprimierten Bedingungen der Xenotransplantation könnte PLHV-1 reaktiviert werden und ernsthafte Sekundärerkrankungen im Patienten auslösen und/oder zu einer vorzeitigen Abstoßung des Xenotransplantates führen. Das aufgrund der Immunsuppression nicht ausgeschlossene Risiko einer PLHV-1-assoziierten PTLD im Organrezipienten könnte durch die Wechselwirkung mit EBV oder HHV-8 erhöht sein. Umgekehrt könnte PLHV-1 das Risiko der Entwicklung eines HHV-8-assoziierten Kaposi Sarkoms oder der EBV-assoziierten PTLD steigern. Oberstes Ziel bleibt daher, die Züchtung von PLHV-freien Schweinen für die Xenotransplantation. Die Geburt von Ferkeln unter Verwendung des Kaiserschnittes und nachfolgender Einzelhaltung der Tiere unter SPF-Bedingungen reduzierte zwar die PLHV-Prävalenz in den Jungtieren, ein völliger Ausschluss der Virusübertragung war jedoch nicht möglich (Mueller et al., 2005; Tucker et al., 2003). Gelingt die Zucht PLHV-freier Schweine nicht, so besteht noch die Möglichkeit der Gabe von Virostatika, um die Virusreplikation zu hemmen. Allerdings müssen hier die Nebenwirkungen abgewogen werden. Dennoch verbleibt bei der Xenotransplantation immer das Risiko der Übertragung von unbekanntem Pathogenen, die mit bisherigen Nachweismethoden nicht identifizierbar sind.

7. Zusammenfassung

Bei der Nutzung von Schweinen als Organspender für die Xenotransplantation besteht das Risiko der Übertragung von porzinen Herpesviren auf den Menschen. Das porzine lymphotrope Herpesvirus Typ-1 (PLHV-1) ist eng mit einer lymphoproliferativen Erkrankung assoziiert, die nach Transplantation von Blutstammzellen in immunsupprimierte Schweine beobachtet wurde. Die durch PLHV-1 vermittelte porzine PTLD ähnelt der EBV-induzierten PTLD des Menschen, die in der Allotransplantation bei ca. 10% der Transplantatempfänger auftritt und häufig letal verläuft. Bei einer Xenotransplantation könnte PLHV-1 unter Immunsuppression reaktiviert werden und möglicherweise eine lymphoproliferative Erkrankung im Organrezipienten auslösen. Daneben wäre eine Reaktivierung von bereits im Menschen persistierenden Herpesviren durch PLHV-1 möglich. In Folge könnten kritisch verlaufende Sekundärinfektionen im Patienten auftreten, die den Erfolg der Xenotransplantation und die Gesundheit des Organrezipienten gefährden könnten. Zur Abschätzung des Gefährdungspotentials von PLHV-1 in der Xenotransplantation wurden putative *immediate early*-Proteine untersucht. Diese regulieren in Herpesviren den Übergang von der Latenz in die lytische Replikationsphase. Der ORF50 und ORFA6/BZLF1_h von PLHV-1 zeigt Homologie zu den essentiellen Regulatorproteinen des EBV (BRLF1, BZLF1) bzw. HHV-8 (ORF50, K-bzip). Als drittes Gen in PLHV-1 wurde orf57 identifiziert, dessen Genprodukt in Herpesviren hochkonserviert ist und vorrangig als posttranskriptionaler Regulator der Genexpression wirkt. Es sollte geklärt werden, ob PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1_h und ORF57 als Transkriptionsaktivatoren wirken bzw. den Übergang von der Latenz in die lytische Infektionsphase regulieren.

ORF50 von PLHV-1 konnte als starker Transkriptionsaktivator der PLHV-1-Promotoren orfA6/BZLF1_h, orf57, orf59, orf09/DNA-Polymerase und orf08/Glykoprotein B identifiziert werden. ORF50 zeigte außerdem eine geringe Autoaktivierung in 293-Graham- und PK15-Zellen. Die Stimulation dieser PLHV-1-Promotoren durch ORFA6/BZLF1_h war dagegen gering. PLHV-1 ORF57 führte zu keiner Transaktivierung der PLHV-1-Promotoren orf50, orfA6/BZLF1_h, orf57 und orf59. Bei Koexpression von ORF50 und ORFA6/BZLF1_h wurde in Abhängigkeit von der Zelllinie und vom Promotor ein synergistischer oder antagonistischer Effekt auf die Promotoraktivität beobachtet. PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h führte zur Reduktion der ORF50-vermittelten Aktivierung des orfA6/BZLF1_h⁻, orf57- und orf59-Promotors in 293-Graham-Zellen. Dagegen wurde die Aktivität des orf50-Promotors bei Koexpression von ORF50 und ORFA6/BZLF1_h in 293-Graham-Zellen leicht verstärkt. In PK15-Zellen wirkten beide Proteine dagegen synergistisch bei der Aktivierung dieser PLHV-1-Promotoren. ORFA6/BZLF1_h beeinflusst die Transkriptionsaktivität von ORF50 promotorabhängig. Eine direkte Assoziation zwischen ORF50 und ORFA6/BZLF1_h konnte jedoch nicht gezeigt

werden. Die Koexpression von ORF50 und ORF57 führte zu einer synergistischen Aktivierung des orfA6/BZLF1_h-, orf50-, orf57- und orf59-Promotors in 293-Graham- und PK15-Zellen. Aufgrund unspezifischer Proteinbindungen in der Immunpräzipitation war ein Nachweis einer direkten Interaktion zwischen ORF50 und ORF57 nicht möglich.

Untersuchungen zu einer Wechselwirkung zwischen PLHV-1 und EBV zeigten, dass EBV auf molekularer Ebene PLHV-1 transaktiviert. EBV BRLF1 führte zu einer starken Aktivierung der PLHV-1-Promotoren orf50, orf57 und orf59 in 293-Graham-Zellen. Dagegen war der Einfluss von EBV BZLF1 auf die PLHV-1-Promotoraktivität deutlich geringer. Während PLHV-1 ORF50 zu keiner Aktivierung der EBV-Promotoren orfBZLF1, orfBRLF1, orfBMLF1 und orfBMRF1 führte, induzierte ORFA6/BZLF1_h eine schwache EBV-Promotoraktivität in 293-Graham-Zellen.

Im Zellkultursystem führte die Überexpression von PLHV-1 ORF50 in EBV-positiven B-Zellen zu einer ca. 2-fachen Erhöhung der EBV-Kopienzahl. Eine deutlichere Steigerung (bis 5-fach) der Viruslast wurde in EBV-positiven B-Zellen gemessen, die mit EBV BZLF1 transfiziert worden waren. Die Stimulation der lytischen EBV-Replikation mit TPA erzielte den stärksten Effekt. In PLHV-3-positiven B-Zellen wurde durch Überexpression von EBV BZLF1 bzw. BRLF1 keine lytische PLHV-3-Replikation induziert. Die Expression von PLHV-1 ORF50 bzw. ORFA6/BZLF1_h in diesen B-Zellen führte ebenfalls nicht zur Induktion des lytischen Infektionszyklus von PLHV-3. Auch eine Kokultivierung von EBV-positiven B-Zellen mit PLHV-3-positiven B-Zellen führte nicht zu einer Reaktivierung von EBV bzw. PLHV-3.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse leisten einen wichtigen Beitrag zur Virussicherheit in der Xenotransplantation. Der ORF50 von PLHV-1 ist mit großer Wahrscheinlichkeit der Haupttransaktivator für den Übergang von der Latenz in die lytische Replikationsphase. Die Untersuchungen zur Wechselwirkung von PLHV-1 mit humanen Herpesviren zeigen außerdem, dass eine gegenseitige Reaktivierung dieser Herpesviren im Xenotransplantat nicht ausgeschlossen werden kann. PLHV-1 stellt damit ein Risiko für den Organrezipienten in der Xenotransplantation dar. Daher sollten für die Transplantation von porzinen Organen nur PLHV-freie Schweine gezüchtet werden.

8. Summary

In xenotransplantation, the pig is the favoured animal as a donor of cells and organs for human transplants. There is the risk, that porcine viruses or other pathogens might be transferred through the xenotransplant to the human organ recipient and might adapt to the immunocompromised patient. The porcine lymphotropic herpesvirus 1 (PLHV-1) was found to be involved in the aetiology of a lymphoproliferative disease, affecting experimentally transplanted and immunosuppressed miniature swine. The PLHV-1-associated „posttransplantation lymphoproliferative disease (PTLD)“ resembles the EBV-associated PTLD. This human disease affects approximately 10% of solid organ transplant recipients. During xenotransplantation, PLHV-1 might be transferred to the human recipient and cause a lymphoproliferative disease. Potential interactions between PLHV-1 and persistent human herpesviruses might be possible, leading to graft rejection and transplant failure. Recombination of porcine herpesviruses with human herpesviruses might create new pathogens with consequences for the wide population.

In PLHV-1, potential *immediate early* genes were identified with homology to well known transactivator genes of EBV and HHV-8. PLHV-1 ORF50 and ORFA6/BZLF1_h are homologues to BRLF1/ORF50 and BZLF1/K-bzip of EBV and HHV-8. The ORF50-homologues proteins are the main transcriptional activators for the switch from latent to lytic viral replication in different herpesviruses. The ORF57 of PLHV-1 shows weak homology to BMLF1/ORF57 of EBV and HHV-8, acting as a post-transcriptional activator of gene expression.

The aim of this study was to examine, if PLHV-1 ORF50, ORFA6/BZLF1_h and ORF57 are transcriptional activators, regulating the switch from latent to lytic viral replication. First, the activation of different PLHV-1 promoters was tested. PLHV-1 ORF50 strongly activated the promoters of orfA6/BZLF1_h, orf57, orf59, DNA-polymerase and glycoprotein B in 293-Graham and PK15 cells. ORF50 also weakly stimulated its own expression. In comparison to ORF50, ORFA6/BZLF1_h activated the promoters to a lesser extent. In contrast, PLHV-1 ORF57 did not stimulate promoter activity. Coexpression of ORF50 and ORFA6/BZLF1_h resulted in a dose-dependent repression of the ORF50-mediated transactivation of orfA6/BZLF1_h, orf57 and orf59 in 293-Graham cells. In contrast, ORFA6/BZLF1_h enhanced the ORF50-mediated transactivation of the orf50 promoter. The suppressive effect of ORFA6/BZLF1_h on ORF50 was not seen in PK15 cells. ORFA6/BZLF1_h and ORF50 synergistically activated the promoters of orfA6/BZLF1_h, orf50, orf57 and orf59. ORFA6/BZLF1_h influenced the transcriptional activity of ORF50 in a promoter and cell specific manner. A direct interaction between ORF50 and ORFA6/BZLF1_h in immunoprecipitates could not be shown. When ORF50 was coexpressed with ORF57 the transactivation of the orfA6/BZLF1_h, orf50, orf57 and orf59 promoters were enhanced in 293-

Graham cells. This synergistic effect was also seen in PK15 cells. A direct association between ORF50 and ORF57 could not be shown.

To investigate possible interactions between PLHV-1 and EBV at the molecular level, the transactivation of (1) PLHV-1 promoters by EBV BZLF1, BRLF1 or (2) EBV promoters by PLHV-1 ORF50 and ORFA6/BZLF1_h were examined. EBV BRLF1 strongly transactivated the PLHV-1 promoters of orf50, orf57 and orf59 in 293-Graham cells. EBV BZLF1 stimulated PLHV-1 promoter activity to a lesser extent. In contrast, PLHV-1 ORF50 did not transactivate EBV promoters. PLHV-1 ORFA6/BZLF1_h showed a weak transcriptional activity on EBV promoters.

