

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik

Induktion eines Apoptose-ähnlichen Phänotyps durch ORF21, der Thymidinkinase des Kaposi Sarkom-assoziierten humanen Herpesvirus-8

Frank Stefan Pogoda

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst

2. Univ.-Prof. Dr. M. Stürzl,

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Die Dissertation wurde am 16.04.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02.09.2009 angenommen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

München, März 2009

Frank Pogoda

Diese Arbeit wurde am Institut für Molekulare Virologie (Prof. Dr. Volker Erfle) des Helmholtz Zentrum München in der Arbeitsgruppe Virale Vaskulopathie unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Stürzl durchgeführt. Die Betreuung und Vertretung dieser Arbeit an der TU München erfolgte durch Prof. Dr. Wolfgang Wurst.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	<i>i</i>
Zusammenfassung	<i>iv</i>
Danksagungen	<i>vi</i>
1. Einleitung	1
1.1. Das Kaposi Sarkom	1
1.1.1. Epidemische Formen des Kaposi Sarkoms	1
1.1.2. Die multifaktorielle Entwicklung des Kaposi Sarkoms	2
1.1.3. Virale Kofaktoren der Kaposi Sarkom-Entwicklung	3
1.2. Das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV)	4
1.2.1. Latenter und lytischer Replikationszyklus von HHV-8	6
1.2.2. Tumorigene Eigenschaften von HHV-8-kodierten Genen	6
1.3. Apoptose und Nekrose: Programmierte Formen des Zelltods	8
1.4. Apoptose in der KS-Pathogenese	10
1.5. Der Tumorsuppressor p53	10
1.6. p53 in der KS-Pathogenese	11
1.7. Bisherige Ergebnisse zur Analyse der Rolle von p53 in Gegenwart von HHV-8-kodierten Genen	12
1.8. Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Material	15
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	15
2.1.2. Enzyme	16
2.1.3. Kits	16
2.1.4. Antikörper	17
2.1.4.1. Primäre polyklonale Antikörper	17
2.1.4.2. Primäre monoklonale Antikörper	17
2.1.4.3. Sekundärantikörper	17
2.1.5. Vektoren und Plasmide	18
2.1.6. Biologisches Material	19
2.1.6.1. Bakterien	19
2.1.6.2. Eukaryontische Zellen	19

2.1.7.	Puffer, Lösungen und Medien	20
2.2.	Methoden	21
2.2.1.	Zellbiologische Methoden	21
2.2.1.1.	Zellkultur	21
2.2.1.2.	Transfektion von Zellen	23
2.2.1.3.	Immunzytochemie	24
2.2.1.4.	Herstellung von Proteinextrakten für Westernblot-Analysen	25
2.2.1.5.	Nachweismethoden für apoptotische und nekrotische Zellen	27
2.2.2.	DNA-Technologie	28
2.2.2.1.	Plasmidisolierung	29
2.2.2.2.	Quantitative Bestimmung der DNA-Konzentration	29
2.2.2.3.	Enzymatische Spaltung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen	29
2.2.2.4.	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.2.5.	Southernblot-Analyse	31
2.2.2.6.	Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente	35
2.2.2.7.	DNA-Präzipitation	35
2.2.2.8.	Reinigung von DNA-Fragmenten	35
2.2.2.9.	Ligation von DNA-Fragmenten	35
2.2.2.10.	Hitzeschocktransformation	36
2.2.2.11.	Zusammenstellung hergestellter DNA-Konstrukte	36
2.2.3.	Proteinchemische Methoden	37
2.2.3.1.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	37
2.2.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.2.3.3.	Elektrotransfer von Proteinen	39
2.2.3.4.	Anfärben von Proteinen	39
2.2.3.5.	Westernblot	40
2.2.4.	Generierung einer transgenen Mauslinie	41
2.2.4.1.	Tierhaltung	41
2.2.4.2.	Zellkultur embryonaler muriner Stammzellen	41
2.2.4.3.	Präparation und Kultivierung von <i>Feeder</i> -Zellen	42
2.2.4.4.	Transfektion von ES-Zellen	43
2.2.4.5.	Identifizierung von ES-Zellklonen, die homolog rekombinierte DNA enthalten	44

2.2.4.6.	Expansion und Einfrieren der positiven ES-Zellklone	45
2.2.4.7.	Herstellung von Injektions-Chimären	46
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Untersuchungen zur Etablierung einer transgenen LANA-1 Mauslinie	48
3.1.1.	Herstellung eines induzierbaren LANA-1 Expressionskonstruktes	49
3.1.2.	Homologe Rekombination in embryonalen TBV-2-Stammzellen der Maus	51
3.1.3.	Etablierung einer transgenen LANA-1 Mauslinie	53
3.2.	Untersuchungen zur Wirkung von HHV-8-ORF21 auf Zellkulturen	55
3.2.1.	ORF21 induziert die Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor in HEK293-Zellen	55
3.2.2.	DNA-Konstrukte zur Expression verschieden rekombinanter ORF21-Proteine	57
3.2.3.	Aktivierung von p53 durch Expression von ORF21 in primären Endothelzellen	59
3.2.4.	ORF21 aktiviert p53 in primären Endothelzellen über eine Phosphorylierung an Serin15	61
3.2.5.	ORF21 aktiviert p53 in HEK293-Zellen über eine Phosphorylierung an Serin15	65
3.2.6.	Der N-terminale Teil von ORF21 induziert in primären Endothelzellen einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp	66
3.2.7.	ORF21 induziert in HEK293-Zellen einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp	69
3.2.7.1.	Expression rekombinanter ORF21-Proteine in HEK293-Zellen	69
3.2.7.2.	Der N-terminale Teil von ORF21 ist ausreichend für den ORF21-induzierten Apoptose-ähnlichen Phänotyp	70
3.2.7.3.	Inhibierung des ORF21-induzierten Apoptose-ähnlichen Phänotyps durch LANA-1 in HEK293-Zellen	74
3.2.8.	ORF21 induziert in Anwesenheit von p53 einen Apoptose- ähnlichen Phänotyp in SaOS-Zellen	77
3.2.8.1.	Stabile Expression von p53 in SaOS-Zellen	77

3.2.8.2.	p53-Aktivierung durch ORF21 in SaOS(p53)-Zellen über eine Phosphorylierung an Serin15	79
3.2.8.3.	Induktion eines Apoptose-ähnlichen Phänotyps durch ORF21 in SaOS(p53)-Zellen durch ORF21	83
4.	Diskussion	87
4.1.	Etablierung eines KS-ähnlichen Tiermodells	87
4.2.	ORF21 aktiviert den Tumorsuppressor p53	89
4.2.1.	ORF21 induziert einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp	91
4.2.2.	Der N-Terminus von ORF21 induziert einen Apoptose- ähnlichen Phänotyp	93
4.2.3.	ORF21 induziert in Anwesenheit von p53 einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp	94
4.2.4.	Zelltod als mögliche Ursache von Inflammation in der Pathogenese von KS	97
4.3.	Ausblick	98
5.	Literaturverzeichnis	101
6.	Anhang	114

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
AWF	angiogene Wachstumsfaktoren
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cbcl-2	zelluläres bcl2
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cdk6	<i>cyclin dependent kinase 6</i>
cm	Zentimeter
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6'-diamino-2-phenylindol
DD	<i>death domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBM	Endothelbasalmedium
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas associating protein with a death domain</i>
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GA	Gentamycin/Amphotericin

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde(n)
HAART	hoch aktive antiretrovirale Therapie
hEGF	<i>human epidermal growth factor</i>
HEK	<i>human embryonal kidney</i>
HHV-8	humaner Herpesvirus-8
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus-1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpesvirus Saimiri
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen
IC	Immunzytochemie
IFN- γ	Interferon- γ
IHC	Immunhistochemie
IL-1 β	Interleukin-1 β
IRF-1	<i>Interferon Regulatory factor –1</i>
vIRF-1	virales IRF-1
IZ	inflammatorische Zytokine
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilo Dalton
KS	Kaposi Sarkom
KSHV	KS-assoziiertes Herpesvirus
LANA-1	<i>latency associated nuclear antigen -1</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LV	Leervektor
mA	Milliampère
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MDM-2	<i>Mouse Double Minute-2</i>
min	Minute(n)
mmol	Millimol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ml	Milliliter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

NHL	<i>non-Hodgkin´s lymphoma</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline-Tween</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEL	<i>primary effusion lymphoma</i>
PI	Propidiumjodid
RB1	<i>Retino Blastoma</i> Protein-1
Rep	Reporterplasmid
R3-IGF	<i>human recombinant insulin-like growth factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ST	Staurosporin
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF-R	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
TK	Thymidin-Kinase
UV	ultraviolettes Licht
vCyc	virales CyclinD
VEGF	<i>vascular endothelial cell growth factor</i>
vbcl-2	virales bcl2
vFLIP	virales <i>Fllice inhibitory protein</i>
WB	Westernblot
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
21WT	ORF21 Wildtyp
21N	C-terminal verkürztes ORF21
21C	N-terminal verkürztes ORF21
21 Δ KD	Thymidinkinasedefiziente ORF21-Mutante

Zusammenfassung

Das humane Herpesvirus-8 (HHV-8) ist mit angioproliferativen Erkrankungen wie dem Kaposi Sarkom (KS) assoziiert. HHV-8 kodiert zahlreiche virale Proteine mit proliferationsfördernden und anti-apoptotischen Eigenschaften, die wesentlich zu der Entwicklung dieses multifokalen Tumors beitragen können. Trotz der Expression zahlreicher viraler Proteine mit anti-apoptotischen Eigenschaften sind zu Beginn dieser Erkrankung KS-Läsionen durch eine hohe Apoptoserate geprägt. Zudem ist eine gesteigerte Expression des Tumorsuppressors p53 in den Läsionen nachzuweisen, trotz Anwesenheit p53-inhibierender viraler Proteine. Da überdies p53 in HHV-8-assoziierten Erkrankungen aktivierbar ist, stellte sich die Frage nach der Rolle dieses zellulären Proteins in der KS-Pathogenese. Zur Untersuchung der möglichen Interaktionen von p53 mit HHV-8-kodierten Faktoren wurde zunächst versucht, ein KS-ähnliches Tiermodell zu etablieren. Hierfür sollte das als p53-inhibierend charakterisierte *latency-associated nuclear antigen-1* (LANA-1) induzierbar in einer transgenen Maus exprimiert werden. Die Etablierung einer transgenen Linie konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden, da das Transgenkonstrukt von den Chimären nicht an die Nachkommen vererbt wurde.

Ein weiteres HHV-8-kodiertes Protein, das mit dem p53-Signalweg interagiert, ist die virale Thymidinkinase ORF21. Erste Untersuchungen anhand einer Hochdurchsatzanalyse zur Aktivierung von p53 durch HHV-8-kodierte Gene hatten eine Modulation von p53 durch ORF21 ergeben. In dieser vorausgegangenen Arbeit wurde der ORF21-induzierte Effekt in Zellkulturen analysiert und der dafür verantwortliche N-terminale Bereich von ORF21 eingegrenzt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine transiente Expression von ORF21 sowohl in Zelllinien als auch in primären Endothelzellen p53 aktiviert und einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp über die Depolarisierung mitochondrialer Membranen induziert. In einer Struktur-Funktions-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass der bisher nicht näher charakterisierte N-terminale Bereich von ORF21 für die Depolarisierung verantwortlich ist, nicht aber der C-terminale Bereich, der die Kinasedomäne beinhaltet. Ferner wurde in p53-defizienten und ektopisch p53-exprimierenden Zelllinien demonstriert, dass die Anwesenheit von p53 den ORF21-induzierten Apoptose-ähnlichen Phänotyp bedingt. Dieser Mechanismus wurde auch durch Experimente bestätigt, in denen LANA-1 die ORF21-induzierten Effekte unterdrückte. LANA-1 kann daher sowohl die ORF21-induzierte Phosphorylierung von p53, als

auch den Apoptose-ähnlichen Phänotyp vermindern. Diese Ergebnisse geben neue Einblicke in die Funktion von HHV-8 Genen, die in der lytischen Replikationsphase exprimiert werden. Der Nachweis einer funktionellen Beteiligung von p53 an der Pathogenese HHV-8-assoziiierter Erkrankungen eröffnet neue Therapiemöglichkeiten bei den betroffenen Patienten.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael Stürzl für die Überlassung des Themas und für seine hervorragende Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst gilt mein besonderer Dank für die Vertretung dieser Arbeit an der Technischen Universität München.

Bei Frau Prof. Dr. Christine Leib-Mösch und bei Frau Dr. Andrea Kleinschmidt möchte ich mich ganz herzlich für die anregenden Diskussionen während der Korrektur dieser Arbeit und für ihre unermüdliche und tatkräftige Unterstützung im Verlauf der ganzen Arbeit danken.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Michael Stürzl und dem Institut für Molekulare Virologie für das sehr gute kollegiale Arbeitsklima bedanken. Meinem Kollegen René Leubert danke ich ganz besonders für seine Hilfsbereitschaft, die erfrischenden Diskussionen und für die sehr gute Zusammenarbeit bei diesem Projekt.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst und besonders Dr. Ralf Kühn danke ich für die Unterstützung und Einweisung bei dem Maus-Projekt.

Ferner danke ich Urban Deutsch, Herman Bujard, Wolfgang Wurst, Ralf Kühn, Ernst A. Wimmer, René Leubert und Michael Stürzl für die Überlassung verschiedenster Ausgangsvektoren und biologischer Materialien.

Meinen Eltern danke ich ganz herzlich für ihre liebevolle Unterstützung und ganz besonders meiner Frau für ihre unermessliche Geduld, die mir in dieser Zeit ein wichtiger Rückhalt war.

In Gedenken an Armin Pogoda

1. Einleitung

"Die Krankheit führt zum Tode,
und sie tut es innerhalb
der kurzen Zeit von zwei bis drei Jahren...
Es muss angenommen werden,
von unserer heutigen Erfahrung,
dass diese Krankheit vom Beginn an
genauso unheilbar wie auch tödlich ist. "

Moritz Kaposi, 1872

1.1. Das Kaposi Sarkom

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts beschrieb der ungarische Dermatologe Moritz Kaposi ein idiopathisches multiples Pigmentsarkom der Haut, welches in seiner klassischen Form hauptsächlich bei älteren Männern im östlichen Mittelmeerraum auftritt. Neben dem Befall der äußeren Extremitäten zu Beginn der Erkrankung, beschrieb er in den Autopsieberichten Tumorherde unterschiedlichster Größe in den verschiedensten inneren Organen seiner verstorbenen Patienten. Diese Erkrankung endet innerhalb von 2-3 Jahren nach Diagnose der ersten Symptome tödlich (Kaposi, 1872).

1.1.1. Epidemische Formen des Kaposi Sarkoms

Nach seinem Entdecker benannt, war das klassische Kaposi-Sarkom (KS) lange Zeit eine sehr seltene und wenig erforschte Erkrankung, bis es Anfang der achtziger Jahre als Marker der aufkommenden *Acquired Immune Deficiency Syndrome*-Epidemie (AIDS) identifiziert wurde (Gottlieb et al., 1981; Hymes et al., 1981). In dieser Zeit trat in den Vereinigten Staaten von Amerika in den Ballungsräumen von Kalifornien und New York bei bis zu 30% der *Human Immune Deficiency Virus-1* (HIV-1) -positiven Patienten gleichzeitig eine KS-Erkrankung auf, in San Francisco sogar bei bis zu 40% (Beral et al., 1990; Martin et al., 1998). Dieses sogenannte AIDS-assoziierte KS ist bis heute eine der meist verbreitetsten Tumorarten bei HIV-1-infizierten Personen und weist zugleich den aggressivsten Krankheitsverlauf von KS auf (Arora et al., 2007; Barbaro & Barbarini, 2007; Parkin, 2006).

Neben dem klassischen KS und dem AIDS-assoziierten KS sind auch das iatrogene KS und das endemische KS (afrikanische KS) bekannt. Die Form des iatrogenen KS ist selten und findet sich hauptsächlich bei immunsupprimierenden Therapien. Hier ist besonders der ethnogeographische Charakter des iatrogenischen KS bemerkenswert. KS repräsentiert knapp 90% der posttransplantationalen Neoplasien auf der saudiarabischen Halbinsel und in der Türkei (Duman et al., 2002; Qunibi et al., 1988).

Das afrikanische KS zeigte bis Ende der siebziger Jahre eine geographische Prävalenz hauptsächlich in äquatorialen Bereichen von Afrika, mit Schwerpunkten in Zaire, Uganda und Tansania (Wabinga et al., 1993). Dort gelten vor allem mineralhaltige, vulkanische Böden als Auslöser für Lymphödeme und Entzündungen an den Füßen. Eine derart ausgelöste lokale Immunreaktion an den äußeren Extremitäten könnte ein umweltbedingter Beitrag zu einer KS-Entwicklung sein (Whitby et al., 2007; Ziegler et al., 2001). Mit Ausbruch der Immunschwächekrankheit AIDS auf dem afrikanischen Kontinent entwickelte KS epidemische Ausmaße. So stieg beispielsweise die Anzahl der diagnostizierten KS-Fälle bei männlichen Krebspatienten in Uganda von 6% auf insgesamt 49% und in Zimbabwe stellt KS mit 33% die häufigste Tumorerkrankung dar (Wabinga et al., 1993). In Uganda hat sich bei Kindern die Wahrscheinlichkeit an KS zu erkranken 40-fach erhöht (Dourmishev et al., 2003; Wabinga et al., 1993). Somit ist AIDS-KS in Afrika, südlich der Sahara, der weitverbreitetste Tumor (Engels et al., 2003; Hansen et al., 2007). Nach aktuellen Schätzungen der *World Health Organisation* (WHO) zur Entwicklung der AIDS-Epidemie leben von ca. 33,2 Millionen weltweit HIV-1-infizierter Personen, 69% in Afrika (UNAIDS/WHO, 2007).

1.1.2. Die multifaktorielle Entwicklung des Kaposi Sarkoms

In allen Stadien einer KS-Erkrankung sind die KS-Läsionen von einer starken Vaskularisierung geprägt und weisen unvollständige Blutgefäße auf, die darauf schließen lassen, dass der Tumor endothelialen Ursprungs ist (Regezi et al., 1993; Stürzl et al., 1992). Die in den Läsionen befindlichen Tumorzellen zeigen eine spindelförmige Morphologie und tragen in der Mehrzahl endotheliale Oberflächenmarker, *Cluster of Differentiation* (CD), wie CD31 (Ensoli et al., 2001; McAllister & Moses, 2007; Uccini et al., 1994). Ebenso charakteristisch für KS-Läsionen sind extravasierte Erythrozyten und eingewanderte inflammatorische

Zellen, die Oberflächenmarker wie CD68 für Makrophagen exprimieren (Stürzl et al., 2001; Uccini et al., 1994).

Anders als herkömmliche humane Tumore mit klonalem Ursprung aus einer Zelle, gehen KS-Läsionen multifokal und polyklonal (Judde et al., 2000; Rabkin et al., 1997) aus dem lymphatischen und vaskulären Endothel hervor (Dupin et al., 1999; Weninger et al., 1999). Diese multifokale Entwicklung weist auf einen reaktiven Prozess unter Beteiligung mehrerer Faktoren hin. So wird in frühen KS-Tumorstadien den inflammatorischen Zytokinen (IZ) wie *interleukin-1 β* (IL-1 β), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *interferon- γ* (IFN- γ) und in späteren Stadien den angiogenen Wachstumsfaktoren (AWF) wie *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *vascular endothelial cell growth factor-A* (VEGF-A) eine wesentliche Rolle bei der Regulation der KS-Progression zugeschrieben (Cornali et al., 1996; Ensoli et al., 1992; Ensoli & Stürzl, 1998; Stürzl et al., 1995).

Aktuelle Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die in den KS-Läsionen dominierenden Spindelzellen endotheliale Zellen sind, die in geringerer Anzahl Blutgefäßendothelzellen und zum überwiegenden Teil lymphatische Endothelzellen repräsentieren, da mehr lymphatische Endothelzellmarker als Blutgefäßendothelzellmarker exprimiert werden (Hong et al., 2004; Wang et al., 2004). Desweiteren wurde gezeigt, dass lymphangiogene Moleküle wie Angiopoietin-2 und der *vascular endothelial cell growth factor-D* (VEGF-D) ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der KS-Pathogenese spielen (Wang et al., 2004).

1.1.3. Virale Kofaktoren der Kaposi Sarkom-Entwicklung

Bei der KS-Entwicklung sind neben IZ und AWF auch virale Kofaktoren von Bedeutung: Zum Beispiel wirkt bei der AIDS-KS-Variante das HIV-1-Tat-Protein aktivierend auf das Wachstum und die Migration von KS-Spindelzellen (Albini et al., 1995; Ensoli et al., 1990). Eine synergistische Wirkung von HIV-1-Tat mit dem endothelialen Wachstumsfaktor bFGF könnte bei der Steigerung der Aggressivität von AIDS-assoziierten KS entscheidend sein (Ensoli et al., 1994). Bei der Suche nach weiteren Faktoren, welche zur Entstehung und Entwicklung von KS beitragen, konnte 1994 ein neues humanes Herpesvirus identifiziert werden. Das humane Herpesvirus-8 (HHV-8) oder KS-assoziierte Herpesvirus (KSHV) wurde in PCR- und seroepidemiologischen Untersuchungen in Patienten aller bekannter KS-Varianten nachgewiesen (Chang et al., 1994).

1.2. Das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV)

KSHV (oder auch HHV-8) wird der Familie der *Herpesviridae* zugeordnet, Unterfamilie γ -*Herpesviridae*, Klasse Rhadinoviren, und stellt mit dem *Epstein-Barr Virus* (EBV) die einzigen Vertreter der humanen Gamma-Herpesviren (Moore & Chang, 1995; Moore et al., 1996; Russo et al., 1996). In einer Nukleotid-Sequenzanalyse des ca. 165 kb großen Genoms von HHV-8 wurden ca. 90 potentielle *open reading frames* (ORF) identifiziert (Abb.1); (Russo et al., 1996). Ein Sequenzvergleich von HHV-8 mit Vertretern der γ -*Herpesviridae* (EBV) und dem Rhadinovirus *Herpesvirus Saimiri* (HSV) zeigte bei 68 HHV-8-kodierten Genen neben viralen Homologien auch Homologien zu zellulären Genen und es konnten mögliche Funktionen zugeordnet werden (Neipel et al., 1997; Russo et al., 1996). Spezifisch von HHV-8 kodierte Gene, welche keine Homologien zu HSV oder EBV aufweisen, wurden in der Nomenklatur, in Anlehnung an das Kaposi-Sarkom, mit dem Präfix K versehen (Russo et al., 1996).

Nach heutigem Wissensstand existieren verschiedene angioproliferative Erkrankungen für deren Entstehung HHV-8 ein notwendiger, aber nicht hinreichender Faktor ist. Die Bekanntesten sind z.B. die multizentrische Castleman Erkrankung (*Multicentric Castleman disease*), eine seltene angioproliferative Störung des lymphatischen Systems (Corbellino et al., 1996; Soulier et al., 1995) und das primäre Effusions-Lymphom (PEL), eine Variante des Non-Hodgkins Lymphom (NHL), das ebenso AIDS-assoziiert auftreten kann (Cesarman et al., 1995; Cesarman et al., 1996).

Bei der Entwicklung von KS scheint HHV-8 ebenso zwar ein notwendiger, aber nicht ausreichender Faktor zu sein, da HHV-8 im Mittelmeerraum und in Zentralafrika bei bis zu 50% der Bevölkerung nachweisbar ist, ohne dass es hier zum Ausbruch von KS kommt (Gao et al., 1996).

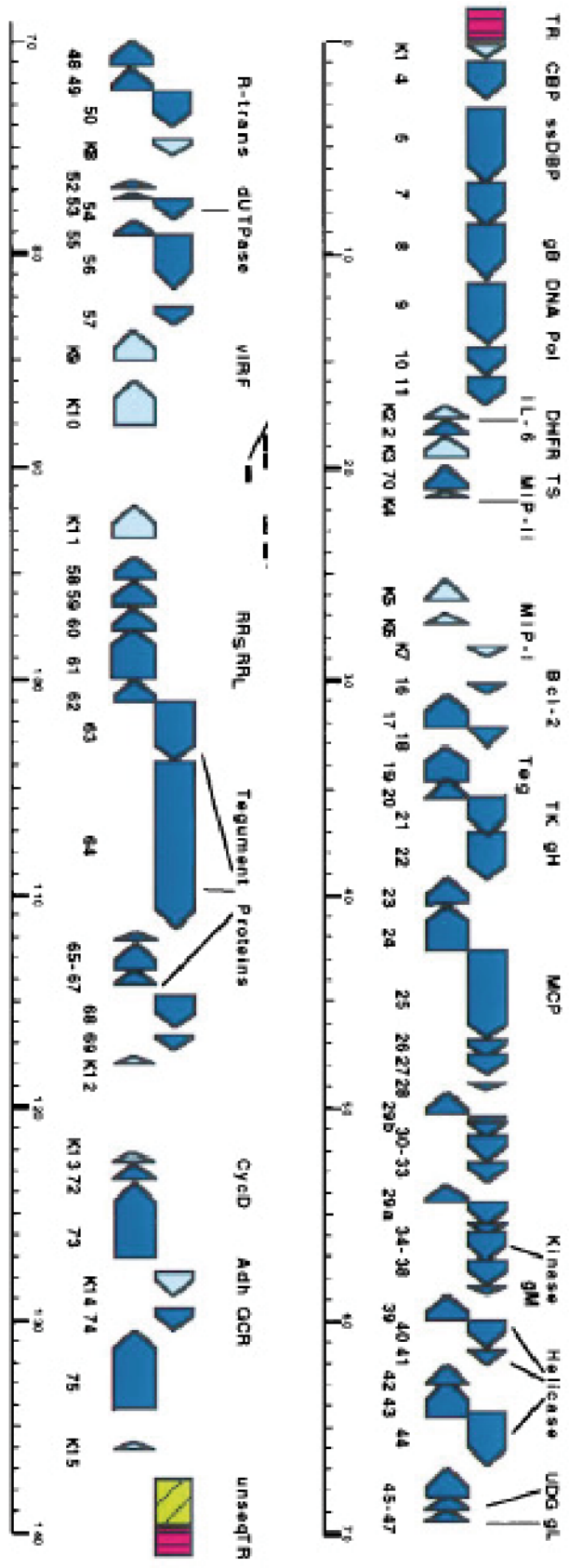


Abb.1 : Schematische Darstellung des Genoms von HHV-8 (verändert nach Russo et al., 1996)

1.2.1. Latenter und lytischer Replikationszyklus von HHV-8

Charakteristisches Merkmal von HHV-8, wie auch aller anderen bisher bekannten Herpesviren, ist die latente (nicht-produktive) bzw. lytische (produktive) Infektion (Hammerschmidt & Sugden, 1990). Während des lytischen Infektionszyklus wird das Virusgenom repliziert, infektiöse Viruspartikel werden produziert und es kommt zur Lyse und somit zum Tod der Wirtszelle (Garcia-Blanco & Cullen, 1991; Sugden et al., 1979). Im Gegensatz dazu überdauert HHV-8 während der latenten Infektion in einer kovalent geschlossenen episomalen Form (Lagunoff & Ganem, 1997). Zudem unterscheidet sich der latente Lebenszyklus vom lytischen durch eine begrenzte Anzahl exprimierter Gene. Diese Unterschiede im Genexpressionsmuster lassen sich in KS-Läsionen wie in kultivierten KS-Spindelzellen nachweisen (Blasig et al., 1997; Staskus et al., 1997). Bemerkenswert ist allerdings die niedrige Rate der lytischen Genexpression in PEL-Zellkulturen (Fakhari & Dittmer, 2002; Jenner et al., 2001), welche ebenso gering wie bei der Mehrzahl *in vivo* infizierter Zellen bei KS-Läsionen ausfällt (Staskus et al., 1997; Sun et al., 1999). Tatsächlich lassen sich sowohl in KS-Läsionen *in vivo*, als auch in unterschiedlichen HHV-8 Kulturmodellen *in vitro* hauptsächlich Latenz-assoziierte HHV-8-Genprodukte nachweisen (Ciufu et al., 2001; Dupin et al., 1999; Moses et al., 1999; Parravicini et al., 2000; Stürzl et al., 1997). Daraus kann gefolgert werden, dass die in der Latenzphase exprimierten Gene, einen entscheidenden Beitrag zur KS-Pathogenese leisten können.

1.2.2. Tumorigene Eigenschaften von HHV-8-kodierten Genen

HHV-8 exprimiert verschiedene virale Gene mit potentiell tumorigenen Eigenschaften (Neipel et al., 1997; Russo et al., 1996). Die Deregulation von Apoptose und Proliferation ist ein Schlüsselkriterium für die Entwicklung von Tumoren (Hanahan & Weinberg, 2000). Von den insgesamt sieben Latenz-exprimierten Genen von HHV-8 konnten auch tatsächlich transformierende, anti-apoptotische und proliferationsstimulierende Wirkungen auf Zellen *in vitro* nachgewiesen werden, was die Bedeutung der Genexpression im latenten Infektionszyklus im Hinblick auf die KS-Pathogenese hervorhebt (Dourmishev et al., 2003).

So wird z.B. das *Latency-Associated Nuclear Antigen-1* (LANA-1) in fast allen latent infizierten Tumorzellen später KS-Stadien exprimiert (Kellam et al., 1997; Rainbow et al., 1997). Das HHV-8-Gen LANA-1 kodiert ein 220-240kDa großes Protein (Rainbow et al., 1997), das in allen HHV-8-assoziierten Erkrankungen wie Kaposi Sarkom oder

Non-Hodgkins Lymphom nachweisbar ist (Abb.2A). In Transfektions-experimenten in Zellkulturen zeigt es die typische Kernlokalisierung (Abb.2B). Für LANA-1 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es die p53-vermittelte Apoptose in Osteosarkomzellen und HHV-8-infizierten Lymphomzellen inhibiert (Friborg et al., 1999). Dazu besitzt es transformierende Eigenschaften, die in primären Ratten-Zellen demonstriert wurden (Radkov et al., 2000). Darüber hinaus wirkt es als Transkriptionsaktivator auf zelluläre und HHV-8 kodierte Gene und sichert die Koreplikation und Segregation des latenten Virus, indem es das Virusgenom mit dem Genom der infizierten Wirtszelle verknüpft (Jenner & Boshoff, 2002).

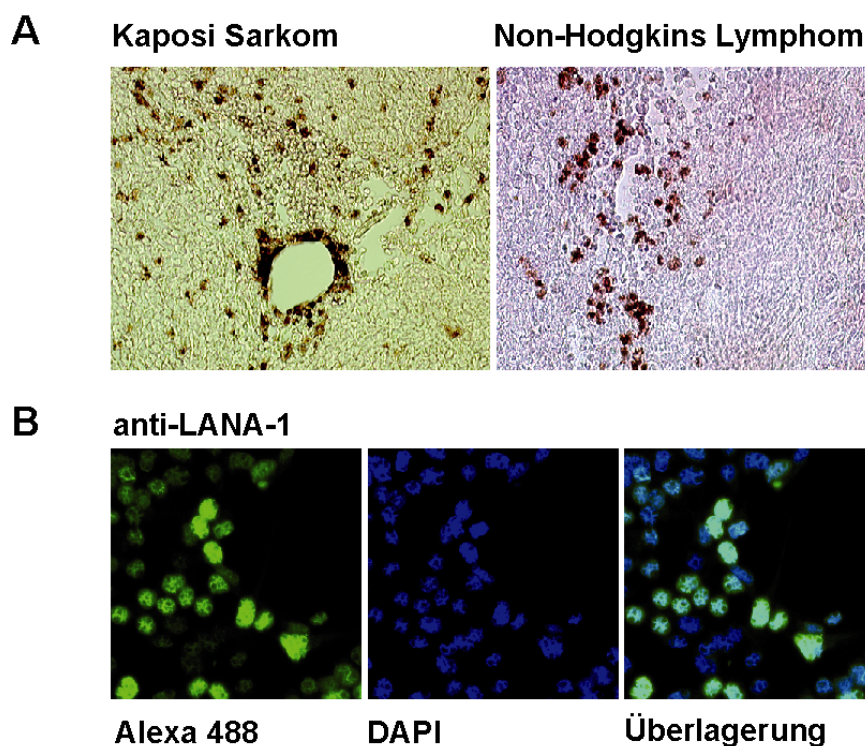


Abb.2: Immunchemischer Nachweis von HHV-8-LANA-1. (A) Immunhistochemische Färbung von LANA-1 (braune Färbung) an Biopsien von Kaposi Sarkom, bzw. Non-Hodgkin-Lymphom. (B) Immuncytochemischer Nachweis von LANA-1 in transfizierten HEK293-Zellen.

Über diese verschiedenen Funktionen könnte LANA-1 eine Schlüsselrolle in der KS-Pathogenese spielen, da es zu den wenigen HHV-8-Genen gehört, die konstitutiv sowohl in der Latenz- als auch lytischen Phase von HHV-8 exprimiert werden (Komatsu et al., 2001). Allerdings gibt es bislang kein Tiermodell, um diese potentiell tumorigenen Funktionen von LANA-1 *in vivo* zu untersuchen.

LANA-1 wird von einer polycistronischen mRNA exprimiert, von der aus auch die Gene *orf72* und *k13* kodiert werden (Dittmer et al., 1998). ORF72 kodiert für ein virales CyclinD (vCyc) und bildet einen funktionalen Komplex mit der zellulären *cyclin*

dependent kinase-6 (cdk6) (Chang et al., 1996; Swanton et al., 1997). Über die Phosphorylierung des *Retino Blastoma* Protein-1 (RB1) erfolgt eine Stimulierung des G1-S Übergangs im Zellzyklus und somit die Proliferation der Zelle (Godden-Kent et al., 1997). K13 kodiert ein virales *Fllice inhibitory protein* (vFLIP) und wirkt anti-apoptotisch, indem es die FADD-vermittelte Apoptose stromabwärts des Fas-Rezeptors inhibiert (Belanger et al., 2001).

Ein weiteres Protein mit anti-apoptotischen Eigenschaften ist K10.5, auch als LANA-2 bezeichnet (Neipel et al., 1997). LANA-2 weist ebenfalls wie LANA-1 ein nukleäres Lokalisationsmuster auf und inhibiert p53-vermittelte Transaktivierung und Apoptose (Rivas et al., 2001). Allerdings ist die Latenz-assoziierte LANA-2 Expression nicht in KS-Läsionen nachweisbar, sondern ausschließlich in B-Zellen (Rivas et al., 2001).

1.3. Apoptose und Nekrose: Programmierte Formen des Zelltods

John Kerr prägte 1972 den Begriff der Apoptose zur Beschreibung distinkter biochemischer und morphologischer Prozesse, die Zellen bei der selektiven Eliminierung aus dem Organismus durchlaufen (Kerr et al., 1972). Der Prozess der Apoptose spielt bei der Embryonalentwicklung, der Differenzierung und nicht zuletzt auch bei der Pathogenabwehr im Immunsystem eine wichtige Rolle (Mallat & Tedgui, 2000). Auch durch exogene Einflüsse, wie z.B. dem Entzug von Wachstumsfaktoren, dem Einfluss DNA-schädigender Agenzien oder auch durch irreparable Schädigungen der Zelle kann Apoptose hervorgerufen werden (Mallat & Tedgui, 2000; Nagata, 2000). Während der Apoptose wird in der Zelle eine intrinsische Suizidmaschinerie aktiviert, die zur systematischen Zerstörung der Zelle führt. Charakteristisch sind Ausstülpungen an der Zelloberfläche, danach werden prophagozytische Signale exprimiert, die Zelle schrumpft und verliert den Kontakt zu den Nachbarzellen (Fraser & Evan, 1996). Desweiteren kommt es zur Auflösung des Zellkerns, wobei das Chromatin kondensiert und gespalten wird und die einzelnen Zellfragmente in membrangebundene Vesikel verpackt werden (Kerr et al., 1972). Diese Membranvesikel, *apoptotic bodies* genannt, werden durch benachbarte Zellen phagozytiert und rasch degradiert, wodurch im Gegensatz zur Nekrose inflammatorische Prozesse vermieden werden (Earnshaw, 1995; Fraser & Evan, 1996; Kerr et al., 1972; Krysko et al., 2006).

Kennzeichnend für den intrinsischen Ablauf von Apoptose sind Signalkaskaden, in deren Mittelpunkt eine Familie von Cystein-abhängigen Proteasen, sogenannte

Caspasen, stehen (Alnemri et al., 1996; Lazebnik et al., 1994). Diese werden als inaktive Procaspasen gebildet und durch proteolytische Spaltung, katalysiert durch andere Caspasen, in ihre aktive Form umgewandelt (Earnshaw et al., 1999). Eingeleitet werden kann die Aktivierung der Caspasen rezeptorabhängig über sogenannte Todesrezeptoren oder die Freisetzung apoptotischer Mediatoren aus den Mitochondrien (Edinger & Thompson, 2004).

Beispielsweise gehört der Zelloberflächenrezeptor Fas (CD95) zur Familie der *tumor necrosis factor receptors* (TNF-R) und kann die sogenannte extrinsische Apoptose-Signalkaskade aktivieren (Ozoren & El-Deiry, 2003). Nach Bindung des passenden Fas-Liganden (Fas-L) bildet der Rezeptor einen trimeren Komplex, dessen zytoplasmatischer Anteil eine Todesdomäne (*death domain*, DD) beinhaltet. Diese interagiert mit FADD (*Fas associating protein with a death domain*) und kann Procaspase 8 aktivieren, die nachfolgend die Signalkaskade weiterer Caspasen in Gang setzt (Israels & Israels, 1999; Ozoren & El-Deiry, 2003).

Bei der Freisetzung apoptotischer Mediatoren aus den Mitochondrien bewirkt z.B. Cytochrom C die Aktivierung der Caspase 9 (Kroemer et al., 1998). Dies geschieht über die Bindung von Cytochrom C an das zytoplasmatische Protein *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1), was wiederum zu einer Induktion weiterer Caspasen führt (Breckenridge & Xue, 2004; Kroemer et al., 1998). Die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membranen erhöht sich während der Apoptose und das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi$) bricht zusammen (Ly et al., 2003). Der irreversible Zusammenbruch von $\Delta\Psi$ ist sowohl für apoptotische, als auch für nekrotische Vorgänge charakteristisch (Kroemer et al., 1998).

Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekrose morphologisch gekennzeichnet durch Bildung von Vakuolen im Zytoplasma und die Zerstörung der Zellmembran. Dadurch gelangt der Inhalt der Zelle in die Umgebung und es kommt zur Induktion inflammatorischer Prozesse (Schwartzman & Cidlowski, 1993). Neuere Arbeiten weisen darauf hin, dass auch die Nekrose nach einem vorgeschriebenen Programm abläuft (Festjens et al., 2006b; Proskuryakov et al., 2003). Während viele Viren antiapoptotische Gene kodieren, die das Leben ihrer Wirtszelle verlängern, führt die programmierte Nekrose zur Zerstörung der infizierten Zelle. Die physiologische Rolle der programmierten Nekrose ist damit in der mikrobiellen Abwehr begründet (Edinger & Thompson, 2004).

1.4. Apoptose in der KS-Pathogenese

Frühe Stadien von KS-Läsionen weisen hohe Konzentrationen inflammatorischer Zytokine auf, von denen *in vitro* gezeigt werden konnte, dass sie Apoptose in kultivierten primären Endothelzellen induzieren können. Übereinstimmend dazu ist eine hohe Apoptoserate in frühen KS-Läsionen feststellbar, die aber in späteren Läsionen reduziert ist (Stürzl et al., 1999).

Dies deutet auf die Anwesenheit von anti-apoptotisch wirkenden Faktoren hin und deckt sich mit der Beobachtung, dass mit KS-Progression die Expression viraler anti-apoptotischer Gene in den Läsionen ansteigt (Dourmishev et al., 2003; Stürzl et al., 2001). Hierbei sind nicht nur die zuvor erwähnten Gene von HHV-8 beteiligt, welche während der latenten Infektion exprimiert werden, sondern auch in der lytischen Replikationsphase exprimierte Gene. Beispielsweise kodiert *orf50* das virale Protein Rta, welches den lytischen Zyklus von HHV-8 aktivieren kann (Gradoville et al., 2000; West & Wood, 2003). Rta transaktiviert hierbei die Promotoren weiterer Gene von HHV-8, die in der lytischen Infektionsphase exprimiert werden (Chang et al., 2002). Weiterhin unterdrückt Rta p53-vermittelte Transaktivierung und Apoptose (Gwack et al., 2001). ORF16 hingegen kodiert für *vbcl-2*, ein Homolog des zellulären Protoonkogens *cbcl-2* (Sarid et al., 1997). Sarid und Mitarbeiter zeigten, dass ORF16 die pro-apoptotische Funktion von Bax inhibiert (Sarid et al., 1997). Ein weiteres Gen, das in der lytischen Infektionsphase exprimiert wird und p53-vermittelte Apoptose inhibiert, ist K9, das für ein virales Homolog des *Interferon Regulatory Factor-1* (IRF-1) kodiert (Seo et al., 2001).

1.5. Der Tumorsuppressor p53

Das zelluläre p53-Gen kodiert für ein 53 kDa großes Protein und wurde bereits Anfang der 80er Jahre mit transformierten Zellen assoziiert (DeLeo et al., 1979; Linzer & Levine, 1979). P53 wirkt als sogenannter Tumorsuppressor, indem es auf eine Vielzahl zellschädigender Einflüsse entweder mit Zellzyklusarrest, oder mit der Induktion von Apoptose reagiert (Fridman & Lowe, 2003; Hanahan & Weinberg, 2000). Seine zentrale Bedeutung als Tumorsuppressor wird von der Beobachtung unterstrichen, dass p53 bei über der Hälfte aller humanen Tumore eine Mutation aufweist, die zum Verlust der p53-Funktion führt (Hollstein et al., 1994; Hollstein et al., 1991).

Unter normalen Bedingungen unterliegt p53 einer ständigen Ubiquitin-abhängigen Degradation, welche durch die Interaktion mit der Ubiquitin E3 Ligase *Mouse Double Minute-2* (MDM-2) vermittelt wird (Fuchs et al., 1998; Honda et al., 1997). Eine Aktivierung von p53 erfolgt über zahlreiche posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Acetylierung, die gleichzeitig zu einer Stabilisierung von p53 führen (Bode & Dong, 2004). Bislang sind 19 verschiedene zelluläre Kinasen bekannt, welche in der Lage sind, p53 zu phosphorylieren, und bei 9 von ihnen konnte ein direkter Zusammenhang zwischen den phosphorylierten Aminosäuren Serin bzw. Threonin und der Induktion von Apoptose aufgezeigt werden (Bode & Dong, 2004). Eine Phosphorylierung von p53 an Serin 15 (Ser15) erfolgt z.B. nach Schäden an der DNA durch UV-Strahlung und wird über die p38-Kinase oder die *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK) vermittelt, die beide zur Familie der *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK) gehören (She et al., 2000; Shieh et al., 1997). Erfolgt ein p53-aktivierendes Signal wird die Ubiquitinierung unterdrückt, p53 wird somit stabilisiert und in den Zellkern transloziert. Im Zellkern bildet p53 ein Tetramer, das für seine Eigenschaft als aktiver Transkriptionsfaktor essentiell ist (Friedman et al., 1993).

Als Transkriptionsfaktor reguliert p53 sowohl transaktivierend als auch transreprimierend die Expression von ca. 100 zellulären Zielgenen (Vousden & Lu, 2002). Die Induktion von Apoptose durch p53 kann z.B. durch die Transaktivierung pro-apoptotischer mitochondrialer Gene erfolgen (Fridman & Lowe, 2003). Dazu gehören *Bax* aus der Bcl-2 Familie (Miyashita et al., 1994) und aus der *BH3-only* Familie die Gene *Puma*, *Noxa* und *Bid* (Nakano & Vousden, 2001; Oda et al., 2000; Sax et al., 2002). Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass p53 auch außerhalb des Zellkerns über Protein-Protein Wechselwirkungen eine proapoptotische Funktion ausüben kann. So kann p53 z.B. zu den Mitochondrien translozieren und über eine direkte Interaktion mit den anti-apoptotischen Proteinen Bcl2 und Bcl-X_L Apoptose induzieren (Mihara et al., 2003).

1.6. p53 in der KS-Pathogenese

Obwohl von verschiedenen HHV-8-Proteinen, wie LANA-1, Rta, oder vIRF-1 eine p53-inhibierende Funktion *in vitro* beschrieben wurde (Friborg et al., 1999; Gwack et al., 2001; Seo et al., 2001), ist *in vivo* eine starke p53 Expression immunhistochemisch in verschiedenen Formen von KS nachzuweisen. So ist in

Biopsien von Patienten mit AIDS-KS oder iatrogenem KS, vor allem in der fortgeschrittenen Pathogenese, eine Überexpression von p53 auf Proteinebene nachweisbar (Hodak et al., 1999; Katano et al., 2001; Noel et al., 1997). In einer Untersuchung der p53 mRNA aus Biopsien von Patienten mit klassischem KS oder AIDS-KS konnten zudem selten Mutationen in p53 nachgewiesen werden, die zu einem Funktionsverlust führen würden (Katano et al., 2001; Li et al., 1997). Man kann daher annehmen, dass p53 eine zentrale Rolle in der KS-Pathogenese spielt, da bisher bei diesen Fällen selten Mutationen in diesem Tumorsuppressor nachweisbar waren, welche mit einem Funktionsverlust assoziiert sind, und wie sie normalerweise in malignen Tumoren bei p53 zu finden sind (Zambetti & Levine, 1993). Die Zunahme der p53-Expression in späten KS-Läsionen (Noel et al., 1997) korreliert mit einem Anstieg der Expression viraler anti-apoptotischer Gene, bei einer gleichzeitigen Abnahme von apoptotischen Zellen in den Läsionen (Stürzl et al., 1999). Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass Faktoren des lytischen Replikationszyklus von HHV-8 nicht nur eine inhibierende Wirkung auf p53 ausüben, sondern auch an einer Aktivierung oder Stabilisierung von p53 beteiligt sind. Um die Pathogenese von KSHV besser zu verstehen, ist es daher von Interesse zu untersuchen, ob HHV-8-kodierende Faktoren an einer Aktivierung von p53 beteiligt sind.

1.7. Bisherige Ergebnisse zur Analyse der Rolle von p53 in Gegenwart von HHV-8-kodierten Genen

In einer vorangegangenen Arbeit unseres Labors wurde mittels Hochdurchsatzanalyse geprüft, ob die Expression bestimmter Gene des HHV8-Genoms zu einer Aktivierung von endogenem p53 führt (Leubert, 2007). Für diese Untersuchung wurden 63 Expressionsplasmide, die jeweils einen *orf* von HHV-8 kodieren, mit einem Reporterplasmid, das auf eine Aktivität des Transkriptionsfaktors p53 anspricht, in HEK293T-Zellen kotransfiziert (Abb.3). Das Reporterplasmid beinhaltet optimierte Bindungssequenzen für den Transkriptionsfaktor p53, die vor die kodierende Sequenz des *Green Fluorescent Protein* (GFP) kloniert wurden. Dabei konnte festgestellt werden, dass von 63 untersuchten HHV8-Genprodukten speziell ORF21 den Transkriptionsfaktor p53 aktivierte, was durch die Messung der relativen Fluoreszenz von GFP ermittelt wurde (Abb.3, schwarzer Balken). Gleichzeitig wurden auch abgelöste Zellen vom Boden des Zellkulturgefäßes

beobachtet, die eine Expressionsaktivität des p53-induzierbaren Reporterkonstruktes zeigten.

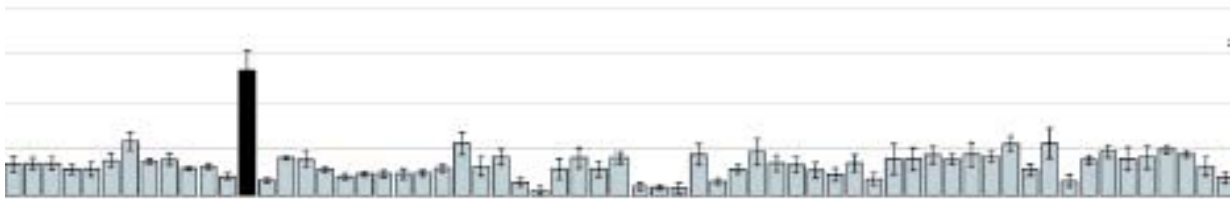


Abb.3: Hochdurchsatzanalyse zur Wirkung von HHV-8-kodierenden Genen auf die Aktivierung von endogenem p53 in HEK293T-Zellen. HHV-8-ORF21 (schwarzer Balken) aktiviert die Expression eines p53-GFP-Reporterplasmides. Insgesamt wurden 63 HHV-8-kodierte ORFs mit einem p53-induzierbaren GFP-Reporterplasmid in HEK293T-Zellen kotransfiziert. Quantifizierung der relativen Expressionsstärke des Reporters GFP erfolgte mit einem Fluoreszenzmessgerät (Leubert, 2007).

HHV-8-*orf21* kodiert für ein Thymidinkinase-Homolog (TK) von ca. 67kDa mit 584 AS (Russo et al., 1996). Bei Untersuchungen zur Thymidinkinasefunktion von ORF21 wurde festgestellt, dass *orf21*-transfizierte Zellen ein sehr schlechtes Wachstum aufwiesen, sich abrundeten und keine Konfluenz erreichten (Gustafson et al., 2000). Ähnliche Erfahrungen machten auch Cannon und Mitarbeiter, die vergeblich versuchten *orf21* unter Verwendung verschiedener Promotoren in zwei unterschiedlichen Zelllinien stabil zu exprimieren (Cannon et al., 1999). Bislang wurde jedoch noch nicht untersucht, ob die Expression von *orf21* Apoptose oder Nekrose induziert. Zudem zeigte sich in einem Sequenzvergleich, dass die im C-terminalen Bereich kodierte Kinasedomäne starke Sequenzhomologie zu der EBV-kodierten TK aufweist, jedoch nicht der N-terminale Bereich (Gustafson et al., 2000). Dieser N-Terminale Bereich von HHV-8-ORF21 weist auch keinerlei Homologie zu allen anderen bisher bekannten herpesviralen TK auf. Für den N-Terminale Bereich von ORF21 konnte kürzlich gezeigt werden, dass nach Transfektion eines entsprechenden Expressionskonstruktes in Zellkulturen, der Tumorsuppressor p53 moduliert werden kann (Leubert, 2007). Da bislang kein Zusammenhang zwischen einer HHV-8-ORF21 Expression und einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 bekannt war, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die ORF21-vermittelte Aktivierung von p53 in primären Endothelzellen mit einer Form von Zelltod korreliert, um eine *in vivo*-Relevanz aufzuzeigen.

1.8. Zielsetzung

Für ein besseres Verständnis der KS-Pathogenese und dem Zusammenspiel des Tumorsuppressors p53 sollten in der vorliegenden Arbeit zwei Zielrichtungen verfolgt werden:

Etablierung eines KS-ähnlichen Tiermodells

Für *in vivo*-Untersuchungen zur Rolle von p53 in der KS-Pathogenese sollte ein KS-ähnliches Tiermodell etabliert werden. Dazu sollte eine transgene Mauslinie etabliert werden, bei der das gut charakterisierte HHV-8-Gen LANA-1 spezifisch im Endothel exprimiert werden kann, um die Situation dieses endothelialen Tumors besser zu reflektieren. Aufgrund der potentiell tumorigenen Eigenschaften von LANA-1 sollte zudem eine Strategie gewählt werden, dieses Gen im adulten Tier experimentell zu induzieren, um mögliche Störungen in der Embryogenese von transgenen Tieren zu vermeiden.

Untersuchungen zur Wirkung von ORF21 auf p53

Neben dem *in vivo*-Ansatz zur Untersuchung von p53 in der KS-Pathogenese, sollte in Zellkulturen die Modulation von p53 durch HHV-8-kodiertes ORF21 weiterführend untersucht werden. Da in bisherigen Veröffentlichungen bei der Expression von ORF21 in Zellen ein verschlechtertes Wachstum der Zellkulturen festgestellt worden ist, sollte der Frage nachgegangen werden, ob die verminderte Vitalität durch Apoptose oder Nekrose verursacht wird. In den vorhergegangenen Untersuchungen wurde die Funktionsanalyse von ORF21 in HEK293T-Zellen durchgeführt. Es sollte die Wirkung von ORF21 auf p53 in HEK293-Zellen bestätigt werden, da diese Zelllinie im Gegensatz zu HEK293T-Zellen, nicht das *large T-antigen* exprimieren, von dem bekannt ist, dass es p53-Induktionen inhibieren kann. Außerdem sollte eine Struktur-Funktions-Analyse Aufschluss darüber geben, ob die Thymidinkinase-Funktion bzw. der N- oder C-terminale Teil von ORF21 zu einer Verschlechterung der Vitalitätsrate ORF21-exprimierender Zellen führt, da in der vorangegangenen Studie eine Modulation von p53 ausschließlich durch den N-terminalen Teil von ORF21 in HEK293T-Zellen demonstriert werden konnte. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Teilstrukturen von ORF21 die Aktivität von p53 beeinflussen. Da KS eine angioproliferative Erkrankung ist, bei der die Tumorzellen endothelialen Ursprungs sind, sollte die Wirkung von ORF21 auf p53 und auf eine mögliche Induktion des Zelltods zudem in primären Endothelzellen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamid / N,N – Methylenbisacrylamid (29:1)	BioRad
Agarose <i>electrophoresis grade</i>	Peqlab
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Sigma
Antibiotika/Antimykotika	Gibco Life Technologies
Bacto-Agar	Difco
bisBenzimide (Hoechst 33342)	Sigma
Coomassie-Färbelösung	BioRad
DAB (3,3'-Diaminobenzidine)	Biogenex
DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindol)	Molecular Probes
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche
D,L-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Gibco Life Technologies
DNA-Isolierungs-Kit (QIAPREP)	Qiagen
DNA-Längenstandard	MBI Fermentas
Endothelzell-Basalmedium (EBM-2)	Cambrex
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
ECL-Nachweissystem (Filme, Reagenzien)	Amersham Pharmacia
Ethidiumbromid	Roth
Fötale Rinderserum (FCS)	Gibco Life Technologies
G418	Sigma
Gelatine	Sigma
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell
L-Glutamin (200nM)	PAA Laboratories GmbH
Hefeextrakt	Difco
Hybond P-Membran (PVDF)	Amersham Pharmacia
<i>Immu-Mount</i>	Shandon
Kanamycin	Invitrogen
LIF, <i>Leukemia inhibitory factor</i>	Chemicon International
β-Mercaptoethanol	Sigma

MEM Non Essentiell Amino Acids (100x)	Gibco Life Technologies
MEM Sodium pyruvate 100 nM	Gibco Life Technologies
PCR- <i>Purification Kit</i>	Qiagen
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
Ponceau S – Lösung	Sigma
Protein-Molekulargewichtsmarker	Amersham Pharmacia
SDS	Roth
Staurosporin	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad
Trypton	Difco
Tween 20	Sigma
Zeocin	Sigma
Ziegenserum	Jackson ImmunoResearch

Alle sonstigen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und waren von analytischem Reinheitsgrad.