In cell culture, overexpression of PLHV-1 ORF50 and/or ORFA6/BZLF1_h in latently with PLHV-3 infected cells did not induce lytic viral replication. Expression of EBV BZLF1 and/or BRLF1 in these cells also did not lead to PLHV-3 reactivation. Transfection of the PLHV-1 ORF50 expression plasmid into EBV-positive cells induced a 2-fold accumulation of EBV copies in the cell. When EBV BZLF1 was overexpressed in EBV-positive cells, a 5-fold accumulation of EBV copies was measured, indicating that lytic viral replication was induced. The strongest effect (14-fold) on EBV reactivation was observed with TPA. When PLHV-3-positive cells were co-cultured with EBV-positive cells, neither a reactivation of EBV nor a reactivation of PLHV-3 was observed.

These results include important facts for virus safety in xenotransplantation. ORF50 of PLHV-1 is probably the main transactivator for the switch from latent to lytic PLHV replication. The molecular interactions between PLHV-1 and human herpesviruses could be an indication for reciprocal reactivation in xenotransplantation. Therefore, PLHV-1 is a potential risk for organ recipients. For the use as donors in xenotransplantation, breeding of PLHV-free pigs is recommended.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Viren

AIHV	Alcelaphines Herpesvirus (Gnu)
BLHV	Bovines Lymphotropes Herpesvirus (Rind)
BoHV	Bovines Herpesvirus (Rind)
CprHV	Caprines Herpesvirus (Ziege)
EBV	Epstein-Barr-Virus (HHV-4)
EHV	Equines Herpesvirus (Pferd)
HCMV	Humanes Cytomegalievirus (HHV-5)
HCV	Hepatitis C Virus
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HSV-1	Herpes Simplex Virus 1 (HHV-1)
HSV-2	Herpes Simplex Virus 2 (HHV-2)
HVS	Herpesvirus Saimiri (Totenkopffäffchen)
MHV-68	Murines Herpesvirus Typ 68 (Maus)
OvHV	Ovines Herpesvirus (Schaf)
PCMV	Porzines Cytomegalievirus (SuHV-2, Schwein)
PERV	Porzines Endogenes Retrovirus (Schwein)
PLHV	Porzines Lymphotropes Herpesvirus (Schwein)
PRV	Pseudorabies Virus (SuHV-1, Schwein)
RRV	Rhesusaffen Rhadinovirus
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
VZV	Varizella Zoster Virus

Sonstige Abkürzungen

μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
as	<i>antisense</i> (Orientierung)
BKF	bösartiges Katarrhalfieber

bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Oberflächenantigen)
cDNA	komplementäre DNA
cLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> (Konfokales Laserscan-Mikroskop)
Ko-IP	Koimmunpräzipitation
C _T	<i>threshold cycle</i> (Schwellenwert bei real-time PCR)
d	Tag
D	Deutschland
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
dATP	Desoxyadenosin- Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DPOL	DNA-Polymerase
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin- Triphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i> (Gelshift-Assay)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
evt.	eventuell
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FKS	Foetales Kälberserum
g	Gramm oder g-Zahl (Erdbeschleunigung)
gB	Glykoprotein B
GCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grünfluoreszierendes Protein)
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion
HAT	Histonacetyltransferase

HDAC	Histondeacetylase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
JNK	Jun-aktivierte Proteinkinase
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	molar
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	<i>multiple cloning site</i> (multiple Klonierungsstelle)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mol	Mol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
ORF	<i>open reading frame</i> (Offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PKC	Proteinkinase
pmol	pikomolar
PTLD	<i>post-transplantation lymphoproliferative disease</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i> (Schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden)
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	<i>Rta response element</i> (DNA-Bindesequenz für Rta)
Rt	Raumtemperatur
s	<i>sense</i> (Orientierung)
sec	Sekunde
SPF	spezifiziert pathogen-frei
Tab.	Tabelle
U	Unit (Enzymeinheit)

UK	Großbritannien
Upm	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
XT	Xenotransplantation
ZRE	<i>Zta response element</i> (DNA-Bindesequenz für Zta)
zzgl.	zuzüglich

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Darstellung der durchgeführten Organtransplantationen in Deutschland im Vergleich zum tatsächlichen Bedarf	2
Abb. 2:	Schematische Darstellung eines Herpesvirus	12
Abb. 3:	Phylogenetische Analyse von PLHV-1, -2 und -3 innerhalb der γ -Herpesviren	16
Abb. 4:	Genomstruktur von PLHV-1	18
Abb. 5:	Aminosäuresequenzvergleich der ORF50-Proteine von PLHV-1,-2, -3 und ORF50-homologer Proteine verwandter γ -Herpesviren.....	22
Abb. 6:	Aminosäuresequenzvergleich der ORFA6/BZLF1 _h -Proteine von PLHV-1, -2, -3 und Homologie zu γ -herpesviralen A6/BZLF1 _h -Proteinen bzw. humanen Transkriptionsfaktoren	25
Abb. 7:	Aminosäuresequenzvergleich der ORF57-Proteine von PLHV-1, -2, -3 und ORF57-homologer Proteine verwandter γ -Herpesviren.....	29
Abb. 8:	Prinzip der real time-PCR	56
Abb. 9:	Ergebnisse einer real time-PCR nach Amplifikation eines Teilfragmentes des orf08/gB von PLHV-3	57
Abb. 10:	Prinzip des Luziferase-Reporterassays.....	76
Abb. 11:	Klonierung von PLHV-1 orf50, orfA6/BZLF1 _h und orf57 in pCR3.1-uni.....	85
Abb. 12:	Strategie zur Herstellung von Hämagglutinin (HA)-markierten ORF57-Proteinen	87
Abb. 13:	Schematische Darstellung von beschriebenen Sequenzbindeelementen für Transkriptionsfaktoren in vier ausgewählten EBV-Promotoren	90
Abb. 14:	Nachweis der Transkription von orfA6/BZLF1 _h mittels RACE	91
Abb. 15:	Nachweis der Transkription von orf50 und orf57 mittels RACE	92
Abb. 16:	Expression N-terminal c-Myc-markierter ORF50-Proteine	93
Abb. 17:	Expression N- bzw C-terminal HA-markierter ORF57- und ORFA6/BZLF1 _h -Proteine	94
Abb. 18:	Lokalisierung der ORF50-Proteine von PLHV-1 im Zellkern	96
Abb. 19:	Lokalisierung der PLHV-1 ORFA6/BZLF1 _h - und ORF57-Proteine im Zellkern	97
Abb. 20:	Optimierung des Luziferase-Reporterassays	98
Abb. 21:	Optimierung der Transfektion adhärenter Zellen.....	99
Abb. 22:	Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORF50.....	101
Abb. 23:	Konzentrationsabhängige Stimulation von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORF50	102
Abb. 24:	Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORFA6/BZLF1g und ORFA6/BZLF1sp	103
Abb. 25:	Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch ORFA6/BZLF1 _h	104
Abb. 26:	Konzentrationsabhängige Stimulation von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORFA6/BZLF1 _h	104

Abb. 27:	Konzentrationsabhängige Stimulation von PLHV-1-Promotoren durch PLHV-1 ORF57	105
Abb. 28:	Transaktivierung des orfA6/BZLF1 _h - bzw. orf50-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORFA6/BZLF1 _h und ORF50 in 293-Graham-Zellen	107
Abb. 29:	Transaktivierung des orf57- bzw. orf59-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORFA6/BZLF1 _h und ORF50 in 293-Graham-Zellen	108
Abb. 30:	Transaktivierung des orfA6/BZLF1 _h - bzw. orf50-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORFA6/BZLF1 _h und ORF50 in PK15-Zellen	109
Abb. 31:	Transaktivierung des orf57- bzw. orf59-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORFA6/BZLF1 _h und ORF50 in PK15-Zellen	110
Abb. 32:	Transaktivierung des orfA6/BZLF1 _h - bzw. orf50-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORF57 in 293-Graham-Zellen	112
Abb. 33:	Transaktivierung des orf57- bzw. orf59-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORF57 in 293-Graham-Zellen.....	113
Abb. 34:	Transaktivierung des orfA6/BZLF1 _h - bzw. orf50-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORF57 in PK15-Zellen	114
Abb. 35:	Transaktivierung des orf57- bzw. orf59-Promotors bei Koexpression von PLHV-1 ORF50 und ORF57 in PK15-Zellen	115
Abb. 36:	ORF50 bindet ORFA6/BZLF1 _h in Koimmunpräzipitaten	117
Abb. 37:	ORF50 bindet N-terminal markiertes ORF57 in Koimmunpräzipitaten	118
Abb. 38:	ORF50 bindet nicht C-terminal markiertes ORF57 in Koimmunpräzipitaten.....	120
Abb. 39:	Aktivierung von EBV-Promotoren durch EBV BRLF1.....	121
Abb. 40:	Aktivierung von EBV-Promotoren durch EBV BZLF1	122
Abb. 41:	Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch EBV BRLF1	123
Abb. 42:	Aktivierung von PLHV-1-Promotoren durch EBV BZLF1.....	124
Abb. 43:	Aktivierung von EBV-Promotoren durch PLHV-1 ORFA6/BZLF1 _h	126
Abb. 44:	Aktivierung von EBV-Promotoren durch PLHV-1 ORF50.....	126
Abb. 45:	Ermittlung der Transfektionseffizienz von porzinen B-Zellen mittels FACS-Analyse	129
Abb. 46:	Ermittlung der Transfektionseffizienz von B-Zellen der Krallenaffenlinie B95-8 mittels FACS-Analyse	133
Abb. 47:	Standardkurven des Zielgens (EBVint) bzw. des Referenzgens (CycA) zur Ermittlung der EBV- bzw Cyclophilin A-Kopienzahl.....	135
Abb. 48:	Stimulation von EBV in B95-8-Zellen nach Transfektion von Expressionsplasmiden (A) bzw. nach chemischer Induktion (B)	136
Abb. 49:	Standardkurven des Zielgens (gB) bzw. Referenzgens (B2MG) zur Ermittlung der PLHV-3- bzw. β 2-Microglobulin-Kopienzahl.....	138
Abb. 50:	Stimulation von PLHV-3 in L23-Zellen nach Transfektion von Expressionsplasmiden (A) bzw. nach chemischer Induktion (B)	139
Abb. 51:	Ergebnisse der Virusreaktivierung nach Kokultivierung von L23- bzw. B95-8-Zellen.....	141