2.1.2. Enzyme

Restriktionsenzyme	Roche, New England Biolabs, MBI Fermentas
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH

2.1.3. Kits

QIAprep Miniprep Kit for Purification of Plasmid DNA	Qiagen
Plasmid Purification Kit Endofree Plasmid Maxi	Qiagen
Effectene Transfection Reagent	Qiagen
SuperFect Transfection Reagent	Qiagen
HUVEC Nucleofector™ Kit	Amaxa
JC-1, mitochondrialer Membranmarker	Biocarta
Poly-Caspasen Nachweis	Biocarta

2.1.4. Antikörper

2.1.4.1. Primäre polyklonale Antikörper

<i>Primärer Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Herkunft</i>
Anti-β-Actin (α-actin)	Kaninchen	IC: 1:500	Sigma
Anti-p53phosSer15 (α-p53 phosSer15)	Kaninchen	WB: 1:500 IC: 1:200	New England Biolabs
Anti-p53 (α-p53)	Kaninchen	WB: 1:1000 IC: 1:200	New England Biolabs
Anti-Myc (α-Myc)	Kaninchen	IC: 1:500	New England Biolabs

2.1.4.2. Primäre monoklonale Antikörper

<i>Primärer Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Herkunft</i>
Anti-Myc (α-Myc)	Maus	WB: 1:2000 IC: 1:500	New England Biolabs
Anti-LANA-1 (α-LANA-1)	Ratte	WB: 1:1000 IHC: 1:500 IC: 1:1000	Tebu Bio
Anti-p53 (α-p53)	Maus	WB: 1:1000 IC: 1:500	Dako
Anti-GAPDH (α-GAPDH)	Maus	WB: 1:10000 bis 1:30000	Chemicon

2.1.4.3. Sekundärantikörper

<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Herkunft</i>
Anti-Maus IgG–HRP	Schaf	WB: 1:5000	Amersham Pharmacia
Anti-Kaninchen IgG- HRP	Esel	WB: 1:5000	Amersham Pharmacia

Anti-Ratte IgG-HRP	Ziege	WB: 1:5000	Dianova
Anti-Kaninchen-AlexaFluor 488-IgG	Ziege	IC: 1:500	Molecular Probes
Anti-Maus-AlexaFluor488-IgG	Ziege	IC: 1:500	Molecular Probes
Anti-Ratte-AlexaFluor 546-IgG	Ziege	IC: 1:500	Molecular Probes
Anti-Kaninchen - AlexaFluor546-IgG	Ziege	IC: 1:500	Molecular Probes
Anti-Maus-AlexaFluor 546-IgG	Ziege	IC: 1:500	Molecular Probes

2.1.5. Vektoren und Plasmide

Vektor:	Resistenz:	Herkunft:
pcDNA3.1 (+)	Ampicillin	Invitrogen
pcDNA4-B	Ampicillin	Invitrogen

Plasmid	Insert	Referenz	Beschreibung
p53-RepGFP	p53-induzierbares GFP	R.Leubert (GSF-Neuherberg)	p53-induzierbares GFP-Reporter-Plasmid
pcDNA3-p53	<i>p53</i>	umklontiert aus pET3a-p53 (L. Wiesmüller)	p53-Expressionsplasmid
pcDNA4-eGFP (C-terminal mit <i>myc</i> -Epitop)	<i>gfp-myc</i>	R.Leubert (GSF-Neuherberg)	GFP-Expressionsplasmid
pcDNA3-LANA-1	<i>LANA-1</i>	T.Schulz (Hannover)	LANA-1-Expressionsplasmid
pcDNA4-k4.2	<i>k4.2</i>	M.Stürzl (Erlangen)	K4.2-Expressionsplasmid
pcDNA4-orf21wt	<i>orf21</i>	M.Stürzl (Erlangen)	Orf21-Expressionsplasmid

pcDNA4-orf21n	<i>orf21N</i> (AS 1-200)	R.Leubert (GSF-Neuherberg)	C-terminal verkürztes Orf21
pcDNA4-orf21c	<i>orf21C</i> (AS 201-584)	R.Leubert (GSF-Neuherberg)	N-terminal verkürztes Orf21
pcDNA4-orf21ΔKD	<i>orf21ΔKD</i> (G265A, F372V)	R.Leubert (GSF-Neuherberg)	Thymidinkinasedefi- ziente Orf21- Mutante
pSLfa1180fa	Superlinker <i>FseI</i> - <i>Ascl</i> flankiert	E. A. Wimmer (Göttingen)	Subklonierungs- plasmid
pUHD 10-3 p#361	TRE- Promoter	U. Deutsch (Bern)	Tet-Responsive- Element
pBSII bGH p#579	bGH-polyA	U. Deutsch (Bern)	Subklonierungsplas- mid
pUHT 61-1	<i>tTA-A2</i>	H. Bujard (Heidelberg)	Tet-off Transaktivator
pRosa26.6	<i>rosa26</i> 5',3' Homologien	R. Kühn (GSF-Neuherberg)	Zielvektor für den <i>rosa26</i> -Lokus
pCRII-3HA	<i>rosa26</i> 3' Homologie	J. Deusing (München)	Vektor für Sondenherstellung

2.1.6. Biologisches Material

2.1.6.1. Bakterien

XL1-Blue (Stratagene)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [*F'* *proAB lac^f ZΔM15 Tn10* (Tet^r)]

2.1.6.2. Eukaryontische Zellen

Primäre Zellen

makrovaskuläre Endothelzellen:

humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC; Cambrex)

Zelllinien

HEK293	<i>human embryonic kidney</i> (HEK) – Zelllinie
HEK293T	<i>human embryonic kidney – large T antigen</i> – Zelllinie
SaOS-2	Humane p53-defiziente Osteosarcoma - Zelllinie

2.1.7. Puffer, Lösungen und Medien

LB-Medium:

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

ad 1000 ml H₂O_{bidest}

Für Festmedium wurden 12 g Bacto-Agar zugesetzt.

Zur positiven Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Kulturmedium Ampicillin oder Kanamycin beigefügt.

Ampicillin: Endkonzentration im Medium: 100 µg/ml

Kanamycin: Endkonzentration im Medium: 50 µg/ml

10 x PBS (pH7,4):

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g

ad 1000 ml H₂O_{bidest} und pH auf 7,4 justiert.

TE-Puffer:

1 M Tris/HCl (pH 8.0)	10 ml
0,5 M EDTA	2 ml

ad 1000 ml H₂O_{bidest}

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Zellkultur

Primäre Zellen

Die Kultivierung der primären HUVEC erfolgte in Endothelzellmedium (EBM-2, Cambrex) bei 37°C und 5% CO₂ in gelatinisierten Zellkulturgefäßen.

Das Gelatinisieren erfolgte mit 1,5%-ige Gelatine, die auf 37°C erwärmt wurde und anschließend in den Zellkulturgefäßen zur ausreichenden Benetzung des Bodens verteilt wurde. Am folgenden Tag wurde die überschüssige Gelatine abgenommen, das Zellkulturgefäß 1 x mit Medium gewaschen und die Zellen darin kultiviert.

1,5% Gelatine

Gelatine 7,5 g
1 x PBS ad 500 ml

bei 65°C für 1 h unter ständigem Rühren lösen, anschließend autoklavieren, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei 4°C aufbewahren.

Endothelzellmedium (EBM-5%FCS)

Grundmedium:	<i>Endothelial cell basal medium</i> (EBM - 2)	500 ml
Zusätze:	<i>EBM-2 BulletKit:</i>	
5 % FCS		25 ml
Hydocortison		0,2 ml
HFGF-B		2 ml
VEGF		0,5 ml
R3-IGF		0,5 ml
Ascorbinsäure		0,5 ml
hEGF (10 µg/ml)		0,5 ml
GA-1000 (Gentamycin, Amphotericin)		0,5 ml
Antibiotics		je 5 ml

(Penicillin 100 U/ml; Streptomycin 100 µg/ml Amphotericin-B 25 µg/ml)

Zur Passagierung wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit frischem Vollmedium max. 1:6 verdünnt wieder ausgesät. Eine Passage entspricht einer Verdünnung der Zellen von 1:4.

Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien HEK293, HEK293T und SaOS-2 erfolgte in DMEM-Medium bei 37°C und 5% CO₂.

DMEM –Wachstumsmedium

Grundmedium: DMEM

Zusätze:

10 % FCS

2 mM L-Glutamin

Penicillin/Streptomycin (final: 100 U Penicillin, 100 µg Streptomycin)

1x *non essential amino acids**

(* enthält L-Alanin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure, Glycin, L-Prolin, L-Serin)

Konzentration an Selektionsmittel:

Zur stabilen Transfektion von Zellen kann durch ein Resistenzgen für ein bestimmtes Antibiotikum, welches auf dem eingebrachten Plasmid kodiert ist, ein Selektionsdruck erzielt werden. Das *neo*-Gen, das standardmässig in den pcDNA3-Expressionsplasmiden von Invitrogen vorhanden ist, vermittelt eine Resistenz gegen G418. Für die Bildung stabiler LANA-1-exprimierender HEK293-Klone wurde folgende Konzentration an G418 verwendet: 250 µg/ml.

Für die Bildung stabiler p53-exprimierender SaOS-Klone wurde folgende Konzentration an G418 verwendet: 400 µg/ml.

2.2.1.2. Transfektion von Zellen

Transfektion von HEK293 Zellen

Zur transienten Transfektion von Zellen wurde *Effectene Transfection Reagent* (QIAGEN) verwendet. HEK293-Zellen wurden 24 h vor Transfektion so ausgebracht, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine konfluente Einzelzellschicht von ca. 60% aufwiesen. Nach Herstellerangaben wurde je nach Ansatzgröße das empfohlene Volumen an EC-Puffer verwendet. Als optimales Verhältnis von Expressionsplasmid-DNA zu Effectene wurde 1:10 ermittelt. Bei Doppeltransfektionen wurden die Expressionsplasmide in einem äquimolaren Verhältnis zueinander eingesetzt. Die Ansätze wurden weitere 24 h mit dem Transfektionsgemisch inkubiert, um die bestmögliche Expressionsrate der Plasmide für nachfolgende Versuche zu erzielen. Zur stabilen Expression von LANA-1 in HEK293-Zellen wurden diese in 60 mm Kulturschalen ausgebracht und bei einer Zelldichte von 50 % mit 10 µg *PvuI*-linearisiertem pcDNA3-LANA-1 Plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen 1:20 in DMEM-Wachstumsmedium und 250 µg/ml G418 als Selektionsmittel passagiert. Nach einer Selektionsdauer von 10 Tagen wurden einzelne Zellkolonien weitergezüchtet und auf die Expression von LANA-1 untersucht. Folgende Experimente wurden mit jeweils 3 unabhängigen HEK293^{LANA-1}-Zelllinien durchgeführt.

Transfektion von SaOS-2-Zellen

Zur stabilen Expression von p53 wurden die SaOS-Zellen mit dem p53-Expressionsplasmid pcDNA3-p53 transfiziert. Die Transfektion erfolgte durch Lipofektion mit SuperFect (Qiagen) nach Angaben des Herstellers zur stabilen Transfektion adhärenter Zellen. Die SaOS-Zellen wurden dazu in 60 mm Kulturschalen ausgebracht und bei einer Zelldichte von 70-80 % mit 5 und 10 µg der *PvuI*-linearisierten Plasmid-DNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 1:12 in DMEM-Wachstumsmedium und 400 µg/ml G418 als Selektionsmittel passagiert. Nach einer Selektionsdauer von 10 Tagen wurden einzelne Zellkolonien weitergezüchtet und auf die Expression von p53 untersucht. Weiterführende Experimente wurden mit jeweils 3 unabhängigen SaOS(p53)-Zellklonen durchgeführt.

Stabil p53-exprimierende SaOS-Zellklone wurden für die gleichzeitige Expression von Orf21 auch transient mit dem Expressionsplasmid pcDNA4-*orf21* transfiziert. Die

transiente Transfektion erfolgte mit SuperFect (Qiagen) und wurde gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls zur transienten Transfektion adhärenter Zellen durchgeführt. Die p53-exprimierenden SaOS-Zellen wurden dazu in 60 mm Kulturschalen ausgebracht und bei einer Zelldichte von 70-80 % mit 5 und 10 µg Plasmid-DNA transfiziert. 24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für nachfolgende Experimente eingesetzt.

Transfektion von HUVEC

Um bei den primären Endothelzellen (HUVEC) eine möglichst schonende Transfektion mit hoher Transfektionseffizienz durchzuführen, wurde das Nukleofektionsprinzip von Amaxa angewendet. Diese Methode vereint Elektroporation mit zellspezifischen Reagenzien, die den direkten Transfer der DNA in den Zellkern ermöglichen. Dadurch wird erreicht, dass auch sich-nicht-teilende Zellen transfiziert werden und die Expression des transfizierten DNA-Konstrukts gleich im Anschluss an die Transfektion beginnen kann.

Zur transienten Transfektion der HUVEC wurde das Elektroporationsgerät Nukleofektor (Amaxa) und die entsprechenden Anwendungsreagenzien für HUVEC (HUVEC Nukleofektor Kit, Amaxa) eingesetzt.

Die Zellen wurden 2 Tage vor Transfektion in Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Am Tag der Transfektion wurde die Zellzahl bestimmt, 1×10^6 Zellen zentrifugiert (2000 rpm, 5 min) und das Pellet in 100 µl Nukleofektorlösung sowie 2 µg Plasmid-DNA resuspendiert. Das Zell-DNA-Gemisch wurde nun in eine Küvette übertragen und im Nukleofektor (Programm A-034) elektroporiert. Anschließend wurden 500 µl vorgewärmtes Kulturmedium zugegeben, die Zellsuspension aus der Küvette gespült und auf vorbereitete Zellkulturgefäße verteilt. Nachfolgende Versuche wurden 24 h nach der Transfektion durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt eine Expression in 50-70 % der Zellen erreicht wurde. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden HUVEC parallel mit einem konstitutiv exprimierenden GFP-Plasmid nukleofiziert und GFP-positive transfizierte Zellen bei einer 10-fachen Vergrößerung pro Gesichtsfeld gezählt.

2.2.1.3. Immunzytochemie

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf gelatinisierten *chamber slides* (Becton Dickinson) mit einer Zelldichte von $1-3 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgebracht und transfiziert.

Als Positivkontrolle für eine p53-Aktivierung dienten Leervektor-transfizierte HUVEC, die mit 100 nM Staurosporin, welches in DMSO gelöst war, bzw. nur mit DMSO für 3h behandelt worden waren. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen 2 x mit 1 x PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur für 20 min fixiert.

Zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen nach der Fixierung mit 1x PBS für 5 min gewaschen und die Zellmembranen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 4min permeabilisiert und anschließend mit 1 x PBS für 5 min gewaschen. Zum Blockieren freier Antikörperbindungsstellen wurden die Zellen für 20 min in einer Feuchtekammer mit 10 % Ziegen Serum und 1 % BSA in PBS benetzt. Nach zweimaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, verdünnt in 5 % Ziegen Serum und 1 % BSA (verwendete Antikörperverdünnung siehe 2.1.5.), für 1 h bei RT in der Feuchtekammer. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die Zellen mit dem AlexaFluor-gekoppelten Sekundärantikörper, verdünnt in PBS mit 5 % Ziegen Serum und 1 % BSA, inkubiert (1 h, RT, Feuchtekammer). Nach dem Waschen mit 1 x PBS wurden die Zellkerne durch eine Inkubation von 5 min mit 1 µg/ml 4',6'-diamino-2-phenylindol (DAPI, Molecular Probes) sichtbar gemacht, die Objektträger mit 50 % Glycerol/1 x PBS beschichtet und mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Olympus).

2.2.1.4. Herstellung von Proteinextrakten für Westernblot-Analysen

Für *Westernblot* - Analysen wurden Proteinextrakte von transfizierten oder stimulierten Zellen hergestellt. Dazu wurden sowohl Proteinextrakte in Ripa-Puffer als auch Proteinextrakte in 2 x SDS-Probenpuffer (BioRAD) verwendet.

Herstellung von Ripa-Zellextrakten

Zur Isolierung von Gesamtprotein aus adhären Zellen wurden die Zellen 2 x mit 1x PBS gewaschen und anschließend zum Ablösen von der Kulturschale mit Trypsin/EDTA benetzt. Nach Zugabe von Kulturmedium wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt, die Zellpellets 2 x mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in Ripa-Puffer resuspendiert. Nach der Zelllyse auf Eis für 15 min wurde das Zelllysate bei 14000 rpm und 15 min bei 4°C zentrifugiert. Zur Bestimmung

der Proteinkonzentration wurde anschließend der DC Protein Assay (BioRad) durchgeführt. Die Lagerung der Ripa-Zellextrakte erfolgte bei -20°C .

Ripa-Puffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
1 % Nonidet P40
0,5 % Natriumdesoxycholat
0,1 % SDS

eine *CompleteMini**-Tablette (Roche) auf 10 ml

(**CompleteMini*-Tabletten enthalten einen Mix aus verschiedenen Proteasehemmern mit breiter Spezifität für die Inhibierung von Serin/Cystein- und Metalloproteasen in bakteriellen, Säuger-, Hefe- und Pflanzenzellextrakten.)

Herstellung von Proteinextrakten mit 2x SDS-Probenpuffer

Für Westernblot-Analysen, bei denen 2 x SDS-Probenpuffer (BioRad) zur Zellyse verwendet wurde, wurden die Zellen in 6-well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % kultiviert. Zur Herstellung der Proteinextrakte wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und durch Zugabe von 2 x SDS-Probenpuffer (100 μl /Loch einer 6-well-Platte) lysiert. Das Zelllysate wurde umgehend in ein 1,5 ml - Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gestellt. Um die hochviskosen DNA-Bestandteile zu reduzieren, wurden die Proben für 10 bis 15 s mit Ultraschall behandelt. Für *Westernblot* - Analysen wurden 15 μl Proteinextrakt eingesetzt.

2 x SDS – Probenpuffer nach Lämmli (BioRad)

62,5 mmol Tris/HCL pH 6,8
25 % Glycerol
2 % SDS
0,01 % Bromphenolblau

Zu 950 μl dieser Lösung wurden 50 μl β -Mercaptoethanol zugegeben und der Probenpuffer anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.1.5. Nachweismethoden für apoptotische und nekrotische Zellen

Bestimmung aktivierter Caspasen mittels Durchflußzytometrie (FACS)

Apoptose ist eine evolutionär konservierte Form des Zelltods, welche nach definierten zellulären Prozessen abläuft. Eine zentrale Komponente dieses Prozesses ist eine Kaskade proteolytischer Enzyme, sogenannte Caspasen. Diese Enzyme nehmen an einer Reihe von Reaktionen teil, denen pro-apoptotische Signale vorausgehen und in deren Verlauf verschiedene Substrate geschnitten werden, um schlussendlich im Zerfall der apoptotischen Zelle zu münden.

Zur Detektion aktivierter Caspasen wurde ein sogenannter Carboxyfluorescein-markierter (FAM) Peptid (VAD) Fluoromethyl Keton (FMK) Caspase Inhibitor (FAM-VAD-FMK) verwendet (Biocarta). Der Carboxyfluorescein-markierte FAM-Peptid-Inhibitor bindet irreversibel an aktivierte Caspasen (Caspase-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8 und -9). Dadurch können Caspase-positive Zellen von Caspase-negativen Zellen mittels FACS oder Fluoreszenzmikroskopie unterschieden werden. Leervektor-transfizierte oder ORF21-transfizierte HEK293-Zellen oder stabil LANA-1-exprimierende HEK293-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit dem 1 x konzentrierten FAM-VAD-Caspase-Inhibitor für 1 h im Brutschrank inkubiert und anschließend entsprechend dem Herstellerprotokoll gewaschen. Für die gleichzeitige Färbung von nekrotischen Zellen mit Propidiumjodid (PI) wurden 5 µl PI-Lösung pro 400 µl Zellsuspension zugegeben und die Zellen im FACS (FACScalibur, BD) analysiert. Gemessen wurde Fluorescein (grün) auf Fluoreszenzkanal 1 (FL-1) und PI (rot) auf Fluoreszenzkanal 3 (FL-3). Die Darstellung erfolgte logarithmisch mit FL-1 (X-Achse) gegen FL-3 (Y-Achse) in einem Dot-Plot. Im oberen linken Quadranten sind demnach PI-positive und Fluorescein-negative Zellen, im oberen rechten Quadranten PI-positive und Fluorescein-positive Zellen, im unteren linken Quadranten PI-negative und Fluorescein-negative und im unteren rechten Quadranten PI-negative und Fluorescein-positive Zellen abgebildet. Unbehandelte, nicht-transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle, und als Positivkontrolle wurden Leervektor-transfizierte Zellen, die mit 5 % DMSO für 4 h (Nekrosekontrolle) bzw. 100 nm Staurosporin für 10 h (Apoptosekontrolle) behandelt waren, eingesetzt.

Permeabilitätsmessung von mitochondrialen Membranen zum Nachweis von Apoptose und Nekrose

Der irreversible Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$) ist sowohl für Apoptose, als auch für Nekrose ein charakteristischer Marker (Desagher et al., 1999; Luo et al., 1998; Narita et al., 1998) und kann man mit Hilfe des kationischen Farbstoffes JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodid) untersucht werden. JC-1 besitzt die Eigenschaft, dass es sich spezifisch an der intakten negativ-geladenen mitochondrialen Matrix anlagern kann und dort als rot-fluoreszierendes Aggregat akkumuliert (Cossarizza et al., 1993; Reers et al., 1991). Im Falle von Apoptose bzw. Nekrose bricht der elektrochemische Gradient $\Delta\Psi$ an den Membranen zusammen, JC-1 kann nicht mehr aggregieren und verbleibt in seiner monomeren Form im Zytoplasma der Zelle.

Die zu untersuchenden Expressionskonstrukte wurden transient in Zellen transfiziert und für die jeweils angegebenen Zeitintervalle inkubiert. Als Apoptosekontrolle wurden Zellen mit Staurosporin behandelt bzw. Leervektor-transfizierte Zellen als Negativ-Kontrolle mit DMSO inkubiert.

Für die Untersuchung an einem gleichmäßigen Zellrasen wurden die 24-well-Platten in einer Schwingrotor-Zentrifuge (Eppendorf) bei 1000 rpm für 2 min zentrifugiert. Danach wurden Zellkultur-Überstände vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden anschließend mit auf 37°C vorgewärmten 1 x Proben-Puffer (Biocarta) gewaschen und für die Färbung der Mitochondrien mit 1 x JC-Farbstoff (Biocarta) in 1 x Proben-Puffer (Biocarta) bei Dunkelheit für 30min im Brutschrank inkubiert. Nach vorsichtiger Abnahme des Farbstoffs wurde frisches Medium zu den Zellen gegeben und die Intensität der JC-1-Aggregate an vitalen Mitochondrien bei 544/590 nm in einem Fluoreszenzmessgerät (Ascent-CF, Thermo) quantitativ erfasst. Eine Analyse auf Einzelzellebene wurde mit einem Filter für rote Fluoreszenz (Texas-red 585/590 nm) bei 20-facher Vergrößerung durchgeführt (Olympus IX).

2.2.2. DNA-Technologie

Soweit nicht anders angegeben wurde nach Standardmethoden verfahren (Sambrook & Russell, 2001). Protokolle zur Herstellung von Puffern und Lösungen, sofern nicht besonders angegeben, finden sich ebenfalls in Sambrook et al. (2001).

2.2.2.1. Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Übernachtskulturen mit LB-Medium angesetzt, die mit einer Einzelkolonie der plasmidhaltigen Bakterien angeimpft wurden. Das LB-Medium wurde dabei mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, gegen welches das Plasmid ein Resistenzgen trägt. Die Präparation der Plasmid-DNA aus den Übernachtskulturen erfolgte mit Kits der Firma Qiagen. Die Bakterien werden dabei durch eine alkalische Behandlung lysiert und die im klaren Überstand befindliche Plasmid-DNA, nach einer Vorreinigung, an eine Anionenaustauschersäule gebunden. Unter einer hohen Salzkonzentration wird die DNA eluiert, in Isopropanol präzipitiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in einer geeigneten Menge TE aufgenommen. Für kleinere Mengen von Plasmid-DNA (20-50 µg) wurde der Kit Qiaprep Spin Miniprep und für größere Mengen von Plasmid-DNA (200-500 µg) der Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit verwendet.

2.2.2.2. Quantitative Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer (GeneQuant, Amersham Pharmacia). Bei Quarzküvetten von 1 cm entspricht der Extinktionswert von 1,0 dem Gehalt von 50 µg doppelsträngiger DNA. Um die Reinheit präparierter DNA bestimmen zu können, wird der Quotient aus A_{260}/A_{280} gebildet. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen Wert von $A_{260}/A_{280}=1,8$, reine RNA-Lösung von 2,0. Dieser Wert ist bei Kontaminationen mit Protein oder Phenol entsprechend kleiner.

2.2.2.3. Enzymatische Spaltung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme erkennen spezifische Sequenzmotive doppelsträngiger DNA-Moleküle. Die Enzyme binden die DNA und spalten diese durch Hydrolysierung der Phosphodiesterbindungen zwischen je zwei Basen in beiden Strängen der DNA. Durch die Lage der Spaltstellen in der DNA entstehen spezifische DNA-Fragmente bestimmter Größe, die mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und untersucht werden können. Durch die enzymatische Spaltung mit einem bestimmten Restriktionsenzym (Endonukleasen des Typs II) kann das DNA-Molekül anhand des entstandenen spezifischen Bandenmusters der Größe nach analysiert werden. Die

Restriktionshydrolysen erfolgten entweder mit Enzymen der Firma Roche, New England Biolabs oder MBI Fermentas sowie den mitgelieferten 10fach Inkubationspuffern. Für präparative Restriktions-hydrolysen von Plasmid-DNA (Zielvektor) wurden 2 µg DNA in einem Gesamtansatz von 50 µl mit $\frac{1}{10}$ Volumen des jeweiligen 10 × konzentrierten Puffers und 10 U Enzym bei 37°C für 2 h inkubiert. Die Präparation der gewünschten DNA-Fragmente (Insert) erfolgte mit 4 µg DNA in einem Gesamtansatz von 50 µl, $\frac{1}{10}$ Volumen des zugehörigen 10 × konzentrierten Puffers und 15 U Enzym ebenfalls bei 37°C für 2 h. Analytische Restriktionshydrolysen von DNA-Molekülen wurden in einem Gesamtansatz von 15µl mit 1 µg DNA, $\frac{1}{10}$ Volumen des zugehörigen 10 × konzentrierten Puffers und 10 U Enzym bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Partielle Restriktionshydrolysen von DNA-Molekülen erfolgten, um die gewünschten DNA-Fragmente zu erhalten, in einem Gesamtansatz von 100 µl mit 6 µg DNA, $\frac{1}{10}$ Volumen des jeweiligen 10 × konzentrierten Puffers und 2 U Enzym. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C wurden Aliquots von jeweils 10 µl bei exponentiell voranschreitenden Zeitpunkten entnommen und die Reaktion auf Eis abgestoppt.

2.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Gemische sehr einfach und effizient gereinigt, getrennt oder analysiert werden. Man stellt dazu ein Agarosegel her, dessen Konzentration der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente angemessen ist. Zur Identifizierung von DNA-Molekülen <1 kb wurden 1,5%ige, für DNA-Moleküle >1 kb wurden 1%ige Agarosegele angefertigt. Die zu untersuchenden DNA-Proben werden auf das Gel beladen und durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle zur Anode. Das Agarosegel wirkt dabei als Molekularsieb und die DNA-Moleküle können dadurch nach ihrer Größe getrennt werden. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Durch Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid, einem Farbstoff der in die DNA interkaliert, kann man die DNA-Fragmente unter UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm visualisieren. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und vollständig gelöst. Anschließend wurde das Gel auf ca. 60°C abkühlt, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und die Gelapparatur mit dem Agarosegel befüllt. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Auftragspuffer versetzt und auf das festgewordene Gel geladen. Das Gel wurde mit 1 x TAE-Puffer beschichtet und der

Gellauf durch Anlegen einer Spannung von 5-10 V/cm gestartet. Nach dem Lauf wurden die DNA-Fragmente mit UV-Licht nachgewiesen und zur Dokumentation fotografiert.

50 x TAE-Puffer

2 M Tris

1 M Eisessig

0,1 M EDTA

Ad 1000 ml H₂O-bidest

6 x Auftragspuffer

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylen-Cyanol

40 % Sucrose

2.2.2.5. Southernblot-Analyse

Mittels Southernblot-Analyse (Southern, 1975) wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Genomische DNA wurde hierzu mit, je nach Strategie und Aufbau des Zielvektors, variierenden Restriktions-endonukleasen enzymatisch geschnitten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Übertragung und Immobilisierung auf eine Nitrozellulosemembran. Nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde war es möglich, spezifische DNA-Fragmente autoradiografisch nachzuweisen, und auf diese Weise den Genotyp des Tieres oder der Zelle zu bestimmen.

Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Für die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden wurde das Megaprime Baukastensystem (Amersham) verwendet. 100 ng des in H₂O gelösten, unmarkierten DNA-Fragments wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit H₂O auf ein Endvolumen von 28 µl gebracht. Nach Zugabe von 5 µl Primer-Lösung wurde der Ansatz für 5 min bei 95°C inkubiert und anschliessend 1 min auf Eis abgekühlt. Dem Ansatz wurden 10 µl 5 x Markierungspuffer, 5 µl P³²-dCTP (entspricht einer Radioaktivität von 50µCi) sowie 2 µl Klenow-Polymerase zugesetzt und anschliessend für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Trennung der radioaktiv markierten Sonde von den nicht eingebauten

Nukleotiden wurde eine Reinigungssäule (Microspin S-300, Amersham) verwendet und der Ansatz für 2 min bei 740 x g zentrifugiert. Um die Markierungseffizienz zu bestimmen, wurden 2 µl des Eluats in einem Szintillationszähler analysiert. Die Sonde wurde nur verwendet, wenn mehr als 60000 Zerfälle pro Minute registriert wurden.

Restriktionsverdau, gelelektrophoretische Auftrennung und Transfer genomischer DNA

In jedem Restriktionsansatz wurden bis zu 60 µg aus Mäuseschwanz-Biopsien gewonnene genomischer DNA verwendet:

Lysispuffer für Mäuseschwanz-Biopsien

10 mM Tris HCl pH 7,5

10 mM EDTA pH 8,0

10 mM NaCl

0,5 % Sarcosyl

1 mg/ml Proteinase K (unmittelbar vor der Verwendung zugeben)

Restriktionsansatz

3 µl 10 x Puffer

1,5 µl Restriktionsenzym (40 U/µl)

1,2 µl Spermidin (0,1 M)

0,3 µl RNase A (10 mg/ml)

ad 30 µl Wasser

Der DNA-Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C in feuchter Umgebung. Anschließend wurde die DNA in einem 0,8%igem TAE-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde für den nachfolgenden Membrantransfer 10 min in einer Depurinierungslösung geschwenkt. Anschliessend wurde das Gel 30 min in Denaturierungslösung und 45 min in Neutralisierungslösung geschwenkt.

Für den DNA-Transfer wurde 10 x SSC in eine Plastikwanne gegeben. Eine Acrylglasplatte wurde so auf die Wanne gelegt, dass an zwei gegenüberliegenden Enden ein Spalt bestehen blieb. Ein Whatman 3 MM-Filterbogen wurde entsprechend der Wannengröße zurechtgeschnitten, kurz in 10 x SSC getränkt und

dann auf die Acrylglasplatte gelegt, wobei die Papierenden in die 10 x SSC – Lösung eintauchten. Sechs Filterpapiere und eine Nylonmembran wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wurde kurz angefeuchtet und die Filterpapiere in 10 x SSC getränkt. Die einzelnen Bestandteile der Transferkammer wurden in folgender Reihenfolge luftblasenfrei auf den großen Filterbogen aufgebracht (von unten nach oben): drei Filterpapiere, das Gel (invers aufgelegt), die Nylonmembran und im Abschluss drei Filterpapiere. Dieser Aufbau wurde durch Parafilm bündig abgegrenzt, um einen Transfer von Flüssigkeiten nur durch das Gel zu erlauben. Darüber wurden mehrere Lagen trockenes, saugfähiges Papier gelegt. Der Aufbau wurde mit einem ca. 500 g schweren Gewicht fixiert. Während einer Transferzeit von 12 – 24 h wurde die DNA mittels Kapillartransfer auf die Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran mit 2 x SSC gespült, luftgetrocknet und anschließend für 45 min bei 80°C inkubiert, um die DNA kovalent an die Membran zu binden.

Lösungen für die Southernblot-Analyse

20 x SSC (*Saline Sodium Citrate*)

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

pH mit 1 M HCl auf 7,0 einstellen.

Denaturierungslösung

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

Depurinierungslösung

0,2 M HCl

Hybridisierungspuffer

0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2

7% SDS

Neutralisierungslösung

0,5 M Tris pH 7,4

1,5 M NaCl

Strip-Lösung

0,1 x SSC

1 % SDS

15 mM NaCl

Waschlösung I 2 x SSC
 0,1 % SDS

Waschlösung II 1 x SSC
 0,1 % SDS

Waschlösung III 0,5 x SSC
 0,1 % SDS

Hybridisierung der Membran mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre gegeben und mit 10 ml Hybridisierungspuffer für mindestens 4h in einem Hybridisierungssofen bei 65°C inkubiert. Die Denaturierung der radioaktiv markierten Sonde wurde bei 95°C für 5min durchgeführt. Im Anschluss wurde die Sonde in das Hybridisierungsgefäß gegeben und bei 65°C über Nacht rotierend hybridisiert.

Anschließend wurden ungebundene oder unspezifisch gebundene Sonden-Anteile durch mehrere Waschstritte unter ständigem Schwenken entfernt:

Waschlösung I RT 20 min

Waschlösung II 40°C 20 min

Waschlösung III 65°C 20 min

Autoradiographie

Die hybridisierte Membran wurde in Folie eingeschweißt und in einer Autoradiografiekassette zusammen mit einem Röntgenfilm bei -80°C für 48 h inkubiert. Anschließend wurde der Film unter Verwendung einer Entwicklungsmaschine (Agfa, Curix 60) entwickelt.

2.2.2.6. Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

Bei Klonierungsexperimenten wurde im Anschluss an die enzymatische Restriktionshydrolyse die Dephosphorylierung von Vektor-DNA durchgeführt, um eine Religation der Vektorenden zu verhindern. In einem Hitzeschritt bei 60°C (10min) wurden zunächst die Enzyme der präparativen Restriktionshydrolyse inaktiviert und die DNA mit QIAEXII (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers entsalzt. Für die anschließende Dephosphorylierung von 2 µg DNA wurden 20 U alkalische Phosphatase (Boehringer) in einem 1 × konzentrierten Dephosphorylierungspuffer (50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5) eingesetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur und anschließend 15 min bei 70°C inkubiert. Zur Reinigung wurde der dephosphorylierte Ansatz abermals nach dem QIAEXII-Protokoll (QIAGEN) aufgereinigt und die DNA mit Isopropanol präzipitiert.

2.2.2.7. DNA-Präzipitation

Zur Präzipitation von bis zu 2 µg DNA wurde die DNA bis auf 100 µl mit TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) aufgefüllt. Für die Fällung von Nukleinsäuren wurde der Ansatz nach Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen Natriumacetat (3 M) und 80 % des Volumens Isopropanol für 20 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Nach Waschen mit 70 % Ethanol wurde das DNA-Pellet in einer geeigneten Menge TE aufgenommen.

2.2.2.8. Reinigung von DNA-Fragmenten

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde nach dem QIAEXII-Protokoll (QIAGEN) verfahren. Hierbei wird das ausgeschnittene Agarosestück, welches das gewünschte DNA-Fragment enthält, bei 50°C unter Hochsalzbedingungen aufgeschmolzen. Die DNA wird an Quarzpartikel gebunden, gewaschen und anschließend in einer geeigneten Menge TE eluiert.

2.2.2.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen von DNA-Molekülen wurden in einem Reaktionsansatz von 10 µl durchgeführt. Von einem enzymatisch geschnittenen und dephosphorylierten Vektor der Vektorpräparation wurden 100-150 ng eingesetzt und mit 7,5 µl (300-500 ng) DNA-Fragment (Insert) in 1 × konzentrierten Ligationspuffer (500 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP, 250 g/l BSA) mittels 0,5 µl T4-DNA-

Ligase (200 U) von NEB ligiert. Das Reaktionsgefäß wurde über Nacht bei 4°C gelagert.

2.2.2.10. Hitzeschocktransformation

Das Einbringen von Plasmid-DNA in *E.coli* kann auf verschiedene Arten erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich die Hitzeschocktransformation eingesetzt. Zur Vermehrung rekombinanter Plasmid-DNA bis zur einer Größe von 10kb wurden mit einem Teil der Ligationsansätze kompetente *E.coli*-Zellen (Stamm XL-1 blue, Stratagene) durch einen Hitzeschock transformiert. 50µl kompetente *E.coli*-Zellen wurden mit 5 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C von 60 s wurde der Ansatz kurz auf Eis abgekühlt, in 500 µl LB-Medium 45 min bei 37°C geschüttelt und anschließend auf ampicillinhaltigen (100 µg/ml) LB-Agarplatten ausplattiert.

2.2.2.11. Zusammenstellung hergestellter DNA-Konstrukte

Für die Generierung einer transgenen Mauslinie als KS-ähnliches Tiermodell sollte ein induzierbares LANA-1-Expressionskonstrukt hergestellt werden:

pBSIIKS-TRE_bGHpolyA (Tet-induzierbares Basis-Konstrukt):

Das 0,5 kb *Bam*HI/*Xho*I Fragment (TRE-Promoter) aus Plasmid #361 wurde in den durch einen *Bam*HI-Komplettverdau und *Xho*I-Partialverdau geschnittenen Vektor #579 (pBSIIKS-*bGHpolyA*) kloniert.

pBSIIKS-TRE_LANA-1-bGHpolyA (induzierbares TRE_LANA-1):

Das 3,5 kb *Not*I/*Eco*RI Fragment (LANA-1) aus pcDNA3-LANA-1 (der 3'-Überhang der *Not*I-Schnittstelle wurde mittels der Klenow-Reaktion aufgefüllt) wurde in den mit *Xba*I/*Eco*RI geschnittenen (der 3'-Überhang der *Xba*I-Schnittstelle wurde mittels der Klenow-Reaktion aufgefüllt) und anschliessend dephosphorylierten Vektor pBSIIKS-TRE_ *bGHpolyA* kloniert.

pSLfaTRE_LANA-1fa (Subklonierungsvektor)

Das 4,2 kb *Xho*I Fragment (TRE_LANA-1_ *bGHpolyA*) aus pBSIIKS-TRE_LANA-1- *bGHpolyA* wurde in den mit *Xho*I geschnittenen und anschliessend dephosphorylierten Vektor pSLfa1180fa (Horn & Wimmer, 2000) kloniert.

pRosa26.6-TRE_LANA-1 (Zielvektor für eine homologe Rekombination in den *rosa*-Lokus):

Das 4,5 kb *FseI* Fragment (TRE_LANA-1_bGHPolyA) aus *pSLfaTRE_LANA-1fa* wurde in den mit *FseI* geschnittenen und anschliessend dephosphorylierten Vektor *pRosa26.6* kloniert. Die Insertion wurde in der Orientierung ausgewählt, dass die Promotoren des *neo*-Gens und der induzierbare TRE-Promoter von LANA-1 in gleicher Orientierung vorliegen.

2.2.3. Proteinchemische Methoden

2.2.3.1. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Zelllysaten erfolgte mit dem DC Protein Assay von BioRad nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieser kolorimetrischen Messung basiert auf der Methode nach Lowry.

2.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) dient dazu, Proteine in einem Proteingemisch entsprechend ihres Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen zu trennen. Der Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) zum Proteingemisch und das Erhitzen der SDS-Proteinlösung bewirkt, dass nichtkovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen aufgehoben werden. Zusätzlich kann durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol eine Reduzierung der Disulfidbrücken des Proteins erreicht werden. Durch die Bindung von SDS-Anionen erhalten die denaturierten Polypeptide eine negative Ladung. Die Menge an gebundenem SDS ist dabei proportional zum Molekulargewicht der Proteine. Durch das Auftragen der SDS-Polypeptidkomplexe auf ein Polyacrylamidgel wandern die Proteine nach Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld entsprechend der Größe und Ladung durch das Gel. Mit Hilfe von Markerproteinen mit bekanntem Molekulargewicht kann anschließend die Größe der einzelnen Proteine bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele, bestehend aus zwei Einheiten: einem 5 %-igem Sammelgel (pH 6,8) und einem Trenngel (pH 8,8). Zur Elektrophorese wurden Laufkammern von Amersham Pharmacia benutzt. Bei der Herstellung des Trenngels wurde entsprechend der Größe der zu analysierenden Proteine, die Konzentration an Polyacrylamid auf 10-15 % eingestellt.

In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung für die Herstellung von einem Gel (*mighty small*) mit je 5 ml Trenngel sowie 2 ml Sammelgel aufgeführt. Gießstände wurden von Amersham Pharmacia verwendet.

Komponente	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
H ₂ O	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml	1,4 ml
30 % Acrylamid Mix (29:1)	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml	0,33 ml
1,5 M Tris pH 8.8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
1,0 M Tris pH 6.8	-	-	-	0,25 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml

Vor der Elektrophorese wurden die aufzutrennenden Proteinlösungen mit 2 x SDS-Probenpuffer (BioRad) versetzt und für 5 min bei 100°C denaturiert. Der Gellauf wurde mit 20 mA/Gel in 1 x SDS-Laufpuffer (10 x SDS Tris/Glycin – Laufpuffer, BioRad) gestartet.

2 x SDS – Probenpuffer nach Lämmli (BioRad)

62,5 mmol Tris/HCL pH 6,8

25 % Glycerol

2 % SDS

0,01 % Bromphenolblau

Zu 950 µl dieser Lösung wurden 50 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und der Probenpuffer anschließend bei –20°C gelagert.

10 x SDS Tris/Glycin-Laufpuffer

25 mM Tris, pH 8.3

192 mM glycine

0,1 % SDS

2.2.3.3. Elektrotransfer von Proteinen

Für den Transfer, der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, wurden Tankblot-Apparaturen (Amersham Pharmacia) verwendet. Das Proteingel wurde luftblasenfrei auf eine PVDF-Membran gelegt und zwischen 2-3 Schichten mit Transferpuffer getränktem Filterpapier (3-MM-Whatmanpapier) gepackt. Nach dem Einspannen in die Tankblotapparatur wurde der Proteintransfer vom Gel auf die Membran in Transferpuffer bei 250 mA für 2 h gestartet.

Transferpuffer:

Tris	5,8 g
Glycin	2,9 g
10 % SDS-Lösung	3,7 ml
Methanol	200 ml
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}	

2.2.3.4. Anfärben von Proteinen

Coomassie-Blau-Färbung:

Um zu kontrollieren, ob beim Elektrotransfer aus dem SDS-Gel alle Proteine auf die PVDF-Membran transferiert wurden, wurde das SDS-Gel nach dem Transfer mit Coomassie-Blau R250 gefärbt. Das Polyacrylamidgel wurde für ca. 30 min in eine Coomassie-Blau-Lösung gelegt und nach anschließender Entfärbung des Gels, können die Proteine als blaue Banden sichtbar gemacht werden.

Coomassiefärbelösung R250 (BioRad)

Entfärbelösung:

45 % Methanol

15 % Essigsäure

Ponceau-Färbung:

Mit Hilfe einer Ponceau-Färbung wurde der Proteintransfer auf der Membran überprüft. Durch Schwenken der Membran in Ponceau S Lösung und anschließendem Entfärben mit Wasser werden die Proteinbanden rot sichtbar. Durch längeres Waschen mit Wasser kann die Ponceau-gefärbte Membran wieder

vollständig entfärbt für *Westernblot* – Analysen verwendet werden. Die Coomassie-Blau-Färbung ist dagegen irreversibel.

2.2.3.5. Westernblot

Mit Hilfe der Westernblot-Analyse wurden bestimmte Proteine immunochemisch mit poly-, oder monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Dazu wurden Proteingemische aus Zelllysaten elektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit 1 x *Blocking Solution* (Roche) in 1 x PBST über Nacht bei 4°C inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. Nach einem Waschschrift in 1 x PBST für 15 min bei RT unter Schwenken erfolgte eine Präinkubieren der Membran mit 0,5 x *Blocking Solution* (Roche) in 1 x PBST für 5 min bei RT. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper, gelöst in 0,5 x *Blocking Solution* (Roche) in 1 x PBST, erfolgte ruhend für 1-2 h bei RT, oder bei 4°C über Nacht. Entfernt wurde nicht-gebundener Primärantikörper in drei Waschschriften mit jeweils 1 x PBST für 10 min bei RT unter Schwenken. Nach Präinkubieren der Membran mit 0,5 x *Blocking Solution* (Roche) in 1 x PBST für 5 min bei RT unter Schwenken erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper, gelöst in 0,5 x *Blocking Solution* (Roche) in 1 x PBST für 1h bei RT ruhend. Abschließend wurde die Membran mit 1 x PBST für 4 x 10 min bei RT unter Schwenken gewaschen.

1 x PBST

1 x PBS + 0,1 % Tween 20 (Sigma)

Durch die Verwendung von *horseradish peroxidase* (HRP) – gekoppelten Sekundärantikörpern konnte der Nachweis der Proteine über eine von Peroxidase katalysierte Reaktion mittels Chemilumineszenz erfolgen. Die Peroxidase katalysiert dabei die Oxidation von Luminol, was durch die Exposition mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann. Es wurden das *ECL Detection System* sowie ECL-Röntgenfilme der Firma Amersham Pharmacia verwendet und nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.2.4. Generierung einer transgenen Mauslinie

2.2.4.1. Tierhaltung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme wurden in der Tierhaltung des Helmholtz Zentrum (Neuherberg) gezüchtet. In einem geschlossenen System unter pathogenfreien Bedingungen betrug die Temperatur $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ und die relative Luftfeuchtigkeit $55\pm 5\%$. Je 12-stündige Tag- und Nachtphasen wurden automatisch geregelt. Nachkommen der Verpaarungen wurden drei Wochen nach der Geburt von den Eltern abgesetzt, nach Geschlecht getrennt und eine Schwanzspitzenbiopsie zur Genotypisierung durchgeführt. Die Markierung der Mäuse erfolgte durch Ohrlochung.

2.2.4.2. Zellkultur embryonaler muriner Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) können aus der inneren Zellmasse von Mausblastozysten gewonnen werden und haben einen pluripotenten, Charakter (Martin, 1981). Diese Eigenschaft, ES-Zellen undifferenziert *in vitro* zu kultivieren, wird genutzt, um diese genetisch zu manipulieren. Eine Möglichkeit besteht darin, Fremd-DNA gerichtet durch homologe Rekombination in ES-Zellen einzubringen. Durch Injektion in Maus-blastozysten, welche einen anderen genetischen Hintergrund als die manipulierten ES-Zellen aufweisen, ist es möglich, manipulierte ES-Zellen wieder in den Embryo zurückzubringen. Dieser Embryotransfer wird in scheinchwangeren weiblichen Mäusen durchgeführt. Auf diese Weise entstehen sogenannte Chimären, dh. Mäuse, deren Gewebe unterschiedliche Anteile von Zellen aufweisen, die auf unveränderten embryonalen Stammzellen des ursprünglichen Embryos bzw. auf die manipulierten ES-Zellen zurückgehen. Besiedeln die manipulierten ES-Zellen die Keimbahn eines chimären Tieres, besteht die Möglichkeit, dass die Fremd-DNA an die Nachkommen weitergegeben wird und somit eine transgene Linie entsteht. Dieser Prozess wird als Keimbahntransmission bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde die ES-Zelllinie TBV-2 verwendet, die von der Linie Ola/129 abstammt.

ES-Zellkultur (Medien und Medienzusätze)

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) Gibco Life Technologies

ES-Zellkulturmedium

85 % DMEM

15 % FCS hitzeinaktiviert (30 min bei 56°C)

2 mM Glutamin

1000 U/ml LIF

Einfriermedium (2 x)

50 % FCS

30 % ES-Zellkulturmedium (DMEM)

20 % DMSO

Wasch-Medium

90 % DMEM

10 % FCS

2.2.4.3. Präparation und Kultivierung von *Feeder*-Zellen

Um bei kultivierten ES-Zellen eine Differenzierung zu vermeiden, sind nachfolgende Kulturbedingungen erforderlich. So wird ein konditioniertes Kulturmedium verwendet, das den Leukämie-Inhibierungsfaktor (LIF) in bestimmter Konzentration (1000 U/ml) enthalten muss (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Außerdem ist eine Ko-Kultivierung mit mitotisch inaktivierten Fibroblastenzellen (*Feeder*-Zellen) erforderlich.

In dieser Arbeit wurden die ES-Zellen auf einer einfachen *Feeder*-Zellschicht mit LIF enthaltendem Medium gehalten. Zur Gewinnung von *Feeder*-Zellen wurden Fibroblasten aus 14,5 Tage alten Maus-Embryonen (E14,5) präpariert und in 1ml-Aliquots in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff gelagert. Eingefrorene *Feeder*-Zellen-Aliquots wurden schnell bei 37°C aufgetaut, in 10 ml DMEM überführt und 5 min mit 270 x g zentrifugiert. Resuspension des Zellpellets erfolgte in 10 ml DMEM. Die so vereinzelteten Zellen wurden auf fünf 13,2 cm- Kulturplatten mit je 25 ml Medium verteilt und bis zur Konfluenz kultiviert. Eine Replikationshemmung wurde durch 3-stündige Behandlung mit 1mg/ml Mitomycin C erreicht. Danach wurden die

Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert, abermals vereinzelt, gezählt und in Aliquots eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen je nach Bedarf auf Zellkultur-Platten unterschiedlicher Größe in einer Konzentration von $0,8 - 1 \times 10^4$ Zellen/cm² ausplattiert. Die *Feeder*-Platten waren nach mindestens dreistündiger Inkubation bei 37°C verwendbar.

2.2.4.4. Transfektion von ES-Zellen

Expansion von ES-Zellen

Ein Aliquot der TBV-2 ES-Zellen (Zellpassage 11) wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, die Zellsuspension in 9ml Waschmedium überführt und bei 800 x g für 5min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml ES-Zell- Kulturmedium aufgenommen und auf einer 6cm-Feederplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h kultiviert, mit PBS gewaschen und durch eine 15 minütige Einwirkung von 1,5 ml einer Trypsin/EDTA Lösung bei 37°C vom Boden gelöst. Zellen wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension vereinzelt und in 9 ml Waschmedium aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 270 x g für 5 min wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen, in 30 ml Medium aufgenommen und auf drei 10 cm *Feeder*-Platte neu ausgesät. Nach weiteren 24 h wurde jede der drei *Feeder*-Platten abermals mit PBS gewaschen, die Zellen mit einer Trypsin/EDTA Lösung gelöst und jeweils auf vier weitere 10 cm *Feeder*-Platte passagiert. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die ES-Zellen für die Elektroporation von Plasmid-DNA verwendet.

Elektroporation und Selektion

Um Fremd-DNA in ES-Zellen einzubringen, müssen deren Membranen für DNA-Moleküle durchlässig gemacht werden. Bei der Elektroporation werden biologische Membranen durch die Einwirkung kurzer elektrischer Impulse vorübergehend permeabilisiert, ohne dass die Membranstruktur dabei völlig zerstört wird. Während der kurzen Phase erhöhter Durchlässigkeit kann ein Stofftransport z.B. von DNA-Molekülen durch die Membran in das Zellinnere erfolgen.

Für eine Elektroporation wurden 60 µg von p*Rosa26.6-TRE_LANA-1* mit 40 U Scel über Nacht bei 37°C linearisiert. Danach wurde das Enzym durch Hitzebehandlung inaktiviert (65°C, 20min). 1×10^7 ES-Zellen wurden in 800 µl kaltem PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ aufgenommen, mit der in 100 µl PBS aufgenommenen linearisierten

Vektor-DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 0,3 kV und 500µF, die Zeitkonstante betrug 2 msek. Nach der Elektroporation wurde der Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert, anschließend in 40 ml vorgewärmter ES-Zell-Medium aufgenommen und auf drei 10 cm-Kulturschalen mit *Feeder*-Zellen verteilt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das ES-Zell-Medium gegen das G418-haltige Selektionsmedium (200 µg/ml G418 in ES-Zell-Medium) ausgewechselt.

Da der Vektor *pRosa26.6-TRE_LANA-1* ein Neomycin-Resistenzgen mit einem eigenen Promotor enthielt, konnte durch das Neomycin-Analogon Geneticin (G418) eine Positiv-Selektion auf solche ES-Zellen erfolgen, die die Vektor-DNA in ihr Genom eingebaut hatten. Der Wechsel des Selektionsmedium erfolgt täglich. Am 8.Tag der Selektion wurden die überlebenden Zellkolonien isoliert. Dafür wurden sie unter einem Binokularmikroskop in der Sterilbank mit einer Pipettenspitze vom Boden abgelöst und in 96-Lochplatten mit *Feeder*-Zellen überführt. In jedes Loch wurden 150 µl ES-Zell-Medium vorgelegt.

2.2.4.5. Identifizierung von ES-Zellklonen, die homolog rekombinierte DNA enthalten

Einen Tag nach Isolierung der G418-resistenten Einzelklone wurden die ES-Zellkolonien mit 30 µl Trypsin/EDTA pro Loch behandelt und nach ihrer Ablösung vom Boden in frische 96-Loch *Feeder*-Platten überführt. Nach zweitägiger Inkubation in einem 37°C-Brutschrank wurden die ES-Zellen abermals passagiert: Je nach Zelldichte wurden sie entweder 1:3 oder 1:4 verdünnt und nachfolgend auf 96-Loch-Platten überführt die entweder mit *Feeder*-Zellen oder mit Gelatine-Beschichtung vorbereitet waren. Für die Isolierung und nachfolgenden Analyse der ES-Zell-DNA wurde der Teil der Zellen verwendet, der auf 96-Loch-Gelatineplatten ausgesät wurde. Zur späteren Expansion derjenigen ES-Zellklone, die homolog rekombinierte DNA enthielten, wurde der Teil der Zellen der auf zwei 96-Loch *Feeder*-Platten übertragen worden war, 48 h weiter inkubiert und anschliessend schonend in Einfriermedium bei -80°C eingefroren. Zur Schonung der Zellen erfolgte dies in mit Papier ausgekleideten Pappschachteln.

Auf Gelatineplatten wachsenden ES-Zellklone wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurde jeder Klon mit 50 µl Zell-Lysispuffer behandelt. In einer Feuchtekammer wurden die Platten über Nacht bei 50°C

inkubiert. Die Präzipitation der DNA erfolgte bei RT durch Zugabe von 100 µl eiskaltem EtOH mit 75 mM NaCl unter ständigem Schütteln der Platten für 45 min. Nach Zentrifugation der Platten für 5 min bei 5000 x g wurde die gefällte DNA dreimal mit 70 %igem EtOH gewaschen, luftgetrocknet und bis zur Southernblot-Analyse bei 4°C gelagert.

Für die Hybridisierung mit der 5'-externen-Sonde gegen den 5'-Homologiebereich von *rosa26* (Wildtypbande: 11 kb, Rekombinanten-Bande: 3 kb) wurde die genomische DNA mit dem Enzym *EcoRV* geschnitten. Danach wurden die DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese aufgetrennt und ein Southernblot durchgeführt. Die DNA derjenigen Klone, die im Southernblot eine rekombinante 3 kb Bande aufwiesen, wurde unter Verwendung der Replika-Gelatine-Platten erneut isoliert und für die Hybridisierung sowohl mit der 3'-externen-Sonde gegen den 3'-Homologiebereich und der externen Sonde gegen TRE_LANA-1 verwendet. Dazu wurde die genomische DNA abermals mit dem Enzym *EcoRV* geschnitten. Nur solche Zellklone, die im Southernblot auch unter Verwendung der 3'-Sonde eine rekombinante Bande aufwiesen (Wildtypbande: 11 kb, Rekombinanten-Bande: 9 kb) und zugleich bei Verwendung der Sonde gegen das Transgen TRE_LANA-1 eine Rekombinanten-Bande von 6 kb aufzeigten, enthielten die gewünschte homolog rekombinierte DNA und wurden für die nachfolgenden Schritte verwendet.

2.2.4.6. Expansion und Einfrieren der positiven ES-Zellklone

ES-Zellklone, die positiv auf homologe Rekombinationsereignisse getestet waren, wurden bei 37°C in den Replika 96-Loch *Feeder*-Platten aufgetaut. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1000 x g wurde die positiven ES-Zellklone auf eine neue 96-Loch *Feeder*-Platten mit frischem Medium ausgesät. Darauffolgend wurden die ES-Zellklone entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit je über eine 48-Loch *Feeder*-Platte, eine 24-Loch *Feeder*-Platte, eine 3,5 cm-, eine 6 cm- und eine 10 cm-*Feeder*platte auf vier 10 cm *Feeder*-Platten expandiert. Jede 10cm *Feeder*-Platte wurde anschliessend mit PBS gewaschen, trypsinisiert und die vereinzelt ES-Zellen in Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und im Flüssig-Stickstofftank weggefroren.