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Transspeziesübertragungen bei Herpesviren	8
Tabelle 2:	Humane Herpesviren und ihre Erkrankungen	10
Tabelle 3:	Putative Leserahmen orf50-59 in PLHV-1, -2 und -3 und homologe Leserahmen orf50-59 in AIHV-1, HHV-8 und EBV	20
Tabelle 4:	Übersicht über die verwendeten Zelllinien	32
Tabelle 5:	PCR-Primer zur Klonierung in pCR3.1-uni	33
Tabelle 6:	PCR-Primer zur Klonierung von Fusionsproteinen	33
Tabelle 7:	PCR-Primer zur Klonierung in pGL3-basic	34
Tabelle 8:	Primer für quantitative real time-PCR	35
Tabelle 9:	PCR-Primer für 3'RACE-PCR.....	36
Tabelle 10:	Überblick über die mittels TaqMan-PCR amplifizierten Gene	58
Tabelle 11a:	Transfektion mit Effectene für Luziferase-Reportergenassay	70
Tabelle 11b:	Auflistung der zugehörigen Mengen an Reagenzien für eine Transfektion mit Effectene	71
Tabelle 11c:	Transfektion mit Effectene für SDS-PAGE	71
Tabelle 12a:	Transfektion mit GenePorter TM 2 für Luziferase-Reportergenassay (1 Expressionsplasmid)	72
Tabelle 12b:	Auflistung der zugehörigen Mengen an Reagenzien für eine Transfektion mit GenePorter TM 2 (1 Expressionsplasmid /1 Reportergenplasmid)	72
Tabelle 13a:	Transfektion mit GenePorter TM 2 für Luziferase-Reportergenassay (2 Expressionsplasmide / 1 Reportergenplasmid)	72
Tabelle 13b:	Auflistung der zugehörigen Mengen an Reagenzien für eine Transfektion mit GenePorter TM 2 (2 Expressionsplasmide /1 Reportergenplasmid).....	72
Tabelle 14:	Pipettierschema für ein denaturierendes Gel	78
Tabelle 15:	Übersicht über die erzeugten Expressionskonstrukte	87
Tabelle 16:	Übersicht über die erzeugten Luziferase-Reportergenvektoren	89
Tabelle 17:	Transaktivierung von PLHV-1-Promotoren im homologen und heterologen System	124
Tabelle 18:	Transaktivierung von EBV-Promotoren im homologen und heterologen System	127
Tabelle 19:	Ermittlung der Transfektionseffizienz von L23-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher Elektroporationsparameter	129
Tabelle 20:	Ergebnisse der Elektroporation von L23-Zellen bei Verwendung der EP-Methode 1, 250 V und 960 µF	131
Tabelle 21:	Ermittlung der Transfektionseffizienz von B95-8-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher Elektroporationsparameter	132
Tabelle 22:	Aktivierung von PLHV-1, EBV- bzw. HHV-8-Promotoren durch die homologen ORF50-Proteine aus PLHV-1, EBV bzw. HHV-8	146
Tabelle 23:	Aktivierung von PLHV-1, EBV- bzw. HHV-8-Promotoren durch die homologen ORFA6/BZLF1 _h -Proteine aus PLHV-1, EBV bzw. HHV-8	147

Tabelle 24:	Einfluss von PLHV-1 ORFA6/BZLF1 _n auf das Transaktivierungspotential von ORF50 in 293-Graham-Zellen.....	149
Tabelle 25:	Einfluss von PLHV-1 ORF57 auf das Transaktivierungspotential von ORF50 in 293-Graham-Zellen	151

10. Literaturverzeichnis

- Adamson, A. L.** 2005. Epstein-Barr virus BZLF1 binds to mitotic chromosomes. *J Virol* **79**: 7899-7904
- Adamson, A. L., D. Darr, E. Holley-Guthrie, R. A. Johnson, A. Mauser, J. Swenson, and S. Kenney.** 2000. Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J Virol* **74**:1224-33.
- Adamson, A. L., and S. Kenney.** 1999. The Epstein-Barr virus BZLF1 protein interacts physically and functionally with the histone acetylase CREB-binding protein. *J Virol* **73**:6551-8.
- Adamson, A. L., and S. Kenney.** 2001. Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *J Virol* **75**:2388-99.
- Aebischer, P., M. Schlupe, and N. Deglon.** 1996. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* **2**:696
- Albini, S., W. Zimmermann, F. Neff, B. Ehlers, H. Hani, H. Li, D. Hussy, M. Engels, and M. Ackermann.** 2003. Identification and quantification of ovine gammaherpesvirus 2 DNA in fresh and stored tissues of pigs with symptoms of porcine malignant catarrhal fever. *J Clin Microbiol* **41**:900-4.
- Allan, J. S.** 1998. The risk of using baboons as transplant donors. Exogenous and endogenous viruses. *Ann N Y Acad Sci* **862**:87-99.
- Anderson, R. A., D. X. Liu, and U. A. Gompels.** 1996. Definition of a human herpesvirus-6 betaherpesvirus-specific domain in glycoprotein gH that governs interaction with glycoprotein gL: substitution of human cytomegalovirus glycoproteins permits group-specific complex formation. *Virology* **217**:517-26.
- Arvanitakis, L., E. Geras-Raaka, A. Varma, M. C. Gershengorn, and E. Cesarman.** 1997. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature* **385**:347-50.
- Auchincloss, H., Jr., and D. H. Sachs.** 1998. Xenogeneic transplantation. *Annu Rev Immunol* **16**:433-70.
- Bailey, L. L., S. L. Nehlsen-Cannarella, W. Concepcion, and W. B. Jolley.** 1985. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *Jama* **254**:3321-9
- Bais, C., B. Santomasso, O. Coso, L. Arvanitakis, E. G. Raaka, J. S. Gutkind, A. S. Asch, E. Cesarman, M. C. Gershengorn, and E. A. Mesri.** 1998. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* **391**:86-9.
- Batisse, J., E. Manet, J. Middeldorp, A. Sergeant, and H. Gruffat.** 2005. Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for intranuclear capsid assembly and production of gp350. *J Virol* **79**:14102-11.
- Baumann, M., R. Feederle, E. Kremmer, and W. Hammerschmidt.** 1999. Cellular transcription factors recruit viral replication proteins to activate the Epstein-Barr virus origin of lytic DNA replication, oriLyt. *Embo J* **18**:6095-105.
- Baumann, M., H. Mischak, S. Dammeier, W. Kolch, O. Gires, D. Pich, R. Zeidler, H. J. Delecluse, and W. Hammerschmidt.** 1998. Activation of the Epstein-Barr virus transcription factor BZLF1 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced phosphorylation. *J Virol* **72**:8105-14.
- Beckmann, J.** 2000. "Xenotransplantation von Zellen, Geweben und Organen: wissenschaftliche Entwicklungen und ethisch-rechtliche Implikationen." Springer, Berlin.

- Bello, L. J., A. J. Davison, M. A. Glenn, A. Whitehouse, N. Rethmeier, T. F. Schulz, and J. Barklie Clements.** 1999. The human herpesvirus-8 ORF 57 gene and its properties. *J Gen Virol* **80** (Pt 12):3207-15.
- Bergelson, J. M., M. Chan, K. R. Solomon, N. F. St John, H. Lin, and R. W. Finberg.** 1994. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6245-8.
- Birnboim, H. C. & J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-23
- Boneva, R. S., and T. M. Folks.** 2004. Xenotransplantation and risks of zoonotic infections. *Ann Med* **36**:504-17.
- Boneva, R. S., T. M. Folks, and L. E. Chapman.** 2001. Infectious disease issues in xenotransplantation. *Clin Microbiol Rev* **14**:1-14.
- Boyle, S. M., V. Ruvolo, A. K. Gupta, and S. Swaminathan.** 1999. Association with the cellular export receptor CRM 1 mediates function and intracellular localization of Epstein-Barr virus SM protein, a regulator of gene expression. *J Virol* **73**:6872-81.
- Boyne, J. R., and A. Whitehouse.** 2006. gamma-2 Herpes virus post-transcriptional gene regulation. *Clin Microbiol Infect* **12**:110-7.
- Brenner, P., H. Reichenspurner, M. Schmoeckel, C. Wimmer, A. Rucker, V. Eder, B. Meiser, M. Hinz, T. Felbinger, C. Hammer, and B. Reichart.** 2000. Prevention of hyperacute xenograft rejection in orthotopic xenotransplantation of pig hearts into baboons using immunoadsorption of antibodies and complement factors. *Transpl Int* **13**(1):508-17.
- Brown, H. J., M. J. Song, H. Deng, T. T. Wu, G. Cheng, and R. Sun.** 2003. NF- κ B inhibits gammaherpesvirus lytic replication. *J Virol* **77**: 8532-40
- Buisson, M., F. Hans, I. Kusters, N. Duran, and A. Sergeant.** 1999. The C-terminal region but not the Arg-X-Pro repeat of Epstein-Barr virus protein EB2 is required for its effect on RNA splicing and transport. *J Virol* **73**:4090-100.
- Burak, K. W., W. K. Kremers, K. P. Batts, R. H. Wiesner, C. B. Rosen, R. R. Razonable, C. V. Paya, and M. R. Charlton.** 2002. Impact of cytomegalovirus infection, year of transplantation, and donor age on outcomes after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl* **8**:362-9.
- Byrne, G. W., K. R. McCurry, M. J. Martin, S. M. McClellan, J. L. Platt, and J. S. Logan.** 1997. Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* **63**:149-55.
- Byun, H., Y. Gwack, S. Hwang, and J. Choe.** 2002. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame (ORF) 50 transactivates K8 and ORF57 promoters via heterogeneous response elements. *Mol Cells* **14**:185-91.
- Campadelli-Fiume, G., P. Mirandola, and L. Menotti.** 1999. Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. *Emerg Infect Dis* **5**:353-66.
- Caselli, E., M. Galvan, E. Cassai, A. Caruso, L. Sighinolfi, and D. Luca.** 2005. Human herpesvirus 8 enhances human immunodeficiency virus replication in acutely infected cells and induces reactivation in latently infected cells. *Blood* **106**: 2790-97
- Caselli, E., P. Menegazzi, A. Bracci, M. Galvan, E. Cassai, and D. Di Luca.** 2001. Human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) ORF50 interacts synergistically with the tat gene product in transactivating the human immunodeficiency virus type 1 LTR. *J Gen Virol* **82**:1965-70.
- Cayrol, C., and E. K. Flemington.** 1996. The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Embo J* **15**:2748-59.

- Cesarman, E., Y. Chang, P. S. Moore, J. W. Said, and D. M. Knowles.** 1995. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* **332**:1186-91.
- Chan, S. R., and B. Chandran.** 2000. Characterization of human herpesvirus 8 ORF59 protein (PF-8) and mapping of the processivity and viral DNA polymerase-interacting domains. *J Virol* **74**:10920-9.
- Chang, P. J., D. Shedd, L. Gradoville, M. S. Cho, L. W. Chen, J. Chang, and G. Miller.** 2002. Open reading frame 50 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus directly activates the viral PAN and K12 genes by binding to related response elements. *J Virol* **76**:3168-78.
- Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles, and P. S. Moore.** 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**:1865-9.
- Chen, L., G. Liao, M. Fujimuro, O. J. Semmes, and S. D. Hayward.** 2001. Properties of two EBV Mta nuclear export signal sequences. *Virology* **288**:119-28.
- Chen, J., K. Ueda, S. Sakakibara, T. Okuno, and K. Yamanishi.** 2000. Transcriptional regulation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor gene. *J Virol* **74**:8623-34.
- Chen, L., J. Yin, Y. Chen, and J. Zhong.** 2005. Induction of Epstein-Barr virus lytic replication by recombinant adenovirus expressing the ZEBRA gene with EBV specific promoters. *Acta Biochim Biophys Sin* **37**:215-20.
- Chi, T., and M. Carey.** 1993. The ZEBRA activation domain: modular organization and mechanism of action. *Mol Cell Biol* **13**:7045-55.
- Chmielewicz, B.** 2002. Detektion und Kultivierung neuartiger porciner Gammaherpesviren als Beitrag zur virologischen Sicherheit in der Xenotransplantation (Dissertation). Freie Universität Berlin.
- Chmielewicz, B., M. Goltz, T. Franz, C. Bauer, S. Brema, H. Ellerbrok, S. Beckmann, H. J. Rziha, K. H. Lahrmann, C. Romero, and B. Ehlers.** 2003. A novel porcine gammaherpesvirus. *Virology* **308**:317-29.
- Clark, D. A., J. F. Fryer, A. W. Tucker, P. D. McArdle, A. E. Hughes, V. C. Emery, and P. D. Griffiths.** 2003. Porcine cytomegalovirus in pigs being bred for xenograft organs: progress towards control. *Xenotransplantation* **10**:142-8.
- Cook, I. D., F. Shanahan, and P. J. Farrell.** 1994. Epstein-Barr virus SM protein. *Virology* **205**:217-27.
- Costa, C., L. Zhao, W. V. Burton, C. Rosas, K. R. Bondioli, B. L. Williams, T. A. Hoagland, A. P. Dalmaso, and W. L. Fodor.** 2002. Transgenic pigs designed to express human CD59 and H-transferase to avoid humoral xenograft rejection. *Xenotransplantation* **9**:45-57.
- Countryman, J., and G. Miller.** 1985. Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:4085-9.
- Cozzi, E., F. Bhatti, M. Schmoeckel, G. Chavez, K. G. Smith, A. Zaidi, J. R. Bradley, S. Thiru, M. Goddard, C. Vial, D. Ostlie, J. Wallwork, D. J. White, and P. J. Friend.** 2000. Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation* **70**:15-21.
- Crawford, D. H.** 2001. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Phil Trans R Soc Lond* **356**:461-73.
- Dahme, E., and E. Weiss.** 1988. Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Enke Verlag, Stuttgart.

- Daibata, M., R. E. Humphreys, and T. Sairenji.** 1992. Phosphorylation of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA. *Virology* **188**:916-20.
- Damania, B., J. H. Jeong, B. S. Bowser, S. M. DeWire, M. R. Staudt, and D. P. Dittmer.** 2004. Comparison of the Rta/Orf50 transactivator proteins of gamma-2-herpesviruses. *J Virol* **78**: 5491-99
- Darr, C. D., A. Mauser, and S. Kenney.** 2001. Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 induces the lytic form of viral replication through a mechanism involving phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol* **75**:6135-42.
- Davis, M. G., S. C. Kenney, J. Kamine, J. S. Pagano, and E. S. Huang.** 1987. Immediate-early gene region of human cytomegalovirus trans-activates the promoter of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:8642-6.
- Deacon, T., J. Schumacher, J. Dinsmore, C. Thomas, P. Palmer, S. Kott, A. Edge, D. Penney, S. Kassissieh, P. Dempsey, and O. Isacson.** 1997. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med* **3**:350-3.
- Defechereux, P., S. Debrus, L. Baudoux, B. Rentier, and J. Piette.** 1997. Varicella-zoster virus open reading frame 4 encodes an immediate-early protein with posttranscriptional regulatory properties. *J Virol* **71**:7073-9.
- Deng, Z., C. J. Chen, M. Chamberlin, F. Lu, G. Blobel, D. Speicher, L. Cirillo, K. Zaret, and P. Lieberman.** 2003. The CBP bromodomain and nucleosome targeting are required for Zta-directed nucleosome acetylation and transcription activation. *Mol Cell Biol* **23**: 2633-44
- Deng, H., J. T. Chu, M. B. Rettig, O. Martinez-Maza, and R. Sun.** 2002. Rta of the human herpesvirus 8/Kaposi sarcoma-associated herpesvirus up-regulates human interleukin-6 gene expression. *Blood* **100**:1919-21.
- Deng, H., A. Young, and R. Sun.** 2000. Auto-activation of the rta gene of human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Gen Virol* **81**:3043-8.
- Denner, J. (ed.).** 2000. Mikrobiologische Risiken der Xenotransplantation. Nomos Verlagsgesellschaft, Baden-Baden.
- Deschamps, J. Y., F. A. Roux, P. Sai, and E. Gouin.** 2005. History of xenotransplantation. *Xenotransplantation* **12**:91-109.
- Dooleniya, M. D. and A. N. Warrens** (2003) Xenotransplantation: where are we today?. *J R Soc Med* **96** (3): 111-17
- Duan, W., S. Wang, S. Liu, and C. Wood.** 2001. Characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 ORF57 promoter. *Arch Virol* **146**:403-13.
- Ehlers, B., K. Borchers, C. Grund, K. Frolich, H. Ludwig, and H. J. Buhk.** 1999a. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. *Virus Genes* **18**:211-20.
- Ehlers, B., S. Ulrich, and M. Goltz.** 1999b. Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *J Gen Virol* **80** (Pt 4):971-8.
- Ei-Guindy, A. S., L. Heston, Y. Endo, M. S. Cho, and G. Miller.** 2002. Disruption of Epstein-Barr virus latency in the absence of phosphorylation of ZEBRA by protein kinase C. *J Virol* **76**:11199-208.
- Ei-Guindy, A. S., and G. Miller.** 2004. Phosphorylation of Epstein-Barr virus ZEBRA protein at its casein kinase 2 sites mediates its ability to repress activation of a viral lytic cycle late gene by Rta. *J Virol* **78**:7634-44.
- Ei-Guindy, A. S., S. Y. Paek, J. Countryman, and G. Miller.** 2006. Identification of constitutive phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *J Biol Chem* **281**:3085-95.

- Epstein, M. A., B. G. Achong, and Y. M. Barr.** 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **15**:702-3.
- Farjot, G., M. Buisson, M. Duc Dodon, L. Gazzolo, A. Sergeant, and I. Mikaelian.** 2000. Epstein-Barr virus EB2 protein exports unspliced RNA via a Crm-1-independent pathway. *J Virol* **74**:6068-76.
- Farrar, J. J.** 1999. Nipah-virus encephalitis--investigation of a new infection. *Lancet* **354**:1222-3.
- Farrell, P. J., D. T. Rowe, C. M. Rooney, and T. Kouzarides.** 1989. Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *Embo J* **8**:127-32.
- Feederle, R., M. Kost, M. Baumann, A. Janz, E. Drouet, W. Hammerschmidt, and H. J. Delecluse.** 2000. The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *Embo J* **19**:3080-9.
- Feng, W. H., E. Westphal, A. Mauser, N. Raab-Traub, M. L. Gulley, P. Busson, and S. C. Kenney.** 2002. Use of adenovirus vectors expressing Epstein-Barr virus (EBV) immediate-early protein BZLF1 or BRLF1 to treat EBV-positive tumors. *J Virol* **76**:10951-9.
- Feranchak, A. P., R. W. Tyson, M. R. Narkewicz, F. M. Karrer, and R. J. Sokol.** 1998. Fulminant Epstein-Barr viral hepatitis: orthotopic liver transplantation and review of the literature. *Liver Transpl Surg* **4**:469-76.
- Ferry, J. A., J. O. Jacobson, D. Conti, F. Delmonico, and N. L. Harris.** 1989. Lymphoproliferative disorders and hematologic malignancies following organ transplantation. *Mod Pathol* **2**:583-92.
- Fishman, J. A.** 1998. Infection and xenotransplantation. Developing strategies to minimize risk. *Ann N Y Acad Sci* **862**:52-66.
- Fishman, J. A.** 1994. Miniature swine as organ donors for man: strategies for prevention of xenotransplant-associated infections. *Xenotransplantation* **1**.
- Fishman, J. A., and C. Patience.** 2004. Xenotransplantation: infectious risk revisited. *Am J Transplant* **4**:1383-90.
- Fixman, E. D., G. S. Hayward, and S. D. Hayward.** 1995. Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. *J Virol* **69**:2998-3006.
- Flamand, L., I. Stefanescu, D. V. Ablashi, and J. Menezes.** 1993. Activation of the Epstein-Barr virus replicative cycle by human herpesvirus 6. *J Virol* **67**:6768-77.
- Fleckenstein, B., and R. C. Desrosiers.** 1982. Herpesvirus Saimiri and Herpesvirus Ateles. *The Herpesviruses Vol.1*.
- Flemington, E., and S. H. Speck.** 1990a. Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol* **64**:1227-32.
- Flemington, E., and S. H. Speck.** 1990b. Identification of phorbol ester response elements in the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol* **64**:1217-26.
- Flemington, E. K.** 2001. Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments. *J Virol* **75**:4475-81.
- Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**:436-41.
- Gao, X., K. Ikuta, M. Tajima, and T. Sairenji.** 2001. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces Epstein-Barr virus reactivation via NF-kappaB and AP-1 as regulated by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *Virology* **286**:91-9.

- Gao, Z., A. Krithivas, J. E. Finan, O. J. Semmes, S. Zhou, Y. Wang, and S. D. Hayward.** 1998. The Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta interacts with the helicase-primase replication proteins. *J Virol* **72**:8559-67.
- Gentile, G.** 2000. Post-transplant HHV-6 Diseases. *Herpes* **7**:24-27.
- Giot, J. F., I. Mikaelian, M. Buisson, E. Manet, I. Joab, J. C. Nicolas, and A. Sergeant.** 1991. Transcriptional interference between the EBV transcription factors EB1 and R: both DNA-binding and activation domains of EB1 are required. *Nucleic Acids Res* **19**:1251-8.
- Goltz, M., T. Ericsson, C. Patience, C. A. Huang, S. Noack, D. H. Sachs, and B. Ehlers.** 2002. Sequence analysis of the genome of porcine lymphotropic herpesvirus 1 and gene expression during posttransplant lymphoproliferative disease of pigs. *Virology* **294**:383-93.
- Goltz, M., F. Widen, M. Banks, S. Belak, and B. Ehlers.** 2000. Characterization of the DNA polymerase loci of porcine cytomegaloviruses from diverse geographic origins. *Virus Genes* **21**:249-55.
- Goodwin, D. J., K. T. Hall, M. S. Giles, M. A. Calderwood, A. F. Markham, and A. Whitehouse.** 2000. The carboxy terminus of herpesvirus saimiri ORF57 gene contains domains that are required for transactivation and transrepression. *J Gen Virol* **81**: 2253-65
- Gradoville, L., J. Gerlach, E. Grogan, D. Shedd, S. Nikiforow, C. Metroka, and G. Miller.** 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. *J Virol* **74**:6207-12.
- Gradoville, L., D. Kwa, A. El-Guindy, and G. Miller.** 2002. Protein kinase C-independent activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J Virol* **76**:5612-26.
- Griffiths, P. D., M. Ait-Khaled, C. P. Bearcroft, D. A. Clark, A. Quaglia, S. E. Davies, A. K. Burroughs, K. Rolles, I. M. Kidd, S. N. Knight, S. M. Noibi, A. V. Cope, A. N. Phillips, and V. C. Emery.** 1999. Human herpesviruses 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *J Med Virol* **59**:496-501.
- Grogan, E., H. Jenson, J. Countryman, L. Heston, L. Gradoville, and G. Miller.** 1987. Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:1332-6.
- Groth, C. G., O. Korsgren, L. Wennberg, Z. Song, G. Wu, F. Reinholt, and A. Tibell.** 1998. Pig-to-human islet transplantation. *Transplant Proc* **30**:3809-10.
- Gruffat, H., J. Batisse, D. Pich, B. Neuhierl, E. Manet, W. Hammerschmidt, and A. Sergeant.** 2002a. Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *J Virol* **76**:9635-44.
- Gruffat, H., N. Duran, M. Buisson, F. Wild, R. Buckland, and A. Sergeant.** 1992. Characterization of an R-binding site mediating the R-induced activation of the Epstein-Barr virus BMLF1 promoter. *J Virol* **66**:46-52.
- Gruffat, H., E. Manet, A. Rigolet, and A. Sergeant.** 1990. The enhancer factor R of Epstein-Barr virus (EBV) is a sequence-specific DNA binding protein. *Nucleic Acids Res* **18**:6835-43
- Gruffat, H., E. Manet, and A. Sergeant.** 2002b. MEF2-mediated recruitment of class II HDAC at the EBV immediate early gene BZLF1 links latency and chromatin remodeling. *EMBO Rep* **3**:141-6.
- Gruffat, H., S. Portes-Sentis, A. Sergeant, and E. Manet.** 1999. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) encodes a homologue of the Epstein-Barr virus bZip protein EB1. *J Gen Virol* **80** (Pt 3):557-61.
- Gruffat, H., and A. Sergeant.** 1994. Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acids Res* **22**:1172-8.