2.2.4.7. Herstellung von Injektions-Chimären

Gewinnung von Mäuseblastulae

Für die Gewinnung von Mäuseblastulae (Embryonalstadium E3,5) wurden eine Superovulation bei weiblichen C57BL/6J Mäuse durch hormonelle Behandlung angeregt. Die Superovulation dient der Erhöhung der Anzahl an ovulierten Eizellen und wird durch die Behandlung der Weibchen mit Analoga der gonadotropen Hormone follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH) erzielt. Am ersten Tag der Behandlung wurde den Spender-Weibchen um 15 Uhr eine Dosis von 7,5 I.E. Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG, Intervet) durch intraperitoneale Injektion verabreicht. 48 Stunden später wurden die Mäuse mit 7,5 I.E. humanem Chorion-Gonadotropin (hCG/Ovogest, Intervet) behandelt und einzeln mit einem Männchen des gleichen Stammes verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen von den Männchen getrennt. Die Spender-Weibchen, die nicht gedeckt worden waren, wurden aussortiert. Sechs Tage nach Beginn der Behandlung wurden die Spender-Weibchen zur Entnahme der Uteri getötet. Die Blastozysten wurden mit M2 Medium aus den Uteri herausgespült und konnten anschließend für die Injektion mit embryonalen Stammzellen verwendet werden.

Injektion der ES-Zellen in Mausblastozysten

Die homolog rekombinierten ES-Zellen mit dem Transgen TRE_LANA-1 wurden wie beschrieben aufgetaut, in Kultur genommen und expandiert. Kurz vor der Injektion wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung behandelt und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden in Waschmedium gewaschen, anschließend abzentrifugiert und in kaltem PBS resuspendiert. Die Injektion von 2-3 ES Zellen in die Blastozysten erfolgte an einem Injektionsmikroskop (Leica DNRB).

Embryotransfer

Als Ammen-Mütter dienten pseudoträchtige Weibchen des Stammes CD-1. Zur Einleitung einer Scheinschwangerschaft wurden die Weibchen drei Tage vor dem Embryotransfer mit vasktomierten CD-1-Männchen verpaart (Hogan, 1994). Nur solche Weibchen wurden für den Transfer verwendet, die am Tage nach ihrer Verpaarung einen vaginalen Sekretpfropf ausgebildet hatten.

Aufzucht der transgenen Mäuse

Die Aufzucht der transgenen Mäuse erfolgte wie zuvor beschrieben. Für die Rückkreuzung der Chimären wurden C57BL/6N Mäuse verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur Etablierung einer transgenen LANA-1 Mauslinie

Für eine *in-vivo* Untersuchung der Interaktion von HHV-8-kodierenden Faktoren und endogenem Tumorsuppressor p53 sollte ein gut charakterisiertes HHV-8-Gen verwendet werden. Zu diesem Zweck wurde das *latency-associated nuclear antigen-1* (LANA-1) ausgewählt, da es unter anderem p53-Funktionen inhibiert und in Zellkulturen anti-apoptotisch und transformierend wirkt (Friborg et al., 1999; Radkov et al., 2000). Weiterhin ist LANA-1 eines der wenigen HHV-8-kodierten Gene, welche konstitutiv vom Virus exprimiert werden (Komatsu et al., 2001).

Das Transgen LANA-1 sollte mittels der sogenannte *knock-in* Technologie in das Genom der Maus eingebracht werden. Hierbei wird eine einzelne Kopie des Transgens mittels homologer Rekombination inseriert (Hogan, 1994). Als Zielort dieser Insertion wurde der *rosa26*-Lokus auf Chromosom 6 ausgewählt, der sich für diesen experimentellen Ansatz bewährt hat (Friedrich & Soriano, 1991; Soriano, 1999).

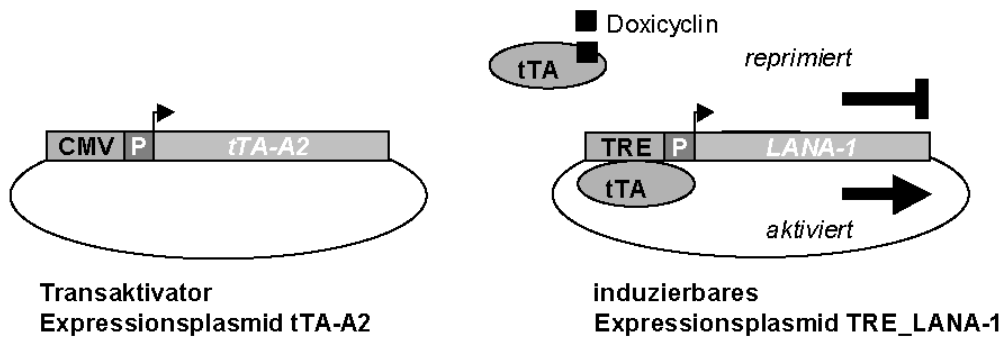
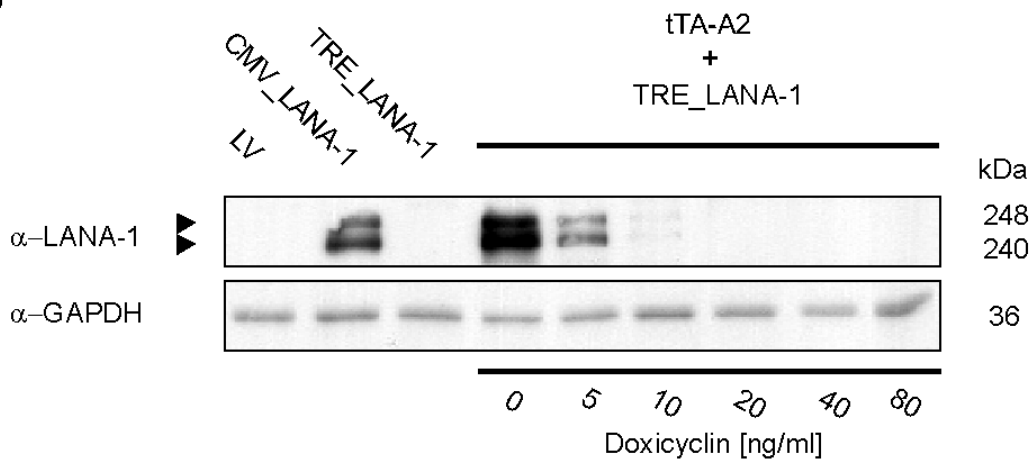
Wegen seiner bekanntermaßen pro-onkogenen Eigenschaften ist angeraten, LANA-1 nur kontrolliert in einem transgenen Organismus, wie z.B. einer Maus, zu exprimieren. Deshalb sollte ein sogenanntes induzierbares Expressionssystem zur Untersuchung der LANA-1 Funktion verwendet werden, bei dem das zu untersuchende Transgen nicht konstitutiv, sondern nur in Anwesenheit eines Transaktivators exprimiert wird. Der Vorteil dieses Expressionssystems liegt darin, dass beide Komponenten (Transaktivator und induzierbares-Element) in getrennten transgenen Mauslinien vorliegen und erst nach Kreuzung in Tieren, die beide Konstrukte tragen, die Transgenexpression reguliert werden kann.

Um LANA-1 gewebsspezifisch im Endothel zu exprimieren, steht der Transaktivator unter der Kontrolle des *Tie-2/Tek*-Promotors: *Tie-2/Tek* ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, welche Angiopoietin-1 bindet und in Endothelzellen, bzw. endothelialen Vorläuferzellen der Maus exprimiert wird (Schlaeger et al., 1997). Somit wird LANA-1 ausschliesslich in endothelialen Geweben exprimiert, was daher der Situation beim KS entspricht. Etablierte Mauslinien, die die Transaktivatoren rtTa, bzw. tTa unter der Kontrolle des *Tie-2/Tek*-Promotors tragen, standen über eine Kooperation mit Dr. Urban Deutsch (Universität Bern) zur Verfügung.

3.1.1. Herstellung eines induzierbaren LANA-1 Expressionskonstruktes

Um unkontrollierte Störungen durch eine konstitutive Expression dieses potenziell tumorigenen Faktors in einer transgenen Maus zu vermeiden, sollte das induzierbare Tet-on/ Tet-off aus *E. coli* als Expressionssystem eingesetzt werden (Gossen et al., 1995). Dieses sogenannte binäre Expressionssystem besteht aus zwei Komponenten (Abb.4A), dem *tet-responsive-element* (TRE), eine regulatorische Sequenz der *tet*-Operons aus *E. coli*, und dem Transaktivator, der auf dem *tet*-Repressor von *E. coli* basiert, mit der Fähigkeit das Tetrazyclin-Analogon Doxycyclin (Dox) zu binden. Im Fall des Tet-off-Systems bindet der Transaktivator tTa an TRE und aktiviert das nachgeschaltene Transgen. Bei Zugabe von Dox bindet dieses an tTa, was zu einer Konformationsänderung und zum Funktionsverlust des Transaktivators führt und die Expression des Transgens reprimiert.

Die Funktionalität des in dieser Arbeit klonierten induzierbaren LANA-1-Expressionskonstruktes wurde in HEK293-Zellen mittels transienter Transfektion überprüft (Abb.4B): das induzierbare LANA-1-Konstrukt pBSIIKS-TRE_LANA-1-bGHpolyA (TRE_LANA-1) wurde mit dem Aktivator pUHT 61-1 (tTA-A2) (Urlinger et al., 2000) in HEK-293-Zellen in Anwesenheit von ansteigenden Konzentrationen an Doxycyclin ko-transfiziert. Nach 24h wurden die Zelllysate im Westernblot auf LANA-1-Expression hin untersucht. Ohne Doxycyclin zeigte sich eine starke Induktion von LANA-1 anhand des charakteristischen Molekulargewichts von 248 bzw 240 kDa. Hingegen konnten bereits 5 ng/ml Doxycyclin die Induktion von LANA-1 reduzieren und ab einer Konzentration von 20 ng/ml die Expression vollständig reprimieren. Um eine basale Transkriptionsaktivität von TRE_LANA-1 auszuschliessen, wurde anstelle des Transaktivators Leervektor ko-transfiziert. Als allgemeine Expressionskontrolle für LANA-1 wurde das Konstrukt gewählt, bei dem LANA-1 konstitutiv unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wird (pcDNA3-LANA-1) und das als Ausgangskonstrukt für die Klonierung des induzierbaren Konstrukts in dieser Arbeit diente (Thomas Schulz, persönliche Mitteilung).

A**Binäres Expressionssystem Tet-off****B****Abb. 4: Induzierbare LANA-1-Expression mittels des Tet-off-Systems.**

Überprüfung der Funktionalität des klonierten Expressionskonstruktes durch transiente ko-Transfektion in HEK293-Zellen. **(A)** Schematische Darstellung der Doxycyclin-abhängigen Repression der LANA-1 Expression bei Kotransfektion des binären Expressionssystems **(B)** Westernblot-Analyse zum Nachweis der LANA-1 Expression in Zellkultur. Von links nach rechts: Transfektion mit 1 µg Leervektor (LV), ko-Transfektionen von 0,5 µg LV mit je 0,5 µg pcDNA3-LANA-1 (CMV_LANA-1) bzw. pBSIIKS-TRE_LANA-1-bGHpolyA (TRE_LANA-1) und 0,5 µg pUHT 61-1 (tTA-A2) mit 0,5 µg TRE_LANA-1. Anwesenheit von Doxycyclin im Zellkulturmedium reprimiert tTA-A2-induzierte Expression von LANA-1. Der Expressionsnachweis erfolgte mit einem monoklonalen anti-LANA-1-Antikörper. Zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmenge wurde die Membran in einem zweiten Schritt mit einem monoklonalen anti-GAPDH-Antikörper inkubiert.

3.1.2. Homologe Rekombination in embryonalen TBV-2-Stammzellen der Maus

Das induzierbare TRE_LANA-1 Expressionskonstrukt wurde in den genomischen Zielvektor pRosa26.6 kloniert. Dieser flankiert TRE_LANA-1 mit 5'-sowie 3'-homologen Sequenzen des *rosa26*-Lokus der Maus, um mittels einer homologen Rekombination das TRE_LANA-1 Transgen und eine Neomycin-Resistenzkassette in das Genom zu integrieren.

Der linearisierte Zielvektor pRosa26.6-TRE_LANA-1 und das homologe Rekombinationsereignis ist schematisch in Abbildung 5A dargestellt. Durch die Integration des TRE_LANA-1 Transgen werden zwei weitere EcoRV-Restriktionsschnittstellen in den *rosa26*-Lokus eingebracht, welche eine Identifizierung des Rekombinationsereignisses ermöglichen. Das linearisierte Konstrukt pRosa26.6-TRE_LANA-1 wurde über Elektroporation in embryonale TBV-2-Stammzellen, einer Sublinie von Ola129, eingebracht. Nach G418-Selektion wurde zunächst eine Southernblot-Analyse mit einer 5'-externen Sonde durchgeführt, um homolog rekombinierte ES-Zellklone zu identifizieren (Abb.5B). Dazu wurde die aus den ES-Zellen isolierte genomische DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten. Als 5'-Sonde wurde ein radioaktiv markiertes etwa 200 bp großes Fragment verwendet, das mittels PCR aus dem 5'-Homologiearm des *rosa26*-Lokus gewonnen worden war (Ralf Kühn, persönliche Mitteilung).

Zellklone, die neben der Wildtyp- Bande (11 kb) auch noch die rekombinante Bande (3 kb) aufwiesen, wurden zusätzlich mit der 3'-Sonde getestet. Hierfür wurde das etwa 600 bp große EcoRI Fragment aus dem Plasmid pCRII-3HA isoliert, radioaktiv markiert und mit der EcoRV-geschnittenen genomische DNA der ES-Zellen hybridisiert. Zum Nachweis der 6 kb grossen TRE_LANA-1 Transgenkassette wurde außerdem ein etwa 500 bp grosses radioaktiv-markiertes Fragment verwendet, welche mittels XhoI/Asp718-Verdau aus dem Plasmid pBlueSK-TRE_LANA-1 gewonnen wurde. Es wurden insgesamt 672 G418-resistente ES-Zellklone isoliert und davon 244 mittels Southernblot analysiert. Davon wiesen vier Klone das Bandenmuster einer positiven homologen Rekombination auf, was einer Ausbeute von 1,64 % entspricht. Die mittlere Ausbeute der homologen Rekombination bei dem verwendeten Zielvektor pRosa26.6 liegt, je nach finaler Konstruktgröße, bei 2,5 % (Ralf Kühn, persönliche Mitteilung).

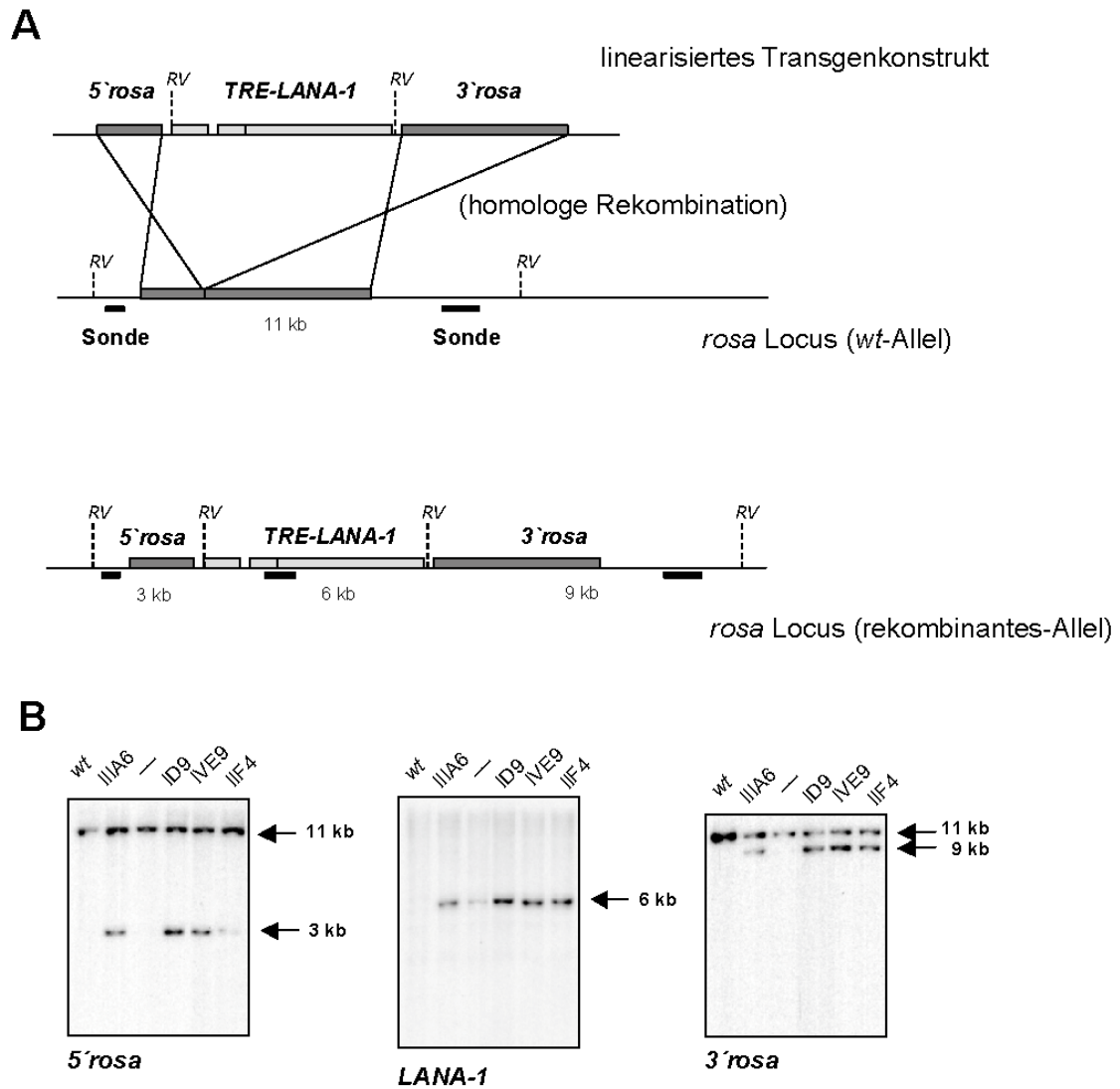


Abb. 5: Homologe Rekombination des induzierbaren LANA-1-Expressionskonstruktes in den *rosa*-Lokus. (A) Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Transgenkonstruktes p*Rosa*26.6-*TRE_LANA-1* (*TRE_LANA-1*) in den *rosa*-Lokus. Schwarze Balken symbolisieren die eingesetzten Sonden zur Genotypisierung des rekombinanten *rosa*-Lokus. Entsprechende Fragmentgrößen nach *EcoRV*-Verdau (*RV*) sind hervorgehoben. **(B)** Southernblot-Analyse zur Bestätigung der homologen Rekombination in vier ES-Zellklonen: Radioaktiv markierte DNA-Sonden gegen den 5'- bzw 3'-Homologiebereich des *rosa*26-Lokus detektieren jeweils ein 11kb grosses *EcoRV*-Fragment des *wt*-Allels. Das rekombinante Allel weist im 5'- Homologiebereich zusätzlich ein 3 kb-Fragment auf, bzw ein 9 kb-Fragment für den 3'-Homologiebereich. Eine Sonde die gegen *TRE_LANA-1* gerichtet ist, weist zusätzlich eine 6 kb-Bande auf.

3.1.3. Etablierung einer transgenen LANA-1 Mauslinie

Zwei unabhängig rekombinante TBV-2 Klone (ID9 und IVE9) wurden in Blastozysten (32-Zell-Stadium) von C57BL/6J Spenderweibchen injiziert. Dabei wurden für den Klon ID9 zwei, und für den Klon IVE9 drei männliche Chimären erzeugt. Anhand der Fellfarbe der Nachkommen konnte abgeschätzt werden, zu welchem Anteil die rekombinanten TBV-2 ES-Zellen zu den Chimären beigetragen haben.

Resultierende Chimären (129/Ola;C57BL/6J) wurden in einer Rückkreuzung mit C57BL/6J Mäusen auf eine mögliche Keimbahntransmission des Transgens TRE_LANA-1 überprüft. Potentiell transgene Nachkommen dieser Kreuzung werden anhand ihrer hellbraunen Agouti-Fellfarbe (129/Ola) identifiziert, die aus dem Genotyp der elektroporierten embryonalen Stammzellen resultierte. So zeigt beispielsweise das chimäre Männchen IVE9-6 nach Verpaarung mit einem C57BL/6J *wt*-Weibchen ausschließlich Agouti-Nachkommen in der ersten Filialgeneration (Abb.6A).

Den chimären Männchen und den Agouti-Nachkommen wurden Schwanzspitzen-Biopsien entnommen, die genomische DNA isoliert und durch eine Southernblot-Analyse auf eine mögliche Keimbahntransmission des Transgens TRE_LANA-1 hin getestet (Abb.6B). Hierbei zeigte sich allerdings bei insgesamt 47 getesteten Agouti-Nachkommen von fünf verschiedenen chimären Männchen keine Keimbahntransmission des Transgens. Die 5'-*rosa26* DNA-Sonde, die schon bei der Identifizierung der rekombinanten TBV-2 ES-Zellklone eingesetzt wurde, zeigte bei den Nachkommen ausschließlich das 11 kb *wt*-Allel Fragment nach *EcoRV*-Verdau. Einzig bei der Schwanzspitzenbiopsie des chimären Männchens IVE9-6 war eine rekombinante 5'-Region des *rosa26*-Lokus nachweisbar, nicht jedoch bei dessen Nachkommen (Abb.6B, schwarzer Pfeil).

Somit konnte bei diesem Projekt keine transgenen Mauslinie etabliert werden, welche das induzierbare Transgen TRE_LANA-1 trägt. Auf eine alternative Strategie zur Etablierung eines KS-ähnlichen Tiermodells wurde in der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen verzichtet.

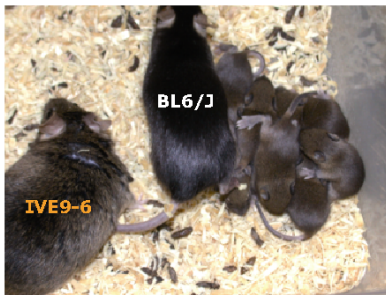
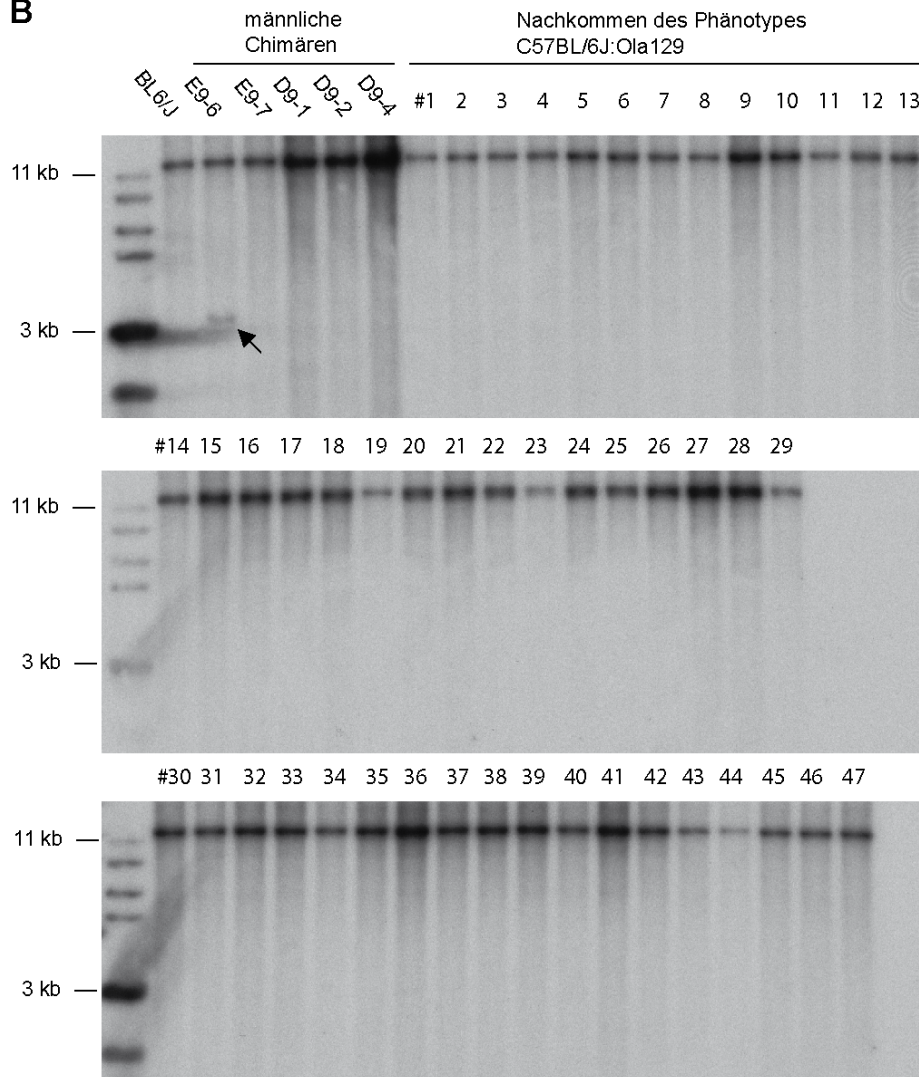
A**B**

Abb.6: Genotypisierung des induzierbaren Transgens TRE_LANA-1 in der Filialgeneration. (A) Agouti-Nachkommen der männlichen Chimäre IVE9-6 **(B)** Southernblot-Analyse von Schwanzspitzen-Biopsien der chimären Männchen und ihren Agouti-Nachkommen (C57BL/6:Ola129). Die radioaktiv markierte DNA-Sonde ist gegen den 5'-Homologiebereich des rekombinanten *rosa*-Lokus gerichtet, um das TRE_LANA-1 Transgenkonstrukts nachzuweisen. Der schwarze Pfeil zeigt ein 5'-rekombinantes *rosa26*-Allel bei der Chimäre IVE9-6 im Material aus der Schwanzspitze.

3.2. Untersuchungen zur Wirkung von HHV-8-ORF21 in Zellkulturen

Anhand der Hochdurchsatzanalyse zur Wirkung einzelner Gene des HHV-8-Genoms auf die Modulation von p53 wurde gezeigt, dass ORF21 spezifisch die Aktivität des endogenen Transkriptionsfaktors p53 in HEK293T-Zellen erhöht (Leubert, 2007). Dieser Versuchsansatz sollte nun, zur weiteren Charakterisierung der Wirkung von ORF21, mit HEK293- anstelle von HEK293T-Zellen reproduziert werden. HEK293-Zellen exprimieren nicht das *large T-antigen*, von dem bekannt ist, dass es p53-Funktionen inhibieren kann (Srinivasan et al., 1997). Zudem sollte die Wirkung von ORF21 in Anwesenheit von HHV-8-LANA-1, das die p53-Funktion inhibiert, untersucht werden, um die p53-induzierende Wirkung von ORF21 zu bestätigen. Für LANA-2 konnte bereits gezeigt werden, dass die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung eines Reporterkonstruktes, induziert durch ORF21, unterdrückt wird (Leubert, 2007). Im Gegensatz zu konstitutiv exprimiertem LANA-1, ist LANA-2 allerdings ausschließlich in HHV-8-infizierten B-Zellen nachweisbar (Rivas et al., 2001) und erlaubt nur bedingt allgemeine Rückschlüsse im Kontext einer HHV-8-Infektion.

3.2.1. ORF21 induziert die Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen sowie stabil LANA-1-exprimierende HEK293-Zellen (HEK293^{LANA-1}) wurden mit Expressionsplasmiden von ORF21, dem HHV-8-Gen K4.2 als Negativkontrolle, p53 als Positivkontrolle bzw. dem Leervektor jeweils in Kombination mit einem p53-induzierbaren GFP-Reporterplasmid (p53-Rep-GFP) ko-transfiziert. Bei dem verwendeten Reporterplasmid wird die Expression des *green fluorescent protein* (GFP) durch den aktivierten Transkriptionsfaktor p53 gesteuert (Leubert, 2007). Dieser erkennt die für ihn spezifischen und optimierten DNA-Bindungsmotive, welche vor die kodierende Sequenz des Reporters geschaltet sind.

Die Abb.7 zeigt, dass bereits nach 24 h eine verstärkte GFP-Expression in ORF21-transfizierten HEK293-Zellen (p53-Rep/ORF21) gemessen wurde. Nach 48 h hatte sich dieser Effekt noch einmal deutlich verstärkt, wobei eine ca. 10fache Erhöhung der GFP-Expression bei ORF21-exprimierenden HEK293-Zellen im Vergleich zu Leervektor-transfizierten HEK293-Zellen (p53-Rep/LV) beobachtet wurde. Das Fluoreszenzsignal war zudem bei ORF21-exprimierenden HEK293-Zellen nach 48 h fast doppelt so hoch wie in HEK293-Zellen, in denen p53 zusätzlich transfiziert wurde

(Abb.7). Daraus folgt, das ORF21 ein sehr starker Induktor des Transkriptionsfaktors p53 ist. Bei gleichzeitiger Expression von LANA-1 wird dagegen die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor reduziert (Abb.7), da LANA-1 an endogenes p53 bindet und infolgedessen p53-abhängige Transkription verhindert (Friborg et al., 1999).

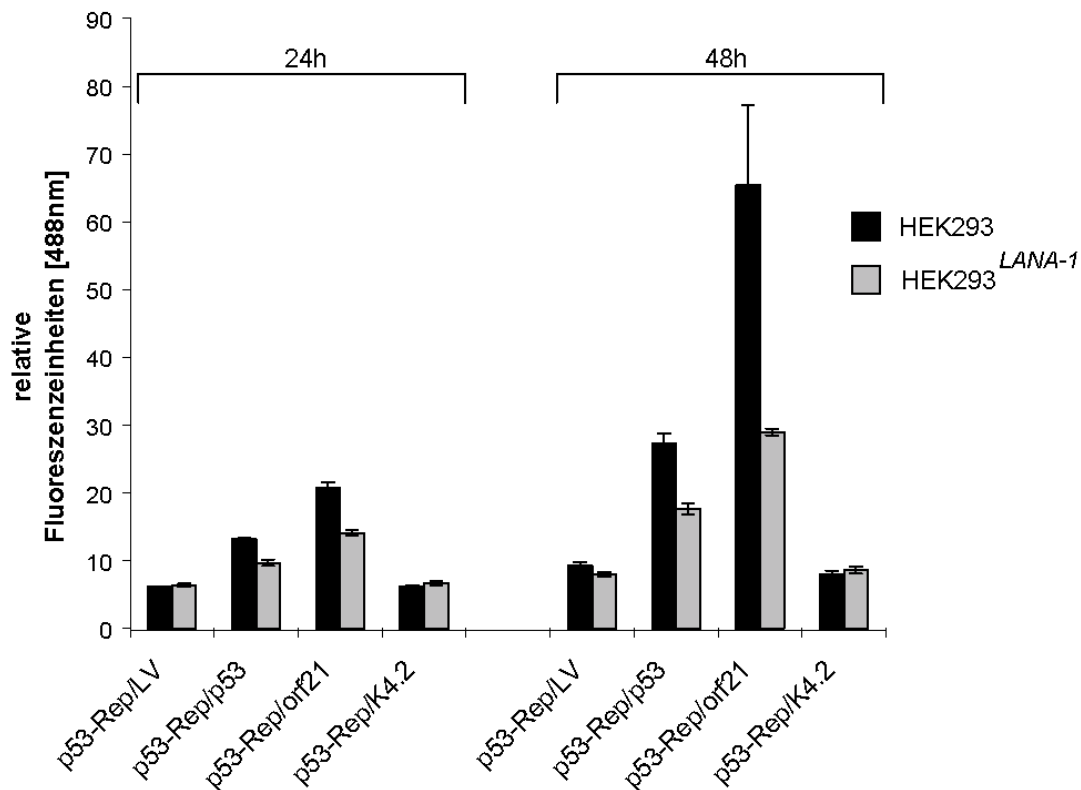


Abb.7: ORF21 induziert die Aktivität des Transkriptionsfaktors p53 in HEK293-Zellen.

In HEK293- bzw. stabil LANA-1-exprimierenden HEK293-Zellen (HEK293^{LANA-1}) wurde ein p53-GFP-Reporterplasmid (p53-Rep) ko-transfiziert in unterschiedlicher Kombination mit Expressionsplasmiden für ORF21, K4.2 oder p53 bzw. dem Leervektor (LV). Die Expressionsplasmide wurden bei den Co-Transfektionen in einem äquimolaren Verhältnis zueinander eingesetzt. 24 h und 48 h nach der Transfektion wurde die Expression des Reportergens GFP im Fluoreszenzmessgerät bei 488 nm quantitativ bestimmt. In drei unabhängigen Versuchen wurde jeder Ansatz in dreifacher Ausfertigung bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der GFP-Expression in Fluoreszenzeinheiten.

Die p53-induzierte Reporter-GFP-Expression wurde auch auf Einzelzellebene 48 h nach Transfektion mit Expressionsplasmiden bzw. Kontrollen untersucht (Abb.8). Auch die Ergebnisse auf Einzelzellebene bestätigen, dass ORF21 die Transkriptionsaktivität von p53 stark induziert. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass LANA-1 die Wirkung von ORF21 nicht aufheben, aber zumindest reduzieren kann.

Dies steht im Einklang mit den bereits vorliegenden Ergebnissen zu LANA-2, dass ebenso die Transkriptionsaktivität von p53 in HEK293T-Zellen, induziert durch ORF21, unterdrücken konnte (Leubert, 2007). Somit liegt ein weiterer Hinweis auf einen p53-abhängigen Mechanismus vor, der durch ORF21 induziert wird.

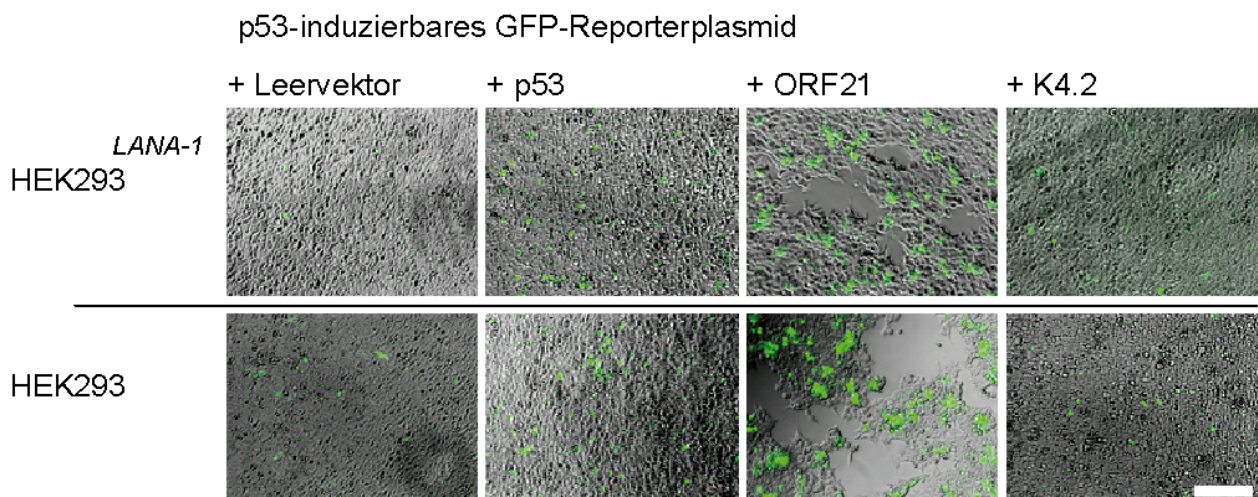


Abb.8: ORF21 induziert die Aktivität des Transkriptionsfaktors p53 in HEK293-Zellen, dargestellt auf Einzelzellebene. Wie in Abb.7 wurden HEK293 und HEK293^{LANA-1}-Zellen mit Plasmiden zur Expression von ORF21, K4.2 oder p53 bzw. dem Leervektor (LV) jeweils in Kombination mit einem p53-GFP-Reporterplasmid (p53-Rep) ko-transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Expression von GFP auf Einzelzellebene mittels Fluoreszenzmikroskopie (Olympus) nachgewiesen. Weißer Balken entspricht 100 µm.

3.2.2. DNA-Konstrukte zur Expression verschieden rekombinanter ORF21-Proteine

Um zu untersuchen, welcher Teil von ORF21 an der Aktivierung von p53, bzw. der verminderten Vitalität ORF21-exprimierender Zellen verantwortlich ist, wurden nachfolgend primäre Endothelzellen (HUVEC) und HEK293-Zellen mit verschiedenen Plasmiden zur Expression verkürzter oder mutierter ORF21-Proteine transfiziert (Abb.9). Dazu wurden das Volllängen-Konstrukt von ORF21 (AS 1-584), der N-terminale Teil (AS 1-200), der C-terminale Teil (AS 201-584) und eine Thymidinkinase-defiziente ORF21-Mutante nach Lock et al. eingesetzt, bei der die Aminosäure 265, Glycin, gegen Alanin und die Aminosäure 372, Phenylalanin, gegen Valin ausgetauscht wurden (Lock et al., 2002).

Zum Nachweis der Expression der verschiedenen HHV-8-ORF21 Varianten auf Proteinebene wurden die entsprechenden cDNAs mit einem Myc-Epitop C-terminal im Leseraster fusioniert (Leubert, 2007). Da bislang noch kein spezifischer Antikörper gegen HHV-8-ORF21 kommerziell verfügbar ist, können auf diesem Weg die exprimierten ORF21-Proteine mittels eines anti-Myc-Antikörpers nachgewiesen werden.

In einer ersten Analyse dieser Konstrukte in HEK293T-Zellen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53, konnte demonstriert werden, dass das Volllängen ORF21-Konstrukt, der N-terminale Teil, sowie die Thymidinkinase-defiziente ORF21-Mutante, nicht jedoch der C-terminale Teil alleine ein p53-induzierbares GFP-Reporterplasmid aktivieren kann (Leubert, 2007).

ORF21-Expressionskonstrukte

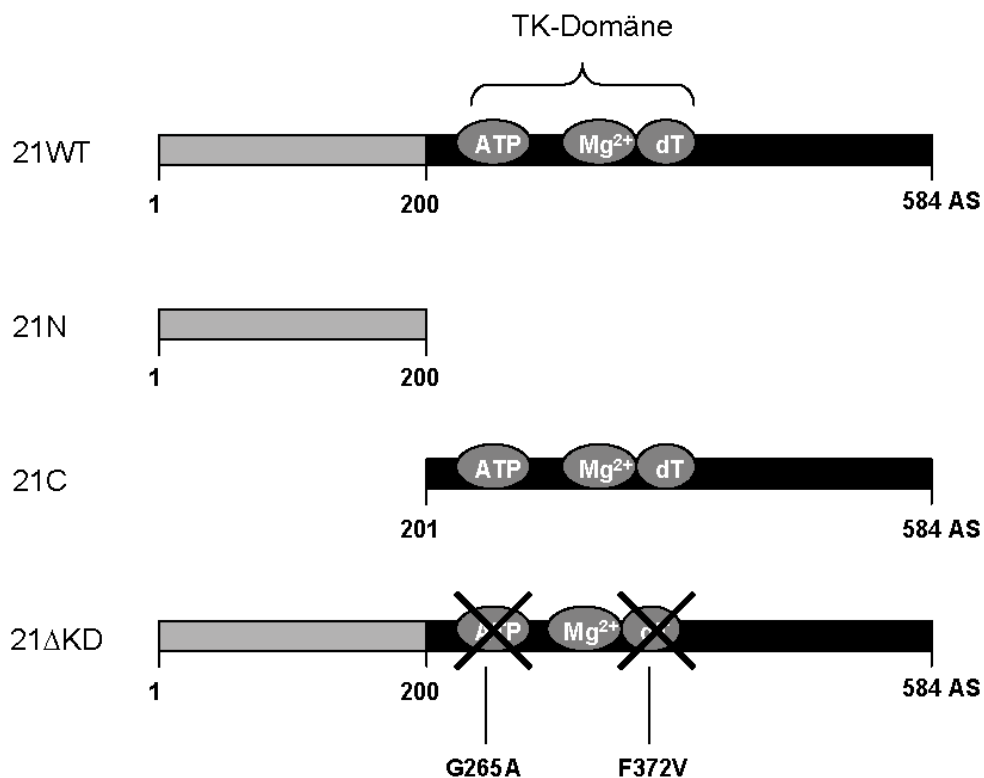


Abb.9: Schematische Darstellung der Deletionsvarianten von ORF21 für die Untersuchung zur Aktivierung des Tumorsuppressors p53 (nach Leubert, 2007).

Die Aminosäuren (AS) 1-200 kodieren den N-terminalen Teil (grau), AS 201-584 den C-terminalen Teil (schwarz) von ORF21. Die Mutationen der Thymidinkinase-defizienten ORF21-Mutante (21ΔKD) sind durch Kreuze bei G265A und F372V symbolisiert. Die verschiedenen ORF21-Konstrukte wurden in den pcDNA4-Expressionsvektor (Invitrogen) kloniert, wobei sie C-terminal mit einem Myc-Epitop fusioniert wurden, um die Expression auf Proteinebene nachweisen zu können (Leubert, 2007).

3.2.3. Aktivierung von p53 durch Expression von ORF21 in primären Endothelzellen

Da das KS einen Tumor endothelialen Ursprungs darstellt, bei dessen Krankheitsverlauf HHV-8 von entscheidender Bedeutung ist (Dourmishev et al., 2003), wurde als nächstes untersucht, ob die Wirkung von ORF21 auf p53 auch in primären Endothelzellen relevant ist.

Wegen der starken Beeinträchtigung der Vitalität von primären Endothelzellen bei herkömmliche Zelltransfektionen, wie Lipofektion oder Elektroporation, wurden HUVEC mittels Nukleofektion (Amaxa), einer sehr zellschonenden und effizienten Methode, transfiziert. Um einen Überblick über die Transfektionseffizienz sowie die Vitalität der transfizierten HUVEC zu erhalten, wurden diese mit einem GFP-Plasmid transfiziert und die Expression von GFP untersucht. In Abb.10 wird gezeigt, dass die Transfektionsrate 24 h nach Transfektion durchschnittlich 40 bis 50 % betrug.

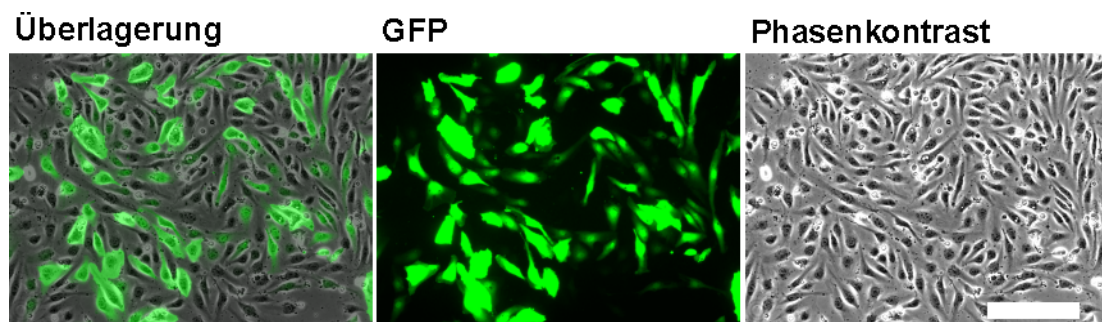


Abb.10: Expression von GFP in nukleofizierten HUVEC. HUVEC wurden mittels Nukleofektion mit dem Expressionsplasmid pcDNA4-eGFP transfiziert und die Expression von GFP mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus) dokumentiert. Der Längenstandard (weißer Balken) entspricht 200 μ m.

Um die Expression der rekombinanten ORF21-Proteine in transient nukleofizierten HUVEC zu untersuchen, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Aufgrund der C-terminalen Fusion mit einem Myc-Epitop konnten sowohl das gesamte ORF21 (21WT), als auch die verkürzten ORF21-Proteine (21N; 21C) und die Thymidinkinasedefiziente Mutante (21 Δ KD) in den entsprechenden Größen mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörpers (α -Myc) nachgewiesen werden (Abb.11). In einem Parallelansatz wurde die Expression von p53 in den unterschiedlich transfizierten HUVEC untersucht. Als Positivkontrolle wurden Leervektor-transfizierte

HUVEC mit 100 nM Staurosporin für 3 h behandelt, was zu einer Aktivierung von p53 führt.

Eine starke p53-Expression konnte in Staurosporin-behandelten HUVEC (LV+ST), sowie in 21WT, 21N und 21ΔKD exprimierenden HUVEC nachgewiesen werden (Abb.11), was auf eine Aktivierung von p53 schließen lässt. HUVEC, die 21C oder GFP exprimierten bzw. Leervektor-transfizierte DMSO-behandelte HUVEC wiesen dagegen eine wesentlich schwächere Expression von p53 auf (Abb.11). Der Nachweis von GAPDH diente als Kontrolle, dass in allen Ansätzen vergleichbare Mengen an Protein aufgetragen wurden (Abb.11).

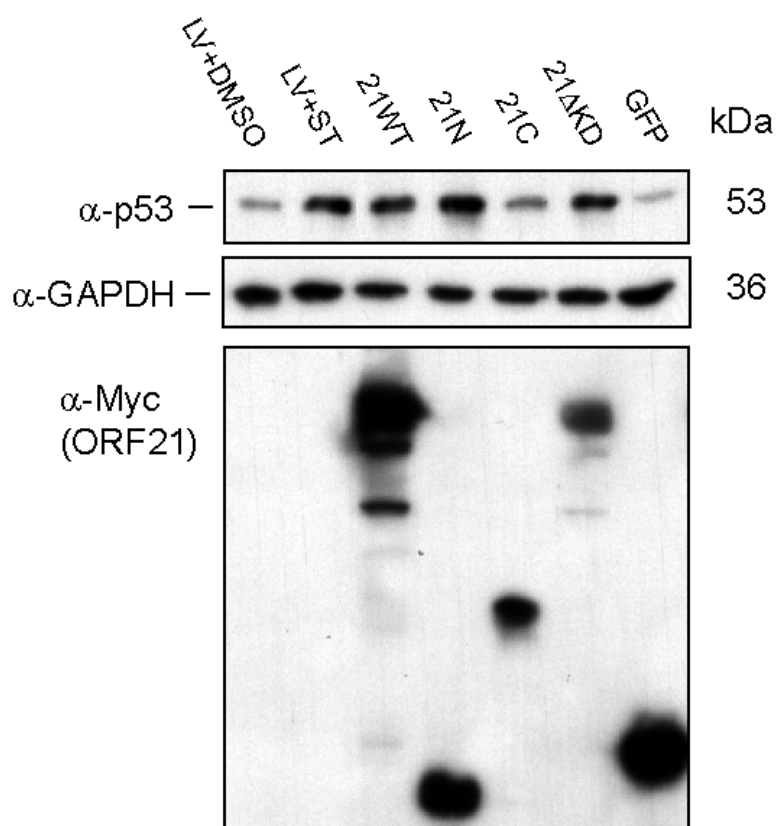


Abb.11: Die Expression von ORF21 induziert p53 in HUVEC.

Westernblot-Analyse zum Nachweis der Expression von p53 in transfizierten HUVEC, die ORF21 (21WT), C-terminal verkürztes ORF21 (21N), N-terminal verkürztes ORF21 (21C), die Thymidinkinasedefiziente Mutante von ORF21 (21ΔKD) oder als Kontrolle GFP exprimierten. Als Positivkontrolle für die Aktivierung von p53 wurden Leervektor (LV)-transfizierte HUVEC für 3 h mit 100 nM Staurosporin (ST), welches in DMSO gelöst war, behandelt. Zum Nachweis von p53 (α-p53) und GAPDH (α-GAPDH) wurden monoklonale Antikörper eingesetzt. Parallel dazu wurde in einem zweiten Ansatz die Membran mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper (α-Myc) inkubiert und die Expression der Myc-fusionierten ORF21-Proteine bzw. Myc-fusioniertem GFP nachgewiesen.

3.2.4. ORF21 aktiviert p53 in primären Endothelzellen über eine Phosphorylierung an Serin15

Die Aktivität von p53 wird über dessen Phosphorylierung reguliert (Bode & Dong, 2004), wobei die Phosphorylierung an Serin15 von zentraler Bedeutung ist (Shieh et al., 1997). Dadurch wird die Interaktion von p53 mit dessen Inhibitor, dem humanen Homolog von *Murine Double Minute-2* (HDM-2), gelöst und p53 kann seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausführen. Die dadurch erhöhte Transkriptionsaktivität führt zur Expression von Genen, die Überleben und Apoptose steuern (Vousden & Lane, 2007). Da gezeigt werden konnte, dass ORF21 die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor erhöht, stellte sich als nächstes die Frage, ob ORF21 eine Phosphorylierung von p53 beeinflusst.

Um den Phosphorylierungsstatus von p53 in ORF21-exprimierenden HUVEC, detaillierter zu untersuchen, wurden immunocytochemische Färbungen durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion auf die Expression und Lokalisation von p53 (grüne Fluoreszenz) und die Expression von ORF21 (21WT), dem N- und C-Terminus von ORF21 (21N und 21C), der TK-defizienten ORF21-Mutante (21ΔKD) und dem HHV-8-Protein K4.2 untersucht. Die ORF21-Proteine sowie K4.2 sind C-terminal mit Myc fusioniert und wurden mit dem anti-Myc-Antikörper (rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Zum Nachweis von aktiviertem phosphoryliertem p53 wurden die nukleofizierten HUVEC mit einem polyklonalen Antikörper (α-p53 phosSer15), der spezifisch die p53-Phosphorylierung an Serin15 erkennt, inkubiert (grüne Fluoreszenz).

Nur in den Endothelzellen, die 21WT, 21N oder 21ΔKD exprimierten, konnte an Serin15-phosphoryliertes p53 im Zellkern nachgewiesen werden (Abb.12 A,B,D). Als Positivkontrolle dienten HUVEC, die mit Staurosporin (in DMSO gelöst) behandelt worden waren und bei denen ebenfalls Serin15-phosphoryliertes p53 im Zellkern nachgewiesen wurde (Abb.12F). Die Expression von 21C führte dagegen nicht zu einer Aktivierung von p53 (Abb.12C). Bei diesen Zellen wurde kein phosphoryliertes p53 im Zellkern nachgewiesen. Ebenso zeigte sich bei den Kontrollen HHV-8-K4.2 oder Leervektor-transfizierten HUVEC kein aktiviertes p53 im Zellkern (Abb.12E,G).

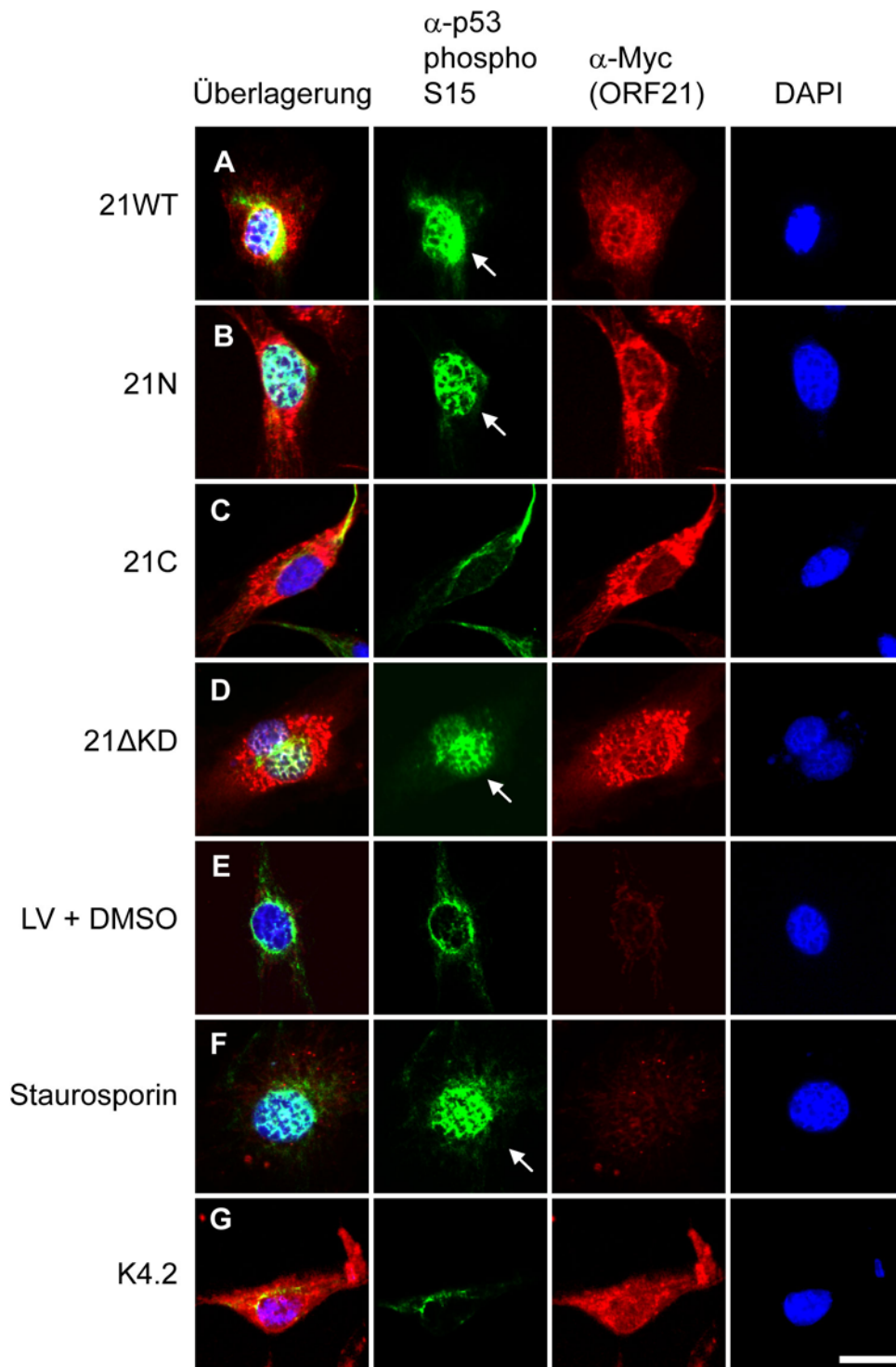


Abb.12: ORF21 aktiviert p53 in primären Endothelzellen über eine Phosphorylierung an Serin15. Doppel-Immunfluoreszenzfärbung mit einem polyklonalen p53-phosSer15-Antikörper (α -p53 phosSer15) in Kombination mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper (α -Myc), gefolgt von Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Akkumulation von phosphoryliertem p53 (grüne Fluoreszenz) im Zellkern ist durch weiße Pfeile gekennzeichnet (A,B,D,F). Als Positivkontrolle für aktiviertes p53 dienten Staurosporin-behandelte (100 nM, 3 h) LV-transfizierte HUVEC (LV+ST; F). Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung (blau) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Olympus). Der Längenstandard (weißer Balken) entspricht 50 μ m.

Die p53-Expression wurde mit einem monoklonalen p53-Antikörper (α -p53) dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass p53 in den Endothelzellen im Zellkern akkumuliert, die 21WT, die ORF21-Mutante 21 Δ KD oder 21N exprimierten (Abb.13A,B,D,F), während p53 in den 21C- oder HHV-8-K4.2-exprimierenden bzw. Leervektor-transfizierten HUVEC nur im Zytosol nachweisbar war (Abb.13C,E,G). Zusammenfassend kann anhand dieser Ergebnisse gesagt werden, dass in allen transfizierten Zellen p53 exprimiert wird, dass jedoch nur die Expression von ORF21 zu einer Phosphorylierung von p53 an Serin15 führt. Durch diese Phosphorylierung wird p53 aktiviert und akkumuliert im Zellkern, um die Expression von Genen zu kontrollieren, die Überleben und Apoptose steuern. Weiterhin wurde gezeigt, dass der N-terminale Teil von ORF21 die Aktivierung von p53 in primären Endothelzellen vermittelt.