- Gultekin, H., and K. H. Heermann.** 1988. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* **172**:320-9
- Gunzburg, W. H., and B. Salmons.** 2000. Xenotransplantation: is the risk of viral infection as great as we thought? *Mol Med Today* **6**:199-208.
- Gupta, A. K., V. Ruvolo, C. Patterson, and S. Swaminathan.** 2000. The human herpesvirus 8 homolog of Epstein-Barr virus SM protein (KS-SM) is a posttranscriptional activator of gene expression. *J Virol* **74**:1038-44.
- Gwack, Y., H. Byun, S. Hwang, C. Lim, and J. Choe.** 2001a. CREB-binding protein and histone deacetylase regulate the transcriptional activity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50. *J Virol* **75**:1909-17.
- Gwack, Y., S. Hwang, H. Byun, C. Lim, J. W. Kim, E. J. Choi, and J. Choe.** 2001b. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50 represses p53-induced transcriptional activity and apoptosis. *J Virol* **75**:6245-8.
- Gwack, Y., S. Hwang, C. Lim, Y. S. Won, C. H. Lee, and J. Choe.** 2002. Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50 stimulates the transcriptional activity of STAT3. *J Biol Chem* **277**:6438-42.
- Gwack, Y., H. Nakamura, S. H. Lee, J. Souvlis, J. T. Yustein, S. Gygi, H. J. Kung, and J. U. Jung.** 2003. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 and Ste20-like kinase hKFC act as transcriptional repressors for gamma-2 herpesvirus lytic replication. *Mol Cell Biol* **23**:8282-94.
- Hammer, C., and E. Thein.** 2002. Physiological aspects of xenotransplantation, 2001. *Xenotransplantation* **9**:303-5.
- Hammerschmidt, W., and B. Sugden.** 1988. Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* **55**:427-33.
- Han, Z., and S. Swaminathan.** 2006. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic gene ORF57 is essential for infectious virion production. *J Virol* **80**:5251-60.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80
- Hanto, D. W., G. Frizzera, K. J. Gajl-Peczalska, and R. L. Simmons.** 1985. Epstein-Barr virus, immunodeficiency, and B cell lymphoproliferation. *Transplantation* **39**:461-72.
- Hardwick, J. M., P. M. Lieberman, and S. D. Hayward.** 1988. A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen. *J Virol* **62**:2274-84.
- Hardwick, J. M., L. Tse, N. Applegren, J. Nicholas, and M. A. Veluona.** 1992. The Epstein-Barr virus R transactivator (Rta) contains a complex, potent activation domain with properties different from those of VP16. *J Virol* **66**:5500-8.
- Hardy, W. R., and R. M. Sandri-Goldin.** 1994. Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. *J Virol* **68**:7790-9.
- Herbst, H.** 1996. Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Semin Cancer Biol* **7**:183-9.
- Higuchi R., G. Dollinger, P. S. Walsh, R. Griffith.** 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* **10**: 413-7.
- Hiriart, E., G. Farjot, H. Gruffat, M. V. Nguyen, A. Sereant, and E. Manet.** 2003. A novel nuclear export signal and a REF interaction domain both promote mRNA export by the Epstein-Barr virus EB2 protein. *J Biol Chem* **278**:335-42

- Holley-Guthrie, E. A., E. B. Quinlivan, E. C. Mar, and S. Kenney.** 1990. The Epstein-Barr virus (EBV) BMLF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *J Virol* **64**:3753-9.
- Holmes, G. P., L. E. Chapman, J. A. Stewart, S. E. Straus, J. K. Hilliard, and D. S. Davenport.** 1995. Guidelines for the prevention and treatment of B-virus infections in exposed persons. The B virus Working Group. *Clin Infect Dis* **20**:421-39.
- Hopwood, P., and D. H. Crawford.** 2000. The role of EBV in post-transplant malignancies: a review. *J Clin Pathol* **53**:248-54.
- Hsieh, W. S., M. V. Lemas, and R. F. Ambinder.** 1999. The biology of Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis* **1**:204-12.
- Huang, C. A., Y. Fuchimoto, Z. L. Gleit, T. Ericsson, A. Griesemer, R. Scheier-Dolberg, E. Melendy, H. Kitamura, J. A. Fishman, J. A. Ferry, N. L. Harris, C. Patience, and D. H. Sachs.** 2001. Posttransplantation lymphoproliferative disease in miniature swine after allogeneic hematopoietic cell transplantation: similarity to human PTLN and association with a porcine gammaherpesvirus. *Blood* **97**:1467-73.
- Huang, M. T. F., and C. M. Gorman.** 1990. Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Res* **18**:937-47
- Huang, J., G. Liao, H. Chen, F. Y. Wu, L. Hutt-Fletcher, G. S. Hayward, and S. D. Hayward.** 2006. Contribution of C/EBP proteins to Epstein-Barr virus lytic gene expression and replication in epithelial cells. *J Virol* **80**:1098-109.
- Irgang, M., I. M. Sauer, A. Karlas, K. Zeilinger, J. C. Gerlach, R. Kurth, P. Neuhaus, and J. Denner.** 2003. Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J Clin Virol* **28**:141-54.
- Izumiya, Y., T. J. Ellison, E. T. H. Yeh, J. U. Jung, P. A. Luciw, and H. J. Kung.** 2005. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP represses gene transcription via SUMO modification. *J Virol* **79**: 9912-25
- Izumiya, Y., S. F. Lin, T. Ellison, L. Y. Chen, C. Izumiya, P. Luciw, and H. J. Kung.** 2003b. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP is a coregulator of K-Rta: physical association and promoter-dependent transcriptional repression. *J Virol* **77**:1441-51.
- Izumiya, Y., S. F. Lin, T. J. Ellison, A. M. Levy, G. L. Mayeur, C. Izumiya, and H. J. Kung.** 2003a. Cell cycle regulation by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP: direct interaction with cyclin-CDK2 and induction of G1 growth arrest. *J Virol* **77**:9652-61.155.
- Jenkins, P. J., Binne, U. K., and P. J. Farrell.** 2000. Histone acetylation and reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *J Virol* **74**: 710-20
- Jeong, J., J. Papin, and D. Dittmer.** 2001. Differential regulation of the overlapping Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vGCR (orf74) and LANA (orf73) promoters. *J Virol* **75**:1798-807.
- Johnson, E. D., B. K. Johnson, D. Silverstein, P. Tukei, T. W. Geisbert, A. N. Sanchez, and P. B. Jahrling.** 1996. Characterization of a new Marburg virus isolated from a 1987 fatal case in Kenya. *Arch Virol Suppl* **11**:101-14.
- Kamohara, Y., J. Rozga, and A. A. Demetriou.** 1998. Artificial liver: review and Cedar-Sinai experience. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **5**:273-85.
- Kenney, S., E. Holley-Guthrie, E. C. Mar, and M. Smith.** 1989a. The Epstein-Barr virus BMLF1 promoter contains an enhancer element that is responsive to the BZLF1 and BRLF1 transactivators. *J Virol* **63**:3878-83.

- Kenney, S., J. Kamine, E. Holley-Guthrie, E. C. Mar, J. C. Lin, D. Markovitz, and J. Pagano.** 1989b. The Epstein-Barr virus immediate-early gene product, BMLF1, acts in trans by a posttranscriptional mechanism which is reporter gene dependent. *J Virol* **63**:3870-7.
- Kieff, E., and A. B. Rickinson.** 2001. Epstein-Barr virus and its replication, vol. 2. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Kirshner, J. R., D. M. Lukac, J. Chang, and D. Ganem.** 2000. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 57 encodes a posttranscriptional regulator with multiple distinct activities. *J Virol* **74**:3586-97.
- Knecht, H., C. Berger, A. S. al-Homsi, C. McQuain, and P. Brousset.** 1997. Epstein-Barr virus oncogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* **26**:117-35.
- Knox, K. K., and D. R. Carrigan.** 1994. HHV-6 and CMV pneumonitis in immunocompromised patients. *Lancet* **343**:1647.
- Knox, K. K., and D. R. Carrigan.** 1992. In vitro suppression of bone marrow progenitor cell differentiation by human herpesvirus 6 infection. *J Infect Dis* **165**:925-9.
- Koffa, M. D., J. B. Clements, E. Izaurralde, S. Wadd, S. A. Wilson, I. W. Mattaj, and S. Kuersten.** 2001. Herpes simplex virus ICP27 protein provides viral mRNAs with access to the cellular mRNA export pathway. *EMBO J* **20**: 5769-78
- Kolman, J. L., N. Taylor, L. Gradoville, J. Countryman, and G. Miller.** 1996. Comparing transcriptional activation and autostimulation by ZEBRA and ZEBRA/c-Fos chimeras. *J Virol* **70**:1493-504.
- Kotton, C. N., and J. A. Fishman.** 2005. Viral infection in the renal transplant recipient. *J Am Soc Nephrol* **16**:1758-74.
- Kraus, R. J., S. J. Mirocha, H. M. Stephany, J. R. Puchalski, and J. E. Mertz.** 2001. Identification of a novel element involved in regulation of the lytic switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol* **75**:867-77.
- Lacoste, V., C. de la Fuente, F. Kashanchi, and A. Pumfery.** 2004. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immediate early gene activity. *Front Biosci* **9**:2245-72.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
- Lai, L., D. Kolber-Simonds, K. W. Park, H. T. Cheong, J. L. Greenstein, G. S. Im, M. Samuel, A.** 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* **295**:1089-92.
- Lavitrano, M., M. L. Bacci, M. Forni, D. Lazzereschi, C. Di Stefano, D. Fioretti, P. Giancotti, G. Marfe, L. Pucci, L. Renzi, H. Wang, A. Stoppacciaro, G. Stassi, M. Sargiacomo, P. Sinibaldi, V. Turchi, R. Giovannoni, G. Della Casa, E. Seren, and G. Rossi.** 2002. Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14230-5.
- Le Roux, F., A. Sergeant, and L. Corbo.** 1996. Epstein-Barr virus (EBV) EB1/Zta protein provided in trans and competent for the activation of productive cycle genes does not activate the BZLF1 gene in the EBV genome. *J Gen Virol* **77**: 501-9
- Levitskaya, J., M. Coram, V. Levitsky, S. Imreh, P. Steigerwald-Mullen, G. Klein, M. Kurilla, and M. Masucci.** 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* **375**:685-688.

- Li, S. F., F. A. Neethling, S. Taniguchi, J. C. Yeh, T. Kobayashi, Y. Ye, E. Koren, R. D. Cummings, and D. K. Cooper.** 1996. Glycans derived from porcine stomach mucin are effective inhibitors of natural anti-alpha-galactosyl antibodies in vitro and after intravenous infusion in baboons. *Transplantation* **62**:1324-31.
- Liang, Y., J. Chang, S. J. Lynch, D. M. Lukac, and D. Ganem.** 2002. The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* **16**:1977-89.
- Liao, W., Y. Tang, S. F. Lin, H. J. Kung, and C. Z. Giam.** 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. *J Virol* **77**:3809-15.
- Lieberman, P. M., J. M. Hardwick, J. Sample, G. S. Hayward, and S. D. Hayward.** 1990. The zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus-infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions. *J Virol* **64**:1143-55.
- Lin, C. L., H. Li, Y. Wang, F. X. Zhu, S. Kudchodkar, and Y. Yuan.** 2003. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic origin (ori-Lyt)-dependent DNA replication: identification of the ori-Lyt and association of K8 bZip protein with the origin. *J Virol* **77**:5578-88.
- Lin, S. F., D. R. Robinson, G. Miller, and H. J. Kung.** 1999. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a bZIP protein with homology to BZLF1 of Epstein-Barr virus. *J Virol* **73**:1909-17.
- Lindner, I., B. Ehlers, S. Noack, G. Dural, N. Yasmum, C. Bauer, and M. Goltz.** 2007. The porcine lymphotropic herpesvirus 1 encodes functional regulators of gene expression. *Virology* **357**:134-48.
- Liu, C., N. D. Sista, and J. S. Pagano.** 1996. Activation of the Epstein-Barr virus DNA polymerase promoter by the BRLF1 immediate-early protein is mediated through USF and E2F. *J Virol* **70**:2545-55.
- Liu, P., S. Liu, and S. H. Speck.** 1998. Identification of a negative cis element within the ZII domain of the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *J Virol* **72**:8230-9.
- Liu, P., and S. H. Speck.** 2003. Synergistic autoactivation of the Epstein-Barr virus immediate-early BRLF1 promoter by Rta and Zta. *Virology* **310**:199-206.
- Liu, S., A. M. Borrás, P. Liu, G. Suske, and S. H. Speck.** 1997. Binding of the ubiquitous cellular transcription factors Sp1 and Sp3 to the ZI domains in the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *Virology* **228**:11-8.
- Ljungman, P.** 2002. Beta-herpesvirus challenges in the transplant recipient. *J Infect Dis* **186 Suppl 1**:S99-S109.
- Logan, J. S.** (2000). Prospects for Xenotransplantation. *Curr Opin Immunol* **12** (5):563-68
- Loken, T., M. Aleksandersen, H. Reid, and I. Pow.** 1998. Malignant catarrhal fever caused by ovine herpesvirus-2 in pigs in Norway. *Vet Rec* **143**:464-7.
- Lu, C., Y. Zeng, Z. Huang, L. Huang, C. Qian, G. Tang, and D. Qin.** 2005. Human herpesvirus 6 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Am J Pathol* **166**:173-83.
- Lu, M., and T. Shenk.** 1999. Human cytomegalovirus UL69 protein induces cells to accumulate in G1 phase of the cell cycle. *J Virol* **73**:676-83.
- Ludwig, B., F. B. Kraus, R. Allwinn, H. W. Doerr, and W. Preiser.** 2003. Viral zoonoses - a threat under control? *Intervirology* **46**:71-8.
- Luka, J., B. Kallin, and G. Klein.** 1979. Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology* **94**:228-31.

- Lukac, D. M., L. Garibyan, J. R. Kirshner, D. Palmeri, and D. Ganem.** 2001. DNA binding by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein is necessary for transcriptional activation of two viral delayed early promoters. *J Virol* **75**:6786-99.
- Lukac, D. M., J. R. Kirshner, and D. Ganem.** 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. *J Virol* **73**:9348-61.
- Lukac, D. M., R. Renne, J. R. Kirshner, and D. Ganem.** 1998. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology* **252**:304-12.
- MacGregor, G. R., Mogg, A. E., Burke, J. F., and C. T. Caskey.** 1987. Histochemical staining of clonal mammalian cells lines expressing E. coli beta galactosidase indicates heterogeneous expression of the bacterial gene. *Somat Cell Mol Genet* **13**:253-65
- MacLean, H. J., and A. G. Douen.** 2002. Severe amnesia associated with human herpesvirus 6 encephalitis after bone marrow transplantation. *Transplantation* **73**:1086-9.
- Malchesky, P.** 2004. Artificial organs 2003: a year in review. *Artif Organs* **28**:410-424.
- Malik, P., D. J. Blackbourn, M. F. Cheng, G. S. Hayward, and J. B. Clements.** 2004a. Functional co-operation between the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 and ORF50 regulatory proteins. *J Gen Virol* **85**:2155-66.
- Malik, P., D. J. Blackbourn, and J. B. Clements.** 2004b. The evolutionarily conserved Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein interacts with REF protein and acts as an RNA export factor. *J Biol Chem* **279**:33001-11.
- Manet, E., C. Allera, H. Gruffat, I. Mikaelian, A. Rigolet, and A. Sergeant.** 1993. The acidic activation domain of the Epstein-Barr virus transcription factor R interacts in vitro with both TBP and TFIIB and is cell-specifically potentiated by a proline-rich region. *Gene Expr* **3**:49-59.
- Manet, E., H. Gruffat, M. C. Trescol-Biemont, N. Moreno, P. Chambard, J. F. Giot, and A. Sergeant.** 1989. Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators. *Embo J* **8**:1819-26.
- Manet, E., A. Rigolet, H. Gruffat, J. F. Giot, and A. Sergeant.** 1991. Domains of the Epstein-Barr virus (EBV) transcription factor R required for dimerization, DNA binding and activation. *Nucleic Acids Res* **19**:2661-7.
- Mankertz, A., M. Domingo, J. M. Folch, P. LeCann, A. Jestin, J. Segales, B. Chmielewicz, J. Plana-Duran, and D. Soike.** 2000. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res* **66**:65-77.
- Mankertz, A., F. Persson, J. Mankertz, G. Blaess, and H. J. Buhk.** 1997. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* **71**:2562-6.
- Marshall, W. L., C. Yim, E. Gustafson, T. Graf, D. R. Sage, K. Hanify, L. Williams, J. Fingerroth, and R. W. Finberg.** 1999. Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak. *J Virol* **73**:5181-5.
- Mauser, A., S. Saito, E. Appella, C. W. Anderson, W. T. Seaman, and S. Kenney.** 2002. The Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 regulates p53 function through multiple mechanisms. *J Virol* **76**:12503-12.
- McGeoch, D. J., F. J. Rixon, and A. J. Davison.** 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* **117**:90-104
- McInnes, E. F., R. F. Jarrett, G. Langford, C. Atkinson, J. Horsley, M. J. Goddard, E. Cozzi, and H. J. Schuurman.** 2002. Posttransplant lymphoproliferative disorder associated with primate gamma-

herpesvirus in cynomolgus monkeys used in pig-to-primate renal xenotransplantation and primate renal allotransplantation. *Transplantation* **73**:44-52.

Mears, W. E., and S. A. Rice. 1996. The RGG box motif of the herpes simplex virus ICP27 protein mediates an RNA-binding activity and determines in vivo methylation. *J Virol* **70**: 7445-53

Meng, X. J., P. G. Halbur, M. S. Shapiro, S. Govindarajan, J. D. Bruna, I. K. Mushahwar, R. H. Purcell, and S. U. Emerson. 1998. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* **72**:9714-21.

Meng, X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thacker, and S. U. Emerson. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:9860-5.

Mercader, M., B. J. Nickoloff, and K. E. Foreman. 2001. Induction of human immunodeficiency virus 1 replication by human herpesvirus 8. *Arch Pathol Lab Med* **125**:785-9.

Michaels, M. G., and R. L. Simmons. 1994. Xenotransplant-associated zoonoses. Strategies for prevention. *Transplantation* **57**:1-7.

Miller, G. 1989. The switch between EBV latency and replication. *Yale J Biol Med* **62**:205-13.

Miller, G., L. Heston, E. Grogan, L. Gradoville, M. Rigsby, R. Sun, D. Shedd, V. M. Kushnaryov, S. Grossberg, and Y. Chang. 1997. Selective switch between latency and lytic replication of Kaposi's sarcoma herpesvirus and Epstein-Barr virus in dually infected body cavity lymphoma cells. *J Virol* **71**:314-24.

Modrow, S. 2003. "Molekulare Virologie". 2 ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin.

Morrison, T. E., A. Mauser, A. Wong, J. P. Ting, and S. C. Kenney. 2001. Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity* **15**:787-99.

Mosca, J. D., D. P. Bednarik, N. B. Raj, C. A. Rosen, J. G. Sodroski, W. A. Haseltine, G. S. Hayward, and P. M. Pitha. 1987. Activation of human immunodeficiency virus by herpesvirus infection: identification of a region within the long terminal repeat that responds to a trans-acting factor encoded by herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7408-12.

Mueller, N. J., and J. A. Fishman. 2004. Herpesvirus infections in xenotransplantation: pathogenesis and approaches. *Xenotransplantation* **11**:486-90.

Mueller, N. J., K. Kuwaki, C. Knosalla, F. J. Dor, B. Gollackner, R. A. Wilkinson, S. Arn, D. H. Sachs, D. K. Cooper, and J. A. Fishman. 2005. Early weaning of piglets fails to exclude porcine lymphotropic herpesvirus. *Xenotransplantation* **12**:59-62.

Mueller, N. J., C. Livingston, C. Knosalla, R. N. Barth, S. Yamamoto, B. Gollackner, F. J. Dor, L. Buhler, D. H. Sachs, K. Yamada, D. K. Cooper, and J. A. Fishman. 2004. Activation of porcine cytomegalovirus, but not porcine lymphotropic herpesvirus, in pig-to-baboon xenotransplantation. *J Infect Dis* **189**:1628-33.

Muller, S., A. Ledl, and D. Schmidt. 2004. SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* **23**:1998-2008

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263-73.

Neuhof, H. 1923. The transplantation of tissues. New York: Appelton.

Nicewonger, J., G. Suck, D. Bloch, and S. Swaminathan. 2004. Epstein-Barr virus (EBV) SM protein induces and recruits cellular Sp110b to stabilize mRNAs and enhance EBV lytic gene expression. *J Virol* **78**:9412-22.

- Niedobitek, G., A. Agathangelou, H. Herbst, L. Whitehead, D. H. Wright, and L. S. Young.** 1997. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* **182**:151-9.
- Onions, D., D. K. Cooper, T. J. Alexander, C. Brown, E. Claassen, J. E. Foweraker, D. L. Harris, B. W. Mahy, P. D. Minor, A. D. Osterhaus, P. P. Pastoret, and K. Yamanouchi.** 2000. An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation* **7**:143-55.
- Panagiotidis, C. A., E. K. Lium, and S. J. Silverstein.** 1997. Physical and functional interactions between herpes simplex virus immediate-early proteins ICP4 and ICP27. *J Virol* **71**: 1547-57
- Paradis, K., G. Langford, Z. Long, W. Heneine, P. Sandstrom, W. M. Switzer, L. E. Chapman, C. Lockey, D. Onions, and E. Otto.** 1999. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* **285**:1236-41.
- Park, J., T. Seo, S. Hwang, D. Lee, Y. Gwack, and J. Choe.** 2000. The K-bZIP protein from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with p53 and represses its transcriptional activity. *J Virol* **74**:11977-82.
- Patience, C., G. S. Patton, Y. Takeuchi, R. A. Weiss, M. O. McClure, L. Rydberg, and M. E. Breimer.** 1998. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* **352**:699-701.
- Patience, C., W. M. Switzer, Y. Takeuchi, D. J. Griffiths, M. E. Goward, W. Heneine, J. P. Stoye, and R. A. Weiss.** 2001. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J Virol* **75**:2771-5.
- Patience, C., Y. Takeuchi, and R. A. Weiss.** 1997. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* **3**:282-6.
- Phelps, C. J., C. Koike, T. D. Vaught, J. Boone, K. D. Wells, S. H. Chen, S. Ball, S. M. Specht, I. A. Polejaeva, J. A. Monahan, P. M. Jobst, S. B. Sharma, A. E. Lamborn, A. S. Garst, M. Moore, A. J. Demetris, W. A. Rudert, R. Bottino, S. Bertera, M. Trucco, T. E. Starzl, Y. Dai, and D. L. Ayares.** 2003. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* **299**:411-4.
- Plonait, H., and K. Bickhardt.** 1997. "Lehrbuch der Schweinekrankheiten." 2 ed. Parey Buchverlag, Berlin.
- Polson, A. G., L. Huang, D. M. Lukac, J. D. Blethrow, D. O. Morgan, A. L. Burlingame, and D. Ganem.** 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP protein is phosphorylated by cyclin-dependent kinases. *J Virol* **75**:3175-84.
- Portes-Sentis, S., E. Manet, G. Gourru, A. Sergeant, and H. Gruffat.** 2001. Identification of a short amino acid sequence essential for efficient nuclear targeting of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 K8 protein. *J Gen Virol* **82**:507-12.
- Princeteau, L.** 1905. Greffe renale (Kidney transplantation). *J Med Bordeaux* **26**.
- Quaia, M., P. Zancai, R. Cariati, S. Rizzo, M. Boiocchi, and R. Dolcetti.** 2000. Glucocorticoids promote the proliferation and antagonize the retinoic acid-mediated growth suppression of Epstein-Barr virus-immortalized B lymphocytes. *Blood* **96**:711-8.
- Quinlivan, E. B., E. Holley-Guthrie, E. C. Mar, M. S. Smith, and S. Kenney.** 1990. The Epstein-Barr virus BRLF1 immediate-early gene product transactivates the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by a mechanism which is enhancer independent. *J Virol* **64**:1817-20.
- Quinlivan, E. B., E. A. Holley-Guthrie, M. Norris, D. Gutsch, S. L. Bachenheimer, and S. C. Kenney.** 1993. Direct BRLF1 binding is required for cooperative BZLF1/BRLF1 activation of the Epstein-Barr virus early promoter, BMRF1. *Nucleic Acids Res* **21**:1999-2007.