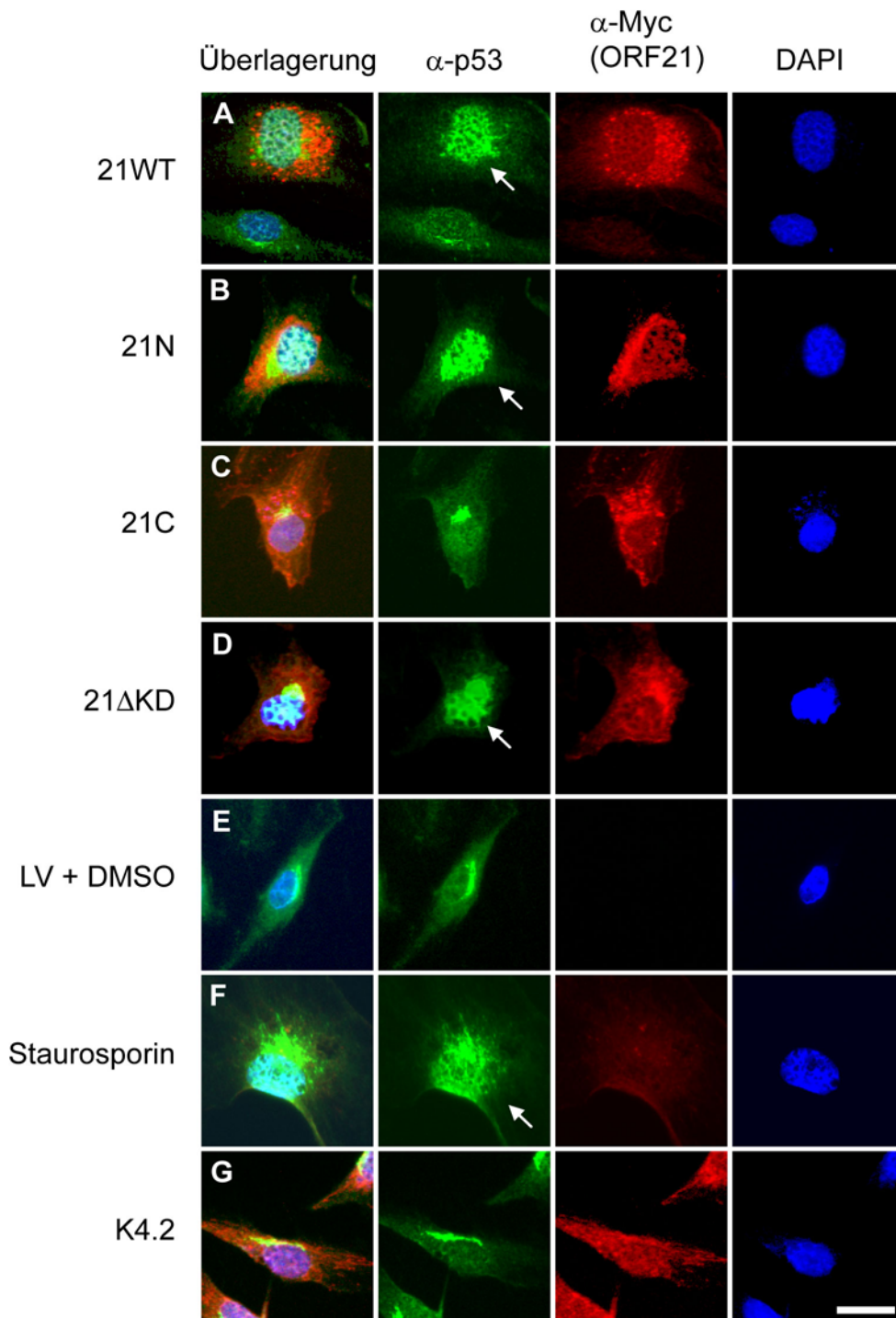


Abb.13: p53 akkumuliert im Zellkern in ORF21-exprimierenden HUVEC. Doppel-Immunfluoreszenzfärbung mit einem monoklonalen p53-Antikörper (α -p53) in Kombination mit einem polyklonalen anti-Myc-Antikörper (α -Myc), gefolgt von Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern. Expression und Translokation von p53 (grüne Fluoreszenz) und die Expression von rekombinanten ORF21-Proteinen (A-D) und Kontrollen (E-G) 24 h nach Transfektion. Die ORF21-Proteine wurden über das fusionierte Myc-Epitop mittels eines anti-Myc-Antikörpers (rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Akkumuliertes p53 im Zellkern ist mit weißen Pfeilen markiert. Als Positivkontrolle wurden Leervektor-transfizierte (LV) HUVEC für 3 h mit 100 nM Staurosporin (LV+ST) behandelt (F). Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung (blau) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Olympus). Der Längenstandard (weißer Balken) entspricht 50 μ m.

3.2.5. ORF21 aktiviert p53 in HEK293-Zellen über eine Phosphorylierung an Serin15

Um die vorausgegangenen Ergebnisse zu bestätigen sollte ORF21 in HEK293-Zellen exprimiert werden und anschliessend der Phosphorylierungs-status von p53 an Ser15 untersucht werden. Zudem sollte die Wirkung der ORF21-Expression einmal in und ohne Anwesenheit von LANA-1 untersucht werden, um den Hinweis eines p53-abhängigen Mechanismus nachzugehen.

Dazu wurden HEK293- und HEK293^{LANA-1}-Zellen mit Expressionskonstrukten für ORF21 bzw. dem Leervektor transient transfiziert. 24 h bzw. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteinextrakte immunchemisch analysiert. Hierzu wurde ein spezifischer Antikörper eingesetzt, der nur die p53-Phosphorylierung an Serin15 erkennt.

Wie in Abb.14 zu erkennen ist, konnte tatsächlich eine Phosphorylierung von p53 an Serin15 in ORF21-exprimierenden HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurde 24 h nach der Transfektion ein deutliches Signal beobachtet, das 48 h nach Transfektion schon wieder abklang (Abb.14). Dagegen konnten in HEK293^{LANA-1}-Zellen, welche mit ORF21 transfiziert wurden, keine bzw. nur sehr schwache Signale nachgewiesen werden (Abb.14). Als Kontrolle dienten Leervektor-transfizierte HEK293-Zellen, die für 24 h mit 100 nM Staurosporin behandelt worden waren. Um zu zeigen, dass in allen Zellen p53 exprimiert wurde, aber eine Phosphorylierung von p53 nur in Anwesenheit von ORF21 oder nach Behandlung mit der Positivkontrolle Staurosporin auftrat, wurde auf der gleichen Membran auch das unphosphorylierte p53 (α -p53) nachgewiesen (Abb.14).

In Parallelansätzen wurde die Expression von ORF21 sowie LANA-1 in den Zellextrakten untersucht. Die Expression von ORF21 konnte aufgrund der C-terminalen Fusion von ORF21 mit dem Myc-Epitop, mit einem anti-Myc-Antikörper nachgewiesen werden (Abb.14). Der Nachweis von LANA-1 erfolgte mit einem monoklonalen anti-LANA-1-Antikörper (Abb.14). Um zu zeigen, dass in allen Ansätzen die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde, wurde außerdem noch GAPDH nachgewiesen (Abb.14).

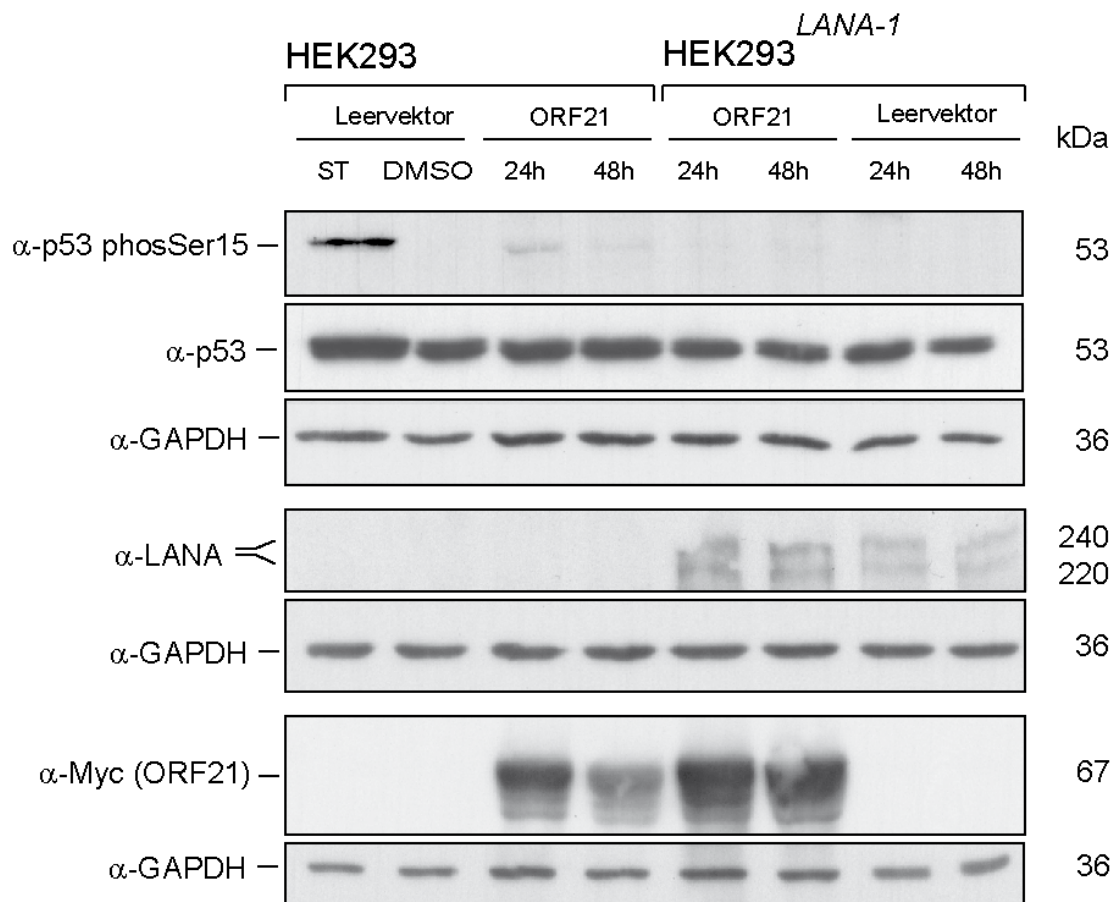


Abb.14: Die Expression von ORF21 führt zur Aktivierung von p53 über eine Phosphorylierung an Serin15. Westernblot-Analyse zum Nachweis von Serin15-phosphoryliertem p53, p53, ORF21 und LANA-1 in HEK293- und HEK293^{LANA-1}-Zellen. Die Zellen wurden zur Expression von ORF21 mit pcDNA4-*orf21* oder dem Leervektor transfiziert und 24 h bzw. 48 h nach Transfektion analysiert. Zum Nachweis von Serin15-phosphoryliertem p53 wurde ein polyklonaler Antikörper (α -p53 phosSer15) und monoklonale Antikörper für den Nachweis von p53 (α -p53), LANA-1 (α -LANA-1) sowie ORF21 (α -Myc) eingesetzt. Als Positivkontrolle für phosphoryliertes p53 wurden Leervektor-transfizierte HEK293-Zellen für 24 h mit 100 nM Staurosporin (ST) behandelt. Nach Entfernen der gebundenen Antikörper wurden die Membranen mit einem monoklonalen GAPDH-Antikörper (α -GAPDH) inkubiert.

3.2.6. Der N-terminale Teil von ORF21 induziert in primären Endothelzellen einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp

Da eine Phosphorylierung von p53 an Ser15 mit Apoptose einhergeht (Bode & Dong, 2004) wurde als nächstes untersucht, ob die ORF21-vermittelte Aktivierung von p53 in primären Endothelzellen einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp induzieren kann. Bislang wurde von zwei Gruppen berichtet, dass die ORF21-Expression das Zellwachstum beeinträchtigt (Cannon et al., 1999; Gustafson et al., 2000). Hierbei

wurde ausschließlich die TK-Funktionalität und die zugehörige Substratspezifität untersucht. Eine weiterführende Charakterisierung der transfizierten Zellen im Hinblick auf die Vitalität nach ORF21-Expression wurde jedoch nicht durchgeführt.

Dafür wurde das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) von transfizierten HUVEC (36h nach Transfektion) analysiert. Der Zusammenbruch von $\Delta\Psi$ ist ein frühes Ereignis der Apoptose und kann durch den kationischen Farbstoff JC-1 nachgewiesen werden, der ausschließlich an Membranen der Mitochondrien bindet die über ein intaktes Membranpotential verfügen (Cossarizza et al., 1993; Desagher et al., 1999).

Die Expression von ORF21 (21WT), dem N-terminalen Teil von ORF21 (21N) oder der Thymidinkinasedefizienten ORF21-Mutante (21 Δ KD) führte in Endothelzellen verstärkt zu einer Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotenzials, jedoch nicht die Expression des C-terminalen Teils (21C) (Abb.15). Hierbei betrug der Anteil der Zellen ca. 50 % in den HUVEC-Kulturen, deren Zellen ORF21, den N-terminalen Teil von ORF21 oder die Thymidinkinasedefiziente ORF21-Mutante exprimierten (Abb.15). Die Expression des C-terminalen Teils von ORF21 (21C) induzierte keine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotenzials in den Endothelzellen. Als Kontrolle wurden HUVEC mit dem HHV-8-Gen K4.2 transfiziert, um den natürlichen Zustand in der Population zu bestimmen. Als Positivkontrolle depolarisierter mitochondrialer Membranen im Verlauf von Apoptose dienten Leervektor-transfizierte Zellen, die für 3 h mit Staurosporin (100 nM), gelöst in DMSO, behandelt wurden (Abb.15).

Zusammenfassend kann anhand dieser Ergebnisse gesagt werden, dass das HHV-8-Protein ORF21 einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp induziert, der durch eine Depolarisation des mitochondriale Membranpotenzials gekennzeichnet ist und mit einer Aktivierung (Phosphorylierung von Ser15) von p53 korreliert. Zudem wurde demonstriert, dass dieser Effekt nicht über die Thymidinkinasedomäne sondern über den N-terminalen Teil von ORF21 vermittelt wird.

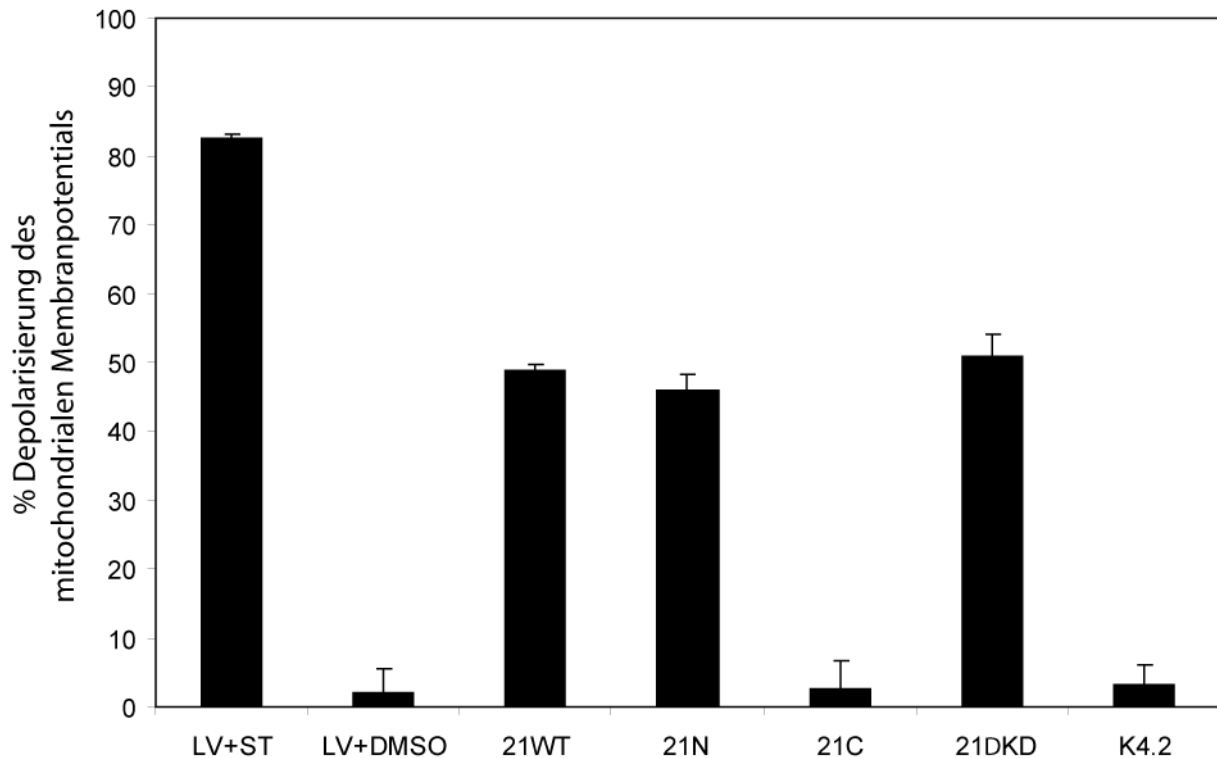


Abb.15: Der N-terminale Teil von ORF21 induziert in primären Endothelzellen einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) mittels JC-1-Färbung in HUVEC, die mit verschiedenen ORF21-Expressionskonstrukten transfiziert worden waren. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit JC-1 gefärbt. Als Positivkontrolle für ein depolarisiertes Membranpotential wurden LV-transfizierte HUVEC für 3 h mit 100 nM Staurosporin, gelöst in DMSO, behandelt (LV+ST). Intakte Mitochondrien wurden bei einer Anregung mit 590 nm in einem Fluoreszenzmessgerät analysiert und der Anteil von Zellen mit depolarisierten mitochondrialen Membranen dargestellt. In drei unabhängigen Versuchen wurde jeder Ansatz in dreifacher Ausfertigung angefertigt, davon Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und der Anteil toter Zellen im Vergleich zur Kontrolle (LV+ST = 100 %) angegeben.

3.2.7. ORF21 induziert in HEK293-Zellen einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp

3.2.7.1. Expression rekombinanter ORF21-Proteine in HEK293-Zellen

Die Expression dieser rekombinanten ORF21-Proteine in HEK293-Zellen wurde mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper (α -Myc) im Westernblot untersucht (Abb.16). Hierbei konnten sowohl das ORF21-Wildtyp (21WT) als auch die verkürzten ORF21-Proteine (21C; 21N) sowie die Thymidinkinase-defiziente ORF21-Mutante (21 Δ KD) nachgewiesen werden. Als Kontrollen wurden HEK293-Zellen, die mit dem Leervektor bzw. pcDNA4-GFP transfiziert worden, eingesetzt. In allen Fällen entsprachen die nachgewiesenen Molekulargewichte der Myc-fusionierten ORF-Proteine den vorher berechneten Molekulargewichten: ORF21-Wildtyp: 65 kDa, N-Terminus Teil von ORF21: 23 kDa, C-Terminus von ORF21: 43 kDa, die Thymidinkinasedefiziente ORF21-Mutante: 65 kDa. Als Expressionskontrolle diente GFP, an das ebenfalls ein Myc-Epitop fusioniert ist (GFP, 33 kDa).

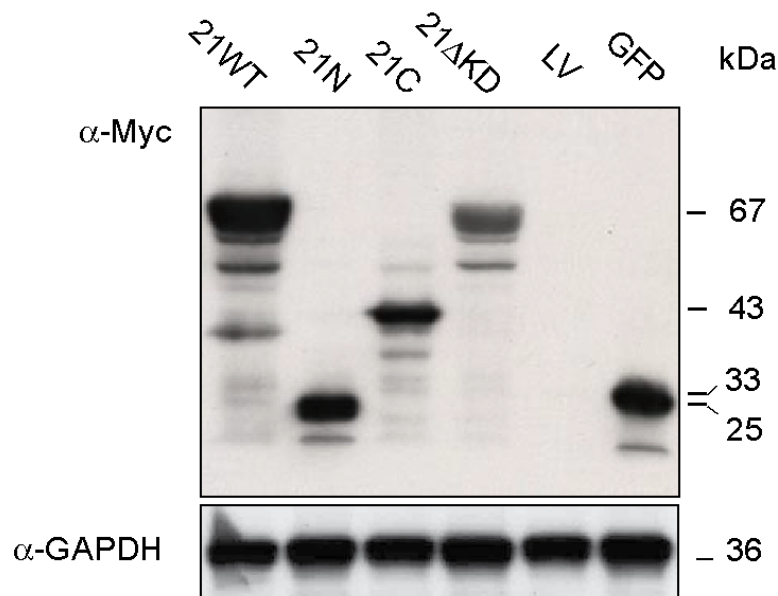


Abb.16: Expression von rekombinanten ORF21-Proteinen in HEK293-Zellen.

Westernblot Analyse ORF21-transfizierter HEK293-Zellen, die 21WT, 21N, 21C, GFP-Myc oder 21 Δ KD exprimierten bzw. mit dem Leervektor (LV) transfiziert waren. Der Nachweis der Myc-Epitop-fusionierten Proteine erfolgte mittels eines monoklonalen anti-Myc-Antikörper (α -Myc). zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmenge wurde mit einem monoklonalen anti-GAPDH-Antikörper (α -GAPDH) inkubiert.

3.2.7.2. Der N-terminale Teil von ORF21 ist ausreichend für den ORF21-induzierten Apoptose-ähnlichen Phänotyp

Um die Vitalitätsrate der ORF21-exprimierenden Zellen zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen oder LANA-1-exprimierende HEK293-Zellen (HEK293^{LANA-1}) mit dem Expressionsplasmid für ORF21 (Abb.17A) oder dem Leervektor transfiziert (Abb.17B,C) und 15 h nach Transfektion mittels des JC-1-Farbstoffs das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) gemessen. In Abb.17 ist mit Fluoreszenzmikroskopie die JC-1-Färbung der Mitochondrien in Leervektor-transfizierten und DMSO- oder Staurosporin-behandelten bzw. ORF21 (21WT) HEK293- sowie LANA-1-exprimierenden HEK293-Zellen (HEK293^{LANA-1}) dargestellt. Anhand dieser Abbildung wird ebenfalls deutlich, dass die Expression von ORF21 den Anteil der Mitochondrien mit intaktem $\Delta\Psi$ (rote Fluoreszenz) deutlich vermindert und dass die Expression von LANA-1 dem entgegenwirkt, was sich in einer beinahe durchgehenden roten Fluoreszenzfärbung der gefärbten intakten Mitochondrien durch JC-1 äussert (Abb.17A,B,C jeweils rechte Spalte).

Um ebenso wie bei den primären Endothelzellen die Wirkung von ORF21 in der Struktur einzugrenzen, wurden HEK293-, bzw. HEK293^{LANA-1}-Zellen zusätzlich mit den verkürzten, bzw. mutierten Varianten von ORF21 transfiziert und das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) wie bereits beschrieben analysiert (Abb). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von ORF21 (21WT), dem N-terminalen Teil von ORF21 (21N) oder der Thymidinkinasedefizienten ORF21-Mutante (21 Δ KD), jedoch nicht die Expression des C-terminalen Teils (21C) in HEK293-Zellen zu einer Erhöhung von depolarisierten mitochondrialen Membranen führt (Abb.18).

Wurde dagegen in diesen Zellen zusätzlich LANA-1 stabil exprimiert, so schützt die beschriebene anti-apoptotische Wirkung von LANA-1 möglicherweise vor einer Depolarisierung. Bei Expression von ORF21, dem N-terminalen Teil von ORF21 oder der Thymidinkinasedefizienten ORF21-Mutante in HEK293-Zellen betrug der Anteil von depolarisierten $\Delta\Psi$ ca. 75%, in stabil LANA-1-exprimierenden HEK293-Kulturen (HEK293^{LANA-1}) nur noch ca. 20-30 % der Gesamtpopulation (Abb.18). Die Expression des C-terminalen Teils von ORF21 (21C), sowohl in HEK293- als auch HEK293^{LANA-1}-Kulturen, führte zu keiner Erhöhung des Anteils an depolarisierten mitochondrialen Membranen. Als Kontrolle für depolarisierte mitochondriale Membranen im Verlauf von Apoptose wurden Leervektor-transfizierte Zellen für 15 h mit 100 nM Staurosporin, gelöst in DMSO, behandelt. Als weitere Kontrolle diente DMSO (Abb.18).

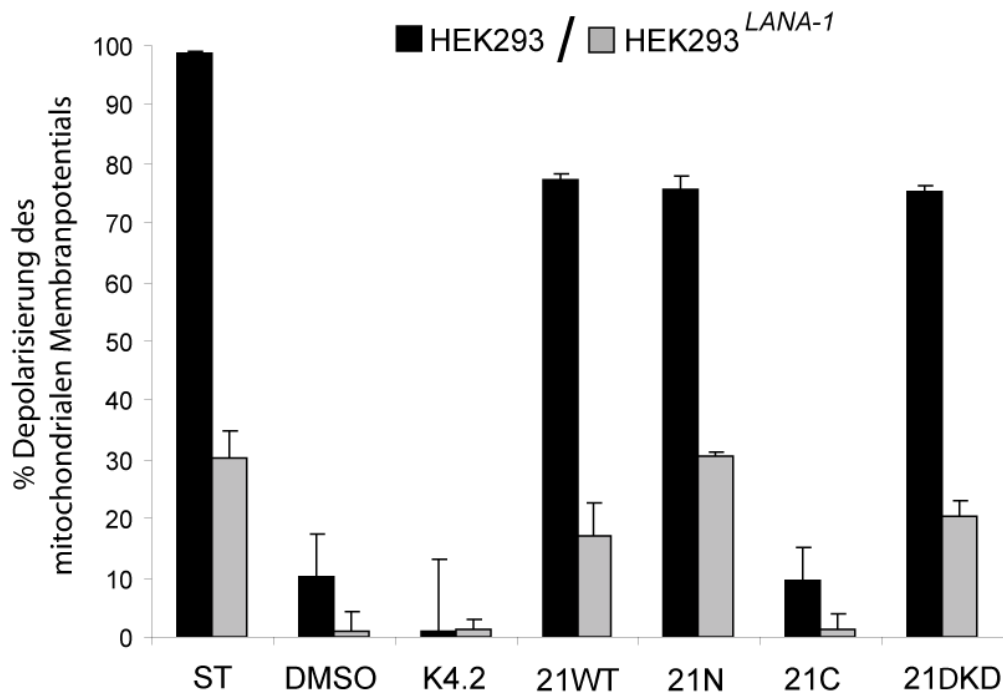


Abb.18: Der N-terminale Teil von ORF21 ist ausreichend für den ORF21-induzierten Apoptose-ähnlichen Phänotyp. Bestimmung der des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$) mittels JC-1-Färbung in HEK293- bzw. HEK293^{LANA-1}-Zellen, die ORF21 (21WT), den N-terminalen Teil von ORF21 (21N), den C-terminalen Teil von ORF21 (21C), die Thymidinkinasedefiziente Mutante von ORF21 (21 Δ KD) oder HHV-8-K4.2 exprimierten bzw. mit dem Leervektor (LV) transfiziert wurden. 15 h nach Transfektion wurden die Zellen mit JC-1 gefärbt. Als Positivkontrolle wurden LV-transfizierte HEK293-Zellen für 15 h mit 100 nM Staurosporin, gelöst in DMSO, behandelt (LV+ST). **(A)** Intakte Mitochondrien wurden bei einer Anregung mit 590 nm in einem Fluoreszenzmessgerät analysiert und der Anteil von Zellen mit intaktem mitochondrialen Membranpotenzial quantitativ dargestellt. In drei unabhängigen Versuchen wurde jeder Ansatz dreifach durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet und der Anteil von Zellen mit depolarisiertem mitochondrialen Membranpotenzial in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (LV+ST = 100 %) angegeben.