- Raab-Traub, N., K. Flynn, G. Pearson, A. Huang, P. Levine, A. Lanier, and J. Pagano.** 1987. The differentiated form of nasopharyngeal carcinoma contains Epstein-Barr virus DNA. *Int J Cancer* **39**:25-9.
- Radonic, A., S. Thulke, I. M. Mackay, O. Landt, W. Siegert, and A. Nitsche.** 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **313**:856-62.
- Ragoczy, T., L. Heston, and G. Miller.** 1998. The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *J Virol* **72**:7978-84.
- Ragoczy, T., and G. Miller.** 2001. Autostimulation of the Epstein-Barr virus BRLF1 promoter is mediated through consensus Sp1 and Sp3 binding sites. *J Virol* **75**:5240-51.
- Ragoczy, T., and G. Miller.** 1999. Role of the Epstein-Barr virus RTA protein in activation of distinct classes of viral lytic cycle genes. *J Virol* **73**:9858-66.
- Razonable, R. R., K. W. Burak, H. van Cruijssen, R. A. Brown, M. R. Charlton, T. F. Smith, M. J. Espy, W. Kremers, J. A. Wilson, C. Groettum, R. Wiesner, and C. V. Paya.** 2002. The pathogenesis of hepatitis C virus is influenced by cytomegalovirus. *Clin Infect Dis* **35**:974-81.
- Razonable, R. R., and C. V. Paya.** 2002. The impact of human herpesvirus-6 and -7 infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl* **8**:651-8.
- Reemtsma, K., B. H. McCracken, J. U. Schlegel, and M. Pearl.** 1964. Heterotransplantation Of The Kidney: Two Clinical Experiences. *Science* **143**:700-2.
- Reid, H., and D. Buxton.** 1989. Malignant catarrhal fever and the Gammaherpesvirinae of Bovidae. In "Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs" (Wittmann, G., Ed.), Kluwer, Boston:116-162.
- Reinke, P., S. Prosch, F. Kern, and H. D. Volk.** 1999. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis* **1**:157-64.
- Renne, R., W. Zhong, B. Herndier, M. McGrath, N. Abbey, D. Kedes, and D. Ganem.** 1996. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med* **2**:342-6.
- Rickabaugh, T. M., H. J. Brown, T. T. Wu, M. J. Song, S. Hwang, H. Deng, K. Mitsouras, and R. Sun.** 2005. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 RTA reactivates murine gammaherpesvirus 68 from latency. *J Virol* **79**:3217-22.
- Rooney, C. M., D. T. Rowe, T. Ragot, and P. J. Farrell.** 1989. The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle. *J Virol* **63**:3109-16.
- Ruvolo, V., A. K. Gupta, and S. Swaminathan.** 2001. Epstein-Barr virus SM protein interacts with mRNA in vivo and mediates a gene-specific increase in cytoplasmic mRNA. *J Virol* **75**:6033-41.
- Ruvolo, V., L. Sun, K. Howard, S. Sung, H. J. Delecluse, W. Hammerschmidt, and S. Swaminathan.** 2004. Functional analysis of Epstein-Barr virus SM protein: identification of amino acids essential for structure, transactivation, splicing inhibition, and virion production. *J Virol* **78**:340-52.
- Ruvolo, V., E. Wang, S. Boyle, and S. Swaminathan.** 1998. The Epstein-Barr virus nuclear protein SM is both a post-transcriptional inhibitor and activator of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8852-7.
- Sachs, D. H.** 1994. The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol* **43**:185-91.
- Sacks, W. R., C. C. Greene, D. P. Aschman, and P.A. Schaffer.** (1985). Herpes Simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. *J Virol* **55**:796-805

- Sakakibara, S., K. Ueda, J. Chen, T. Okuno, and K. Yamanishi.** 2001. Octamer-binding sequence is a key element for the autoregulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50/Lyta gene expression. *J Virol* **75**:6894-900.
- Sambrook, J., T. Maniatis, and E. Fritsch.** 1989. "Molecular cloning: a laboratory manual." 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandri-Goldin, R. M.** 1998. ICP27 mediates HSV RNA export by shuttling through a leucine-rich nuclear export signal and binding viral intronless RNAs through an RGG motif. *Genes Dev* **12**:868-79.
- Sandri-Goldin, R. M., and G. E. Mendoza.** 1992. A herpesvirus regulatory protein appears to act post-transcriptionally by affecting mRNA processing. *Genes Dev* **6**:848-63.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7.
- Santoni, F., I. Lindner, E. Caselli, M. Goltz, D. D. Luca, and B. Ehlers.** 2006. Molecular interactions between porcine and human gammaherpesviruses: implications for xenografts? *Xenotransplantation* **13**:308-17.
- Saveliev, A., F. Zhu, and Y. Yuan.** 2002. Transcription mapping and expression patterns of genes in the major immediate-early region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology* **299**:301-14.
- Sawitzky, D.** 1997. Transmission, species specificity, and pathogenicity of Aujeszky's disease virus. *Arch Virol Suppl* **13**:201-6.
- Schepers, A., D. Pich, and W. Hammerschmidt.** 1993. A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *Embo J* **12**:3921-9.
- Schepers, A., D. Pich, and W. Hammerschmidt.** 1996. Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1. *Virology* **220**:367-76.
- Schmoeckel, M., G. Nollert, M. Shahmohammadi, J. Muller-Hocker, V. K. Young, W. Kasper-Konig, D. J. White, C. Hammer, and B. Reichart.** 1997. Transgenic human decay accelerating factor makes normal pigs function as a concordant species. *J Heart Lung Transplant* **16**:758-64.
- Schulz, T. F.** 2000. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8): epidemiology and pathogenesis. *J Antimicrob Chemother* **45 Suppl T3**:15-27.
- Schuurman, H. J., G. Pino-Chavez, M. J. Phillips, L. Thomas, D. J. White, and E. Cozzi.** 2002. Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors. *Transplantation* **73**:1146-51.
- Schwarzmann, F., M. Jager, N. Prang, and H. Wolf.** 1998. The control of lytic replication of Epstein-Barr virus in B lymphocytes (Review). *Int J Mol Med* **1**:137-42.
- Seaman, W. T., D. Ye, R. X. Wang, E. E. Hale, M. Weisse, and E. B. Quinlivan.** 1999. Gene expression from the ORF50/K8 region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology* **263**:436-49.
- Sekulovich, R. E., K. Leary, and R. M. Sandri-Goldin.** 1988. The herpes simplex virus type 1 alpha protein ICP27 can act as a trans-repressor or a trans-activator in combination with ICP4 and ICP0. *J Virol* **62**:4510-22.
- Semmes, O. J., L. Chen, R. T. Sarisky, Z. Gao, L. Zhong, and S. D. Hayward.** 1998. Mta has properties of an RNA export protein and increases cytoplasmic accumulation of Epstein-Barr virus replication gene mRNA. *J Virol* **72**:9526-34.
- Shafren, D. R., R. C. Bates, M. V. Agrez, R. L. Herd, G. F. Burns, and R. D. Barry.** 1995. Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J Virol* **69**:3873-7.

- Sinclair, A. J.** 2003. bZIP proteins of human gammaherpesviruses. *J Gen Virol* **84**:1941-9.
- Sinclair, A. J., M. Brimmell, F. Shanahan, and P. J. Farrell.** 1991. Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *J Virol* **65**:2237-44.
- Singh, N.** 2000. Human herpesviruses-6, -7 and -8 in organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* **6**:453-9.
- Singh, N.** 2005. Interactions between viruses in transplant recipients. *Clin Infect Dis* **40**:430-6.
- Smith, C. E., D. I. Simpson, E. T. Bowen, and I. Zlotnik.** 1967. Fatal human disease from vervet monkeys. *Lancet* **2**:1119-21.
- Soin, B., K. G. Smith, A. Zaidi, E. Cozzi, J. R. Bradley, D. J. Ostlie, A. Lockhart, D. J. White, and P. J. Friend.** 2001. Physiological aspects of pig-to-primate renal xenotransplantation. *Kidney Int* **60**:1592-7.
- Solassol, J., K. A. Kreuzer, U. Lass, and C. A. Schmidt.** 2001. Epstein-Barr virus DNA quantitation assessed by a real-time polymerase chain reaction in a case of Burkitt's lymphoma. *Leuk Lymphoma* **41**:669-73.
- Song, M. J., H. Deng, and R. Sun.** 2003. Comparative study of regulation of RTA-responsive genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *J Virol* **77**: 9451-62
- Song, M. J., X. Li, H. J. Brown, and R. Sun.** 2002. Characterization of interactions between RTA and the promoter of polyadenylated nuclear RNA in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *J Virol* **76**:5000-13.
- Soulier, J., L. Grollet, E. Oksenhendler, P. Cacoub, D. Cazals-Hatem, P. Babinet, M. F. d'Agay, J. P. Clauvel, M. Raphael, L. Degos, and et al.** 1995. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* **86**:1276-80.
- Speck, S. H., T. Chatila, and E. Flemington.** 1997. Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol* **5**:399-405.
- Specke, V., S. Rubant, and J. Denner.** 2001. Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology* **285**:177-80.
- Spengler, M. L., W. T. Ruyechan, and J. Hay.** 2000. Physical interaction between two varicella zoster virus gene regulatory proteins, IE4 and IE62. *Virology* **272**: 375-81
- Sun, R., S. F. Lin, L. Gradoville, Y. Yuan, F. Zhu, and G. Miller.** 1998. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:10866-71.
- Takada, K., N. Shimizu, S. Sakuma, and Y. Ono.** 1986. trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *J Virol* **57**:1016-22.
- Tanczos, E., R. Horch, H. Bannasch, C. Andree, K. Walgenbach, M. Voigt, and G. Stark.** 1999. (Keratinocyte transplantation and tissue engineering. New approaches in treatment of chronic wounds). *Zentralbl Chir* **124 Suppl 1**:81-86.
- Tanner, J., J. Weis, D. Fearon, Y. Whang, and E. Kieff.** 1987. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* **50**:203-13.
- Tanner, J. E., and C. Alfieri.** 1999. Epstein-Barr virus induces Fas (CD95) in T cells and Fas ligand in B cells leading to T-cell apoptosis. *Blood* **94**:3439-47
- Taubenberger, J. K., A. H. Reid, A. E. Krafft, K. E. Bijwaard, and T. G. Fanning.** 1997. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* **275**:1793-6.
- Thonur, L., Russell, G. C., Stewart, J. P., and D. M. Haig.** 2006. Differential transcription of ovine herpesvirus 2 genes in lymphocytes from reservoir and susceptible species. *Virus Genes* **32**:27-35

- Tolkoff-Rubin, N. E., and R. H. Rubin.** 1998. Viral infections in organ transplantation. *Transplant Proc* **30**:2060-3.
- Tucker, A. W., D. Galbraith, P. McEwan, and D. Onions.** 1999. Evaluation of porcine cytomegalovirus as a potential zoonotic agent in xenotransplantation. *Transplant Proc* **31**:915.
- Tucker, A. W., F. McNeilly, B. Meehan, D. Galbraith, P. D. McArdle, G. Allan, and C. Patience.** 2003. Methods for the exclusion of circoviruses and gammaherpesviruses from pigs. *Xenotransplantation* **10**:343-8.
- Ulrich, S., M. Goltz, and B. Ehlers.** 1999. Characterization of the DNA polymerase loci of the novel porcine lymphotropic herpesviruses 1 and 2 in domestic and feral pigs. *J Gen Virol* **80 (Pt 12)**:3199-205.
- Unger, E.** 1910. Nierentransplantation (Kidney transplantation). *Berlin Klin Wochenschr* **47**.
- Varthakavi, V., P. J. Browning, and P. Spearman.** 1999. Human immunodeficiency virus replication in an primary effusion lymphoma cell line stimulates lytic-phase replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **73**: 10329-338
- Varthakavi, V., R. M. Smith, H. Deng, R. Sun, and P. Spearman.** 2002. Human immunodeficiency virus type-1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through induction of KSHV Rta. *Virology* **297**:270-80.
- Verma, S. C., and E. S. Robertson.** 2003. Molecular biology and pathogenesis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *FEMS Microbiol Lett* **222**:155-63.
- Vieira, J., P. O'Hearn, L. Kimball, B. Chandran, and L. Corey.** 2001. Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) lytic replication by human cytomegalovirus. *J Virol* **75**:1378-86.
- Wang, S., S. Liu, M. H. Wu, Y. Geng, and C. Wood.** 2001. Identification of a cellular protein that interacts and synergizes with the RTA (ORF50) protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in transcriptional activation. *J Virol* **75**:11961-73.
- Wang, S. E., F. Y. Wu, H. Chen, M. Shamay, Q. Zheng, and G. S. Hayward.** 2004a. Early activation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA, RAP, and MTA promoters by the tetradecanoyl phorbol acetate-induced AP1 pathway. *J Virol* **78**:4248-67.
- Wang, S. E., F. Y. Wu, M. Fujimuro, J. Zong, S. D. Hayward, and G. S. Hayward.** 2003. Role of CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) in activation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) lytic-cycle replication-associated protein (RAP) promoter in cooperation with the KSHV replication and transcription activator (RTA) and RAP. *J Virol* **77**:600-23.
- Wang, X., and L. M. Hutt-Fletcher.** 1998. Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp42 can bind to B cells but is not able to infect. *J Virol* **72**:158-63.
- Wang, Y., H. Li, M. Y. Chan, F. X. Zhu, D. M. Lukac, and Y. Yuan.** 2004b. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ori-Lyt-dependent DNA replication: cis-acting requirements for replication and ori-Lyt-associated RNA transcription. *J Virol* **78**:8615-29.
- Wen, W., D. Iwakiri, K. Yamamoto, S. Maruo, T. Kanda, and K. Takada.** 2007. Epstein-Barr virus BZLF1 gene, a switch from latency to lytic infection, is expressed as an immediate-early gene after primary infection of B lymphocytes. *J Virol* **81**:1037-42.
- West, J. T., and C. Wood.** 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., and C. Boshoff.** 1998. Kaposi's sarcoma herpesvirus as a new paradigm for virus-induced oncogenesis. *Curr Opin Oncol* **10**:405-412.

- Whitehouse, A., M. Cooper, and D. M. Meredith.** 1998. The immediate-early gene product encoded by open reading frame 57 of herpesvirus saimiri modulates gene expression at a posttranscriptional level. *J Virol* **72**:857-61.
- Winkler, M., S. A. Rice, and T. Stamminger.** 1994. UL69 of human cytomegalovirus, an open reading frame with homology to ICP27 of herpes simplex virus, encodes a transactivator of gene expression. *J Virol* **68**:3943-54.
- Wittmann, G., and R. Rziha.** 1989. Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs. In "Herpesvirus disease of cattle, horses and pigs" (Wittmann, G., Ed), Kluwer, Boston: 215-222.
- Wolffe, A. P.** 1996. Histone deacetylase: a regulator of transcription. *Science* **272**: 371-72
- Wu, T. T., E. J. Usherwood, J. P. Stewart, A. A. Nash, and R. Sun.** 2000. Rta of murine gammaherpesvirus 68 reactivates the complete lytic cycle from latency. *J Virol* **74**: 3659-67
- Wu, F. Y., S. E. Wang, Q. Q. Tang, M. Fujimuro, C. J. Chiou, Q. Zheng, H. Chen, S. D. Hayward, M. D. Lane, and G. S. Hayward.** 2003. Cell cycle arrest by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication-associated protein is mediated at both the transcriptional and posttranslational levels by binding to CCAAT/enhancer-binding protein alpha and p21(CIP-1). *J Virol* **77**:8893-914.
- Yamanegi, K., S. Tang, and Z-M. Zheng.** 2005. Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus K8 β is derived from a spliced intermediate of K8 pre-mRNA and antagonizes K8 α (K-bZIP) to induce p21 and p53 and blocks K8 α -CDK2 interaction. *J Virol* **79**:14207-221
- Yin, Q., K. Jupiter, and E. K. Flemington.** 2004. The Epstein-Barr virus transactivator Zta binds to its own promoter and is required for full promoter activity during anti-Ig and TGF-beta1 mediated reactivation. *Virology* **327**:134-43.
- Yu, Y., J. B. Black, C. S. Goldsmith, P. J. Browning, K. Bhalla, and M. K. Offermann.** 1999. Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells. *J Gen Virol* **80**: 83-90
- Zalani, S., E. Holley-Guthrie, and S. Kenney.** 1996. Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:9194-9.
- Zalani, S., E. Holley-Guthrie, D. E. Gutsch, and S. C. Kenney.** 1992. The Epstein-Barr virus immediate-early promoter BRLF1 can be activated by the cellular Sp1 transcription factor. *J Virol* **66**:7282-92.
- Zhang, L., J. Chiu, and J. C. Lin.** 1998. Activation of human herpesvirus 8 (HHV-8) thymidine kinase (TK) TATAA-less promoter by HHV-8 ORF50 gene product is SP1 dependent. *DNA Cell Biol* **17**:735-42.
- Zhang, Q., D. Gutsch, and S. Kenney.** 1994. Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* **14**:1929-38.
- Zhang, Q., Y. Hong, D. Dorsky, E. Holley-Guthrie, S. Zalani, N. A. Elshiekh, A. Kiehl, T. Le, and S. Kenney.** 1996. Functional and physical interactions between the Epstein-Barr virus (EBV) proteins BZLF1 and BMRF1: Effects on EBV transcription and lytic replication. *J Virol* **70**:5131-42.
- Zhu, F. X., T. Cusano, Y. Yuan.** 1999. Identification of the immediate-early transcripts of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **73**:5556-5567
- Zhu, F. X., S. M. King, E. J. Smith, D. E. Levy, and Y. Yuan.** 2002. A Kaposi's sarcoma-associated herpesviral protein inhibits virus-mediated induction of type I interferon by blocking IRF-7 phosphorylation and nuclear accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5573-8.

Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Dr. Bernhard Ehlers und Dr. Michael Goltz für die Bereitstellung des Themas und für ihre Unterstützung bei der experimentellen Planung meiner Doktorarbeit bedanken. Herrn Dr. Bernhard Ehlers sowie Prof. Dr. Georg Pauli danke ich für die Unterstützung bei der Suche nach einer finanziellen Förderung meiner Doktorarbeit. In diesem Sinne möchte ich mich bei der Sonnenfeldstiftung und der Kommission der Vergabe von Promotionsstipendien der Freien Universität Berlin für die Bewilligung eines Sonnenfeld- bzw. NaFöG-Stipendiums bedanken.

Herrn Prof. Dr. Mutzel danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin. Dr. Bernhard Ehlers, Dr. Michael Goltz und Prof. Dr. Georg Pauli möchte ich für die sorgfältige und kritische Durchsicht dieser Arbeit danken. Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Tim Finsterbusch für die ständige Bereitschaft zur Diskussion meiner Versuchsergebnisse und der kritischen Durchsicht dieses Manuskriptes. Darüber hinaus danke ich ihm vor allem für die Einarbeitung in proteinbiochemische Techniken.

Herrn Dr. Andreas Nitzsche sowie Frau Dr. Barbara Chmielewicz danke ich für ihre Hilfestellung zur Durchführung der real time-PCR. Mein Dank gilt außerdem Frau Christine Siegismund und Frau Christiane Bug, die mir hilfreich bei der Einarbeitung am FACS zur Seite standen.

Der gesamten Arbeitsgruppe P14 und der Arbeitsgruppe von PD Dr. Annette Mankertz möchte ich für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken. Besonders möchte ich mich bei Claudia, Petra, Sonja, Bettina und Katja bedanken, die mich nicht nur bei der Durchführung verschiedener molekularbiologischer Techniken tatkräftig unterstützten, sondern auch privat immer ein offenes Ohr für mich hatten. Claudia danke ich vor allem für die Hilfe bei der Anfertigung der konfokal-mikroskopischen Aufnahmen.

Meinen Freunden außerhalb des Labors möchte ich für ihre humorvolle Ablenkung am Wochenende danken. Dabei danke ich vor allem Olivier, Susi, Nicole und Mathias für ihre ständige mentale Unterstützung.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mir immer in jeder Lebenslage zur Seite standen und mir die Kraft gaben, diese Arbeit zu verwirklichen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Iris Lindner
Anschrift: Mörikestrasse 14, 14558 Nuthetal, OT Bergholz-Rehbrücke
Geburtsdatum / -ort: 10.05.1975, Potsdam
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1981-1990 Grundschole, Nuthetal
1990-1993 Gesamtschole „Friedrich-Ludwig-Jahn“, Potsdam
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

1993-1994 Freiwilliges Ökologisches Jahr (FÖJ) in der Naturschutzstation
Wobnitz des Landes Brandenburg
1994-2001 Studium der Biologie an der Universität Rostock
Februar 2001 Abschluss: Diplom-Biologin

Berufstätigkeit

ab Januar 2002 Mitarbeit in der Projektgruppe „Molekulare Genetik und
Epidemiologie von Herpesviren“ am Robert Koch-Institut, Berlin
04/2002-06/2007 Promotion in der Projektgruppe „Molekulare Genetik und
Epidemiologie von Herpesviren“ am Robert Koch-Institut, Berlin

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

Lindner, I., B. Ehlers, S. Noack, G. Dural, N. Yasmum, C. Bauer, and M. Goltz. 2007. The porcine lymphotropic herpesvirus 1 encodes functional regulators of gene expression. *Virology* **357**:134-48.

Santoni, F., I. Lindner, E. Caselli, M. Goltz, D. D. Luca, and B. Ehlers. 2006. Molecular interactions between porcine and human gammaherpesviruses: implications for xenografts? *Xenotransplantation* **13**:308-17.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 30.04.2007