3.2.7.3. Inhibierung des ORF21-induzierten Apoptose-ähnlichen Phänotyps durch LANA-1 in HEK293-Zellen

Um die Vitalitätsrate der ORF21-exprimierenden Zellen auch mit einem alternativen Apoptose-Testsystem zu JC-1 zu analysieren, wurden HEK293-Zellen gleichzeitig mit einem markierten Caspaseinhibitor (FAM-VAD-FMK) und Propidiumjodid inkubiert. In apoptotischen Zellen bindet der Caspaseinhibitor kovalent alle aktivierten Caspasen. Somit sind apoptotische Zellen anhand der Carboxyfluorescein-Markierung des Inhibitors nachweisbar. Mit Propidiumjodid, einem DNA-interkalierenden Agens, lassen sich tote Zellen mit durchlässigen Zellmembranen nachweisen. Dieses Merkmal ist charakteristisch für späte Zeitpunkte in der Apoptose, aber auch ein generelles Merkmal für nekrotische Zellen, bei denen es bereits zu einem frühen Zeitpunkt zu einem unkontrollierten Zusammenbruch der Zellmembranen kommt (Schwartzman & Cidlowski, 1993).

HEK293-Zellen bzw. stabil LANA-1-exprimierende HEK293-Zellen (293^{LANA-1}) wurden mit einem Expressionsplasmid, kodierend für ORF21, oder einem Leervektor transfiziert. Nach Inkubation mit FAM-VAD-FMK und Propidiumiodid wurden die Zellen in der Durchflußzytometrie (FACS) untersucht. Als Positivkontrolle für nekrotische Zellen wurden die Zellen mit DMSO und für Apoptose mit Staurosporin behandelt.

Leervektor-transfizierte HEK293- bzw. HEK293^{LANA-1}-Zellen zeigten keine Propidiumiodid-positiven Zellen und eine Population mit aktivierten Caspasen von 6% bzw. 8% (Abb.19A). Bei der Expression von ORF21 zeigten HEK293-Zellen sowohl einen höheren Anteil von Propidiumiodid-positiven (31%) und Caspase-positiven (12%) wie auch Propidiumiodid- und gleichzeitig Caspase-positiven Zellen (8%) als HEK293^{LANA-1}-Zellen. Deren Anteil an Propidiumiodid-positiven Zellen betrug 14%, an Caspase-positiven 2% und an Propidiumiodid- und Caspase-positiven Zellen 5% (Abb.19B).

Bei der Apoptosekontrolle zeigten HEK293-Zellen 25% Propidiumiodid-positiv, 20% Caspase-positiv und eine Mischpopulation von sowohl Propidiumiodid- und Caspase-positiven Zellen von 12% (Abb.19C). Wie erwartet zeigten HEK293^{LANA-1}-Zellen im Kontrollansatz eine verminderte Apoptoserate, da von LANA-1 bekannt ist, dass es vor p53-abhängiger Apoptose schützt. Hier betrug der Anteil von Propidiumiodid-positiven Zellen 17%, von Caspase-positiven Zellen 6% und der Anteil von Propidiumiodid- und Caspase-positiven Zellen insgesamt 9% (Abb.19C).

Bei dem Kontrollansatz für Nekrose zeigten sowohl HEK293- als auch HEK293^{LANA-1}-Zellen einen hohen Anteil Propidiumiodid-positiver Zellen von 42% bzw. 35% (Abb.19D), ohne einen Anteil von Caspase-positiven Zellen.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich zusammenfassend sagen, dass ORF21 in HEK293-Zellen einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp aufzeigt, der durch aktivierte Caspasen und geschädigte Zellmembranen charakterisiert ist. Des Weiteren lässt sich festhalten, dass LANA-1 einen schützenden Effekt auf die ORF21-transfizierten Zellen hat und dies über die Inhibierung von p53-abhängiger Apoptose ablaufen könnte.

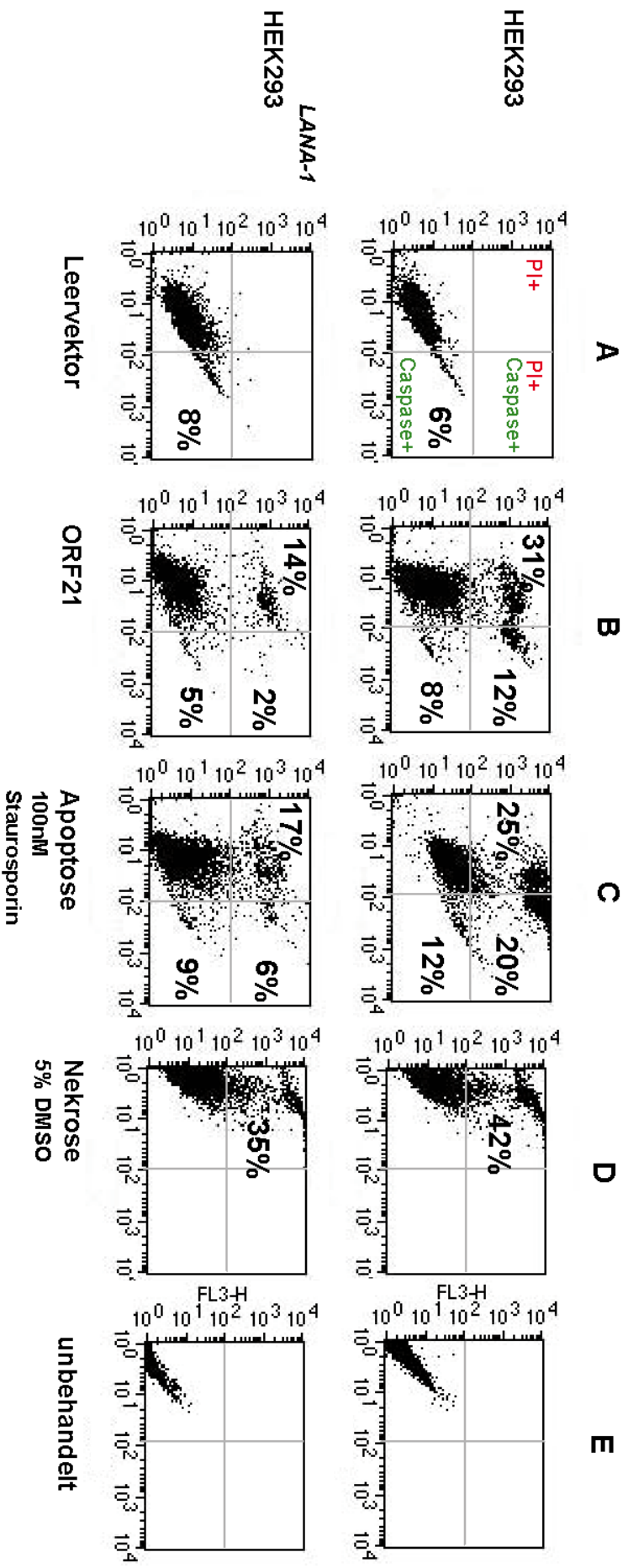


Abb. 19: ORF21 induziert einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp in HEK293-Zellen. FACS-Analyse zur Bestimmung apoptotischer und nekrotischer Zellen in HEK293- bzw. HEK293^{LANA-1}-Zellen, die ORF21 exprimierten, mit dem Leervektor transfiziert, oder gar nicht behandelt wurden. Die Zellen wurden 24h nach Transfektion gleichzeitig mit Propidiumjodid (PI) und dem Carboxyfluorescein-markierten Caspaseinhibitor FAM-VAD-FMK inkubiert. PI dient dem Nachweis nekrotischer Zellen und FAM-VAD-FMK dem Nachweis aktivierter Caspasen (apoptotische Zellen). Als Positivkontrolle wurden Leervektor-transfizierte Zellen mit 5% DMSO für 4h (Nekrosekontrolle) bzw. 100nm Staurosporin für 10h (Apoptosekontrolle) behandelt. *Dotplot*-Darstellung mit Fluoreszenzkanal 1 (FL1-H) – grüne Fluoreszenz für Carboxyfluorescein und Fluoreszenz-kanal 3 (FL3-H) – rote Fluoreszenz für PI. Pro Ansatz wurden 20.000 Zellen analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt 8 unabhängig durchgeführten Versuchen.

3.2.8. ORF21 induziert in Anwesenheit von p53 einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp in SaOS-Zellen

Anhand der bisherigen Ergebnisse lag die Schlussfolgerung nahe, dass der ORF21-induzierte Apoptose-ähnliche Phänotyp p53-abhängig ist, da durch die Expression von ORF21 sowohl eine Depolarisierung mitochondrialer Membranen induziert als auch p53 aktiviert wird. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde die Wirkung von ORF21 in p53-defizienten (SaOS-2) im Vergleich zu p53-exprimierenden Osteosarkomzellen, SaOS(p53), untersucht.

3.2.8.1. Stabile Expression von p53 in SaOS-Zellen

Für eine stabile Expression von p53 wurden SaOS-2 mit einem Plasmid kodierend für p53 (pcDNA3-p53 mit Neomycin-Resistenzkassette) transfiziert. Nach der Selektion resistenter G418-Klone, wurde in den generierten Zelllinien die Expression von p53 gemessen. Die Züchtung von SaOS(p53)- Zelllinien gestaltete sich insofern schwierig, als bei einer starken Expression von p53 das Wachstum der Zellen inhibiert wurde. Verschiedene resistente Zellklone wurden vermehrt und auf die Expression von p53 untersucht.

Bei Zellklon 10 konnte eine schwache Expression von p53 im Westernblot nachgewiesen werden, während die meisten anderen Zelllinien (z.B. 5 und 6) keine nachweisbare p53-Expression zeigten (Abb.20A). Die Zelllinie 10 wurde dementsprechend für die weiteren Versuche eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden SaOS-2-Zellen transient mit dem Plasmid pcDNA3-p53 zur Expression von p53 transfiziert. Im Westernblot wurde nach Entfernen des gebundenen anti-p53-Antikörper die Membran mit einem monoklonalem anti-GAPDH-Antikörper inkubiert, um zu zeigen, dass vergleichbare Mengen an Protein aufgetragen wurden.

In Abb.20B ist die Expression von p53 in der Zelllinie 10 auf Einzelzellebene dargestellt. Dabei wurde p53 (grüne Fluoreszenz) sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen (Abb.20B). In den SaOS-2-Zellen wurde kein p53 nachgewiesen (Abb.20B).

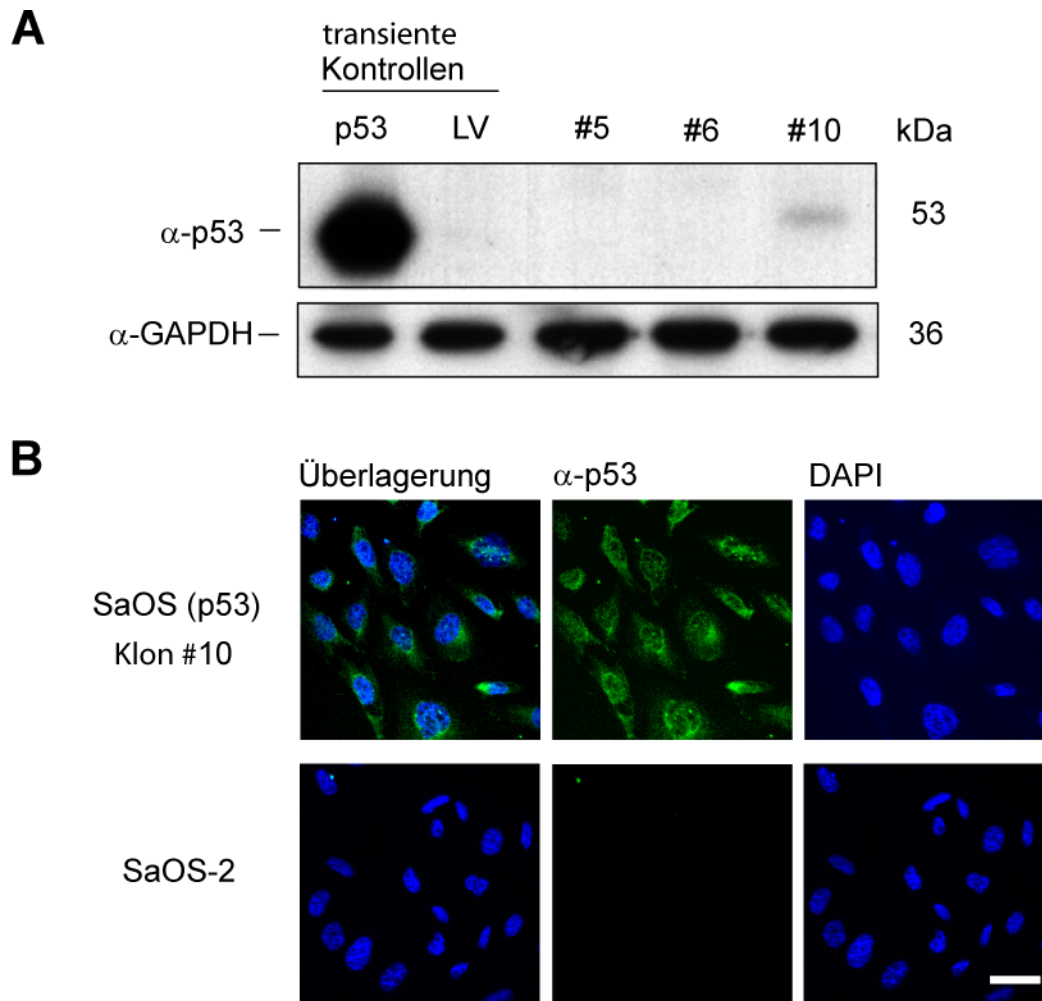


Abb.20: Stabile Expression von p53 in SaOS-Zellen. (A) Westernblot-Analyse zum Nachweis von p53 in transient transfizierten LV- und p53-SaOS-2-Zellen im Vergleich zu den stabilen SaOS(p53)-Zelllinien 5,6 und 10. P53 wurde mit einem monoklonalen p53-Antikörper (α -p53) nachgewiesen. Der Nachweis von GAPDH mit einem monoklonalem GAPDH-Antikörper (α -GAPDH) diente zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen. **(B)** Immunfluoreszenzfärbung von SaOS-2-Zellen (wt) sowie stabil p53 exprimierenden SaOS(p53)-Zellen (Zellklon 10) mit einem monoklonalen p53-Antikörper (α -p53, grüne Fluoreszenz). Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung (blau) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Olympus). Der Längenstandard (weißer Balken) entspricht 50 μ m.

3.2.8.2. p53-Aktivierung durch ORF21 in SaOS(p53)-Zellen über eine Phosphorylierung an Serin15

Um zu untersuchen, ob der ORF21-induzierte Apoptose-ähnliche Phänotyp von der Anwesenheit von p53 abhängt, wurde zunächst geprüft, ob ORF21 in p53-exprimierenden Osteosarkomzellen, SaOS(p53), p53 aktiviert. SaOS(p53)-Zellen wurden transient mit Plasmiden für die Expression von ORF21, der Thymidinkinase-defizienten Mutante 21 Δ KD, den verkürzten ORF21-Proteinen 21N und 21C sowie der Kontrolle, HHV-8-Protein K4.2, transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen immunzytochemisch mit einem polyklonalen Antikörper (α -p53 phosSer15), der spezifisch die p53-Phosphorylierung an Serin15 erkennt, inkubiert. Gleichzeitig wurde ein monoklonaler anti-Myc-Antikörper (α -Myc) zum Nachweis der Expression der Myc-Epitop fusionierten ORF21-Proteine sowie der Kontrolle, HHV-8-Gen K4.2, eingesetzt.

SaOS(p53)-Zellen, die ORF21 (21WT), C-terminal verkürztes ORF21 (21N) oder die Thymidinkinasedefiziente ORF21-Mutante (21 Δ KD) exprimierten, wiesen Serin15-phosphoryliertes p53 (Abb.21B,C,E) im Zellkern auf. Die Expression von N-terminal-verkürztem ORF21 (21C) oder der Kontrolle K4.2 führte nicht zu einer Aktivierung und Akkumulation von p53 im Zellkern (Abb.21D,F). Bei Expression von ORF21 in den p53-defizienten SaOS-2-Zellen wurde wie erwartet keine Aktivierung von p53 nachgewiesen (Abb.21A).

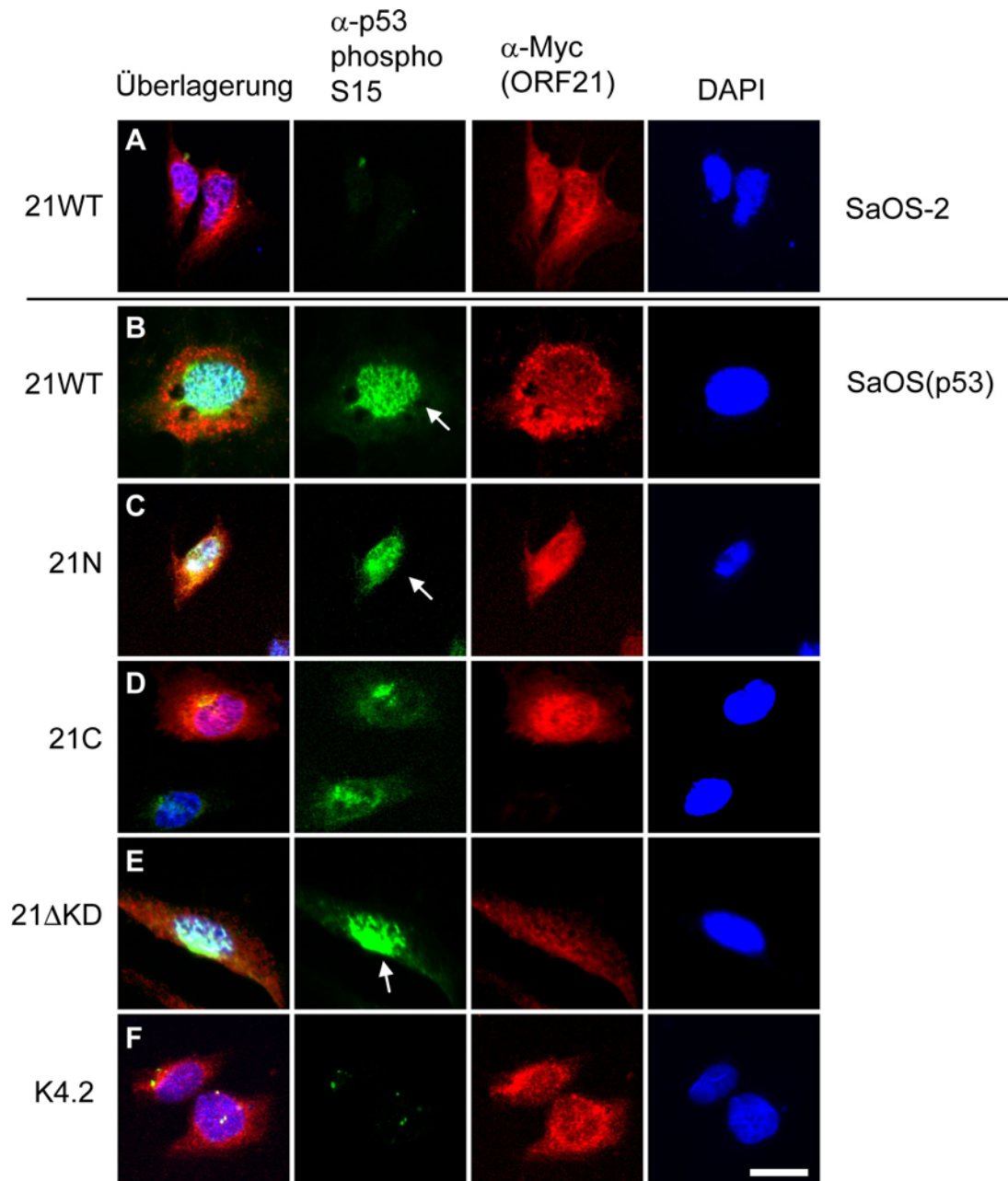


Abb.21: ORF21 aktiviert p53 in SaOS(p53)-Zellen über eine Phosphorylierung an Serin15. Immunzytochemische Färbung von transfizierten SaOS-2- und SaOS(p53)-Zellen mit einem polyklonalen p53-phosSer15-Antikörper (α -p53 phosSer15) in Kombination mit einem monoklonalen Myc-Antikörper (α -Myc, rote Fluoreszenz). SaOS(p53)-Zellen wurden mit Plasmiden zur Expression von ORF21-Proteinen bzw. K4.2 als Kontrolle und SaOS-2-Zellen wurden mit ORF21 transfiziert. Serin15-phosphoryliertes p53 (grüne Fluoreszenz) ist durch weiße Pfeile markiert (B,C,E). Anhand der Myc-Expression (rote Fluoreszenz) wurden die ORF21-Proteine sowie K4.2 nachgewiesen. Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung (blau) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Olympus). Der Längenstandard (weißer Balken) entspricht 50 μ m.

Um auch auf Einzelzellebene zu zeigen, dass in allen SaOS(p53)-Zellen p53 exprimiert wird, wurden die Zellen mit einem monoklonalen anti-p53-Antikörper inkubiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass p53 spezifisch in den SaOS(p53)-Zellen im Zellkern akkumuliert, die ORF21 (21WT), die ORF21-Mutante (21ΔKD) oder C-terminal verkürztes ORF21 (21N) exprimierten (Abb.22B,C,E), während in den 21C- oder K4.2-exprimierenden SaOS(p53) p53 im Zytosol nachweisbar war (Abb.22D,F). In SaOS-2-Zellen ist wie zu erwarten kein endogenes p53 nachweisbar (Abb.22A).

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Expression von ORF21 zu einer Phosphorylierung von p53 an Serin 15 in SaOS(p53)-Zellen führt. Durch diese Phosphorylierung wird p53 aktiviert und akkumuliert im Zellkern. Weiterhin wurde gezeigt, dass spezifisch der N-terminale Teil von ORF21 diese Aktivierung von p53 vermittelt. Da außerdem die SaOS(p53)-Zelllinie p53 stabil unter der Kontrolle des CMV-Promoters exprimiert, lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass ORF21 die Aktivität von p53 zumindest in diesen Zellen posttranslational induzieren kann und dies nicht über den endogenen p53-Promoter erfolgt.

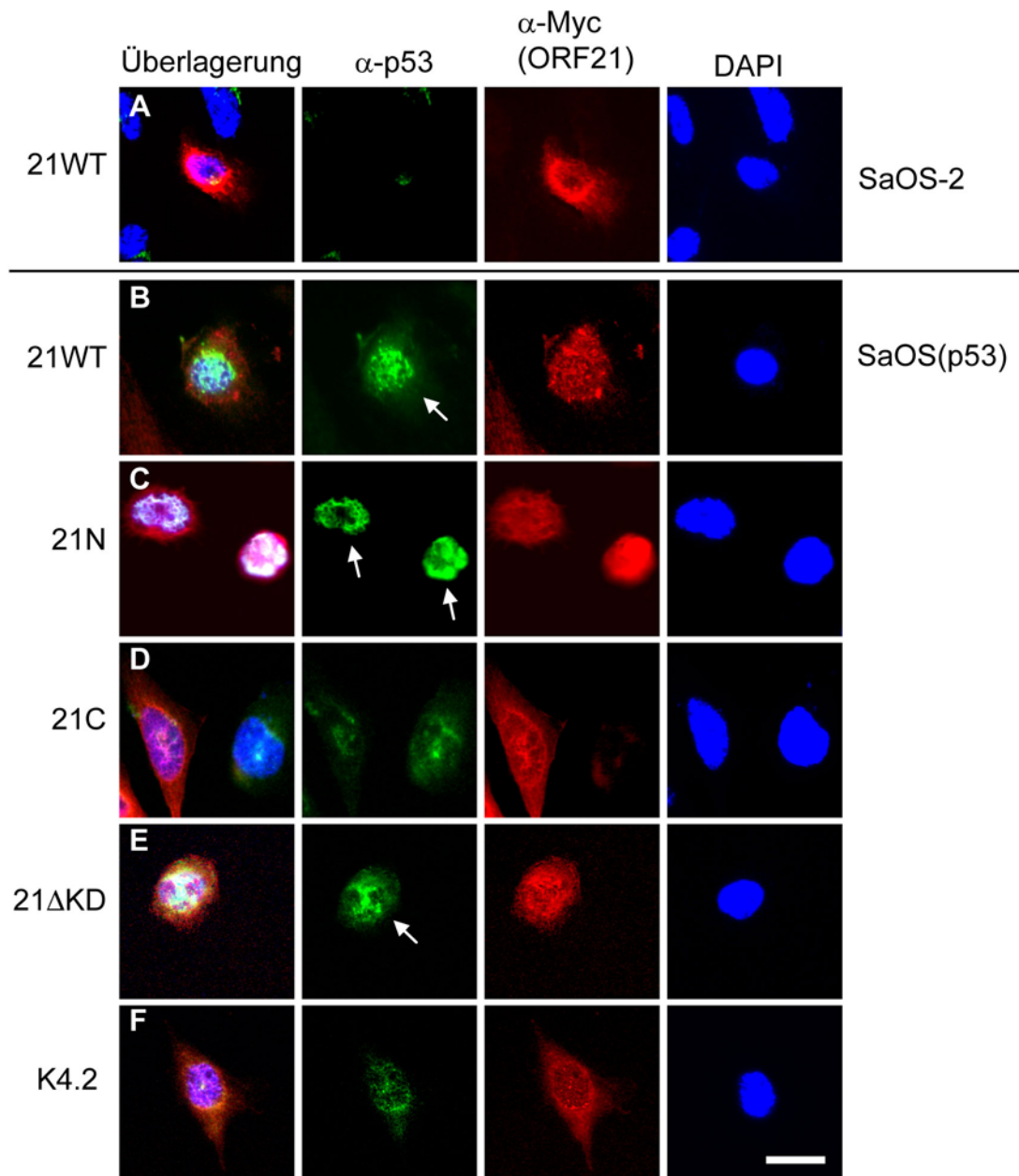


Abb.22: p53 akkumuliert im Zellkern in ORF21-exprimierenden SaOS(p53)-Zellen. Doppel-Immunfluoreszenzfärbung mit einem monoklonalen p53-Antikörper (α -p53) in Kombination mit einem polyklonalen Myc-Antikörper (α -Myc), gefolgt von Fluorochrom-gekoppelten Sekundäntikörpern. Expression und Lokalisation von p53 (grüne Fluoreszenz) 24 h nach Transfektion von SaOS(p53)-Zellen, die mit Plasmiden zur Expression von ORF21 (21WT), C-terminal verkürztem ORF21 (21N), N-terminal verkürztem ORF21 (21C), der Thymidinkinasedefizienten ORF21-Mutante (21 Δ KD) und dem HHV8-Protein K4.2 transfiziert worden waren. Myc-fusionierte ORF21-Proteine sowie K4.2 wurden mit dem Myc-Antikörper (rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung (blau) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Olympus). Der Längenstandard (weißer Balken) entspricht 50 μ m.

3.2.8.3. Induktion eines Apoptose-ähnlichen Phänotyps durch ORF21 in SaOS(p53)-Zellen

Der Expressionsnachweis rekombinanter ORF21-Proteine in SaOS-Zellen wurde mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper im Westernblot durchgeführt (Abb.23). Hierbei konnten sowohl der ORF21-Wildtyp (21WT) als auch die verkürzten ORF21-Proteine (21C; 21N) sowie die Thymidinkinase-defiziente ORF21-Mutante (21ΔKD) über das fusionierte Myc-Epitop nachgewiesen werden. Als Kontrollen wurden SaOS-Zellen eingesetzt, die mit dem Leervektor bzw. pcDNA4-*gfp* transfiziert worden. In allen Fällen entsprachen die Molekulargewichte der nachgewiesenen Proteinbanden den vorher berechneten Molekulargewichten dieser Proteine: das ORF21-Volllängen Protein (65 kDa), der N-terminale Teil von ORF21, 21N (23 kDa), der C-terminale Teil von ORF21, 21C (43 kDa), die Thymidinkinasedefiziente ORF21-Mutante, 21ΔKD (65 kDa) und die Kontrolle GFP (33 kDa).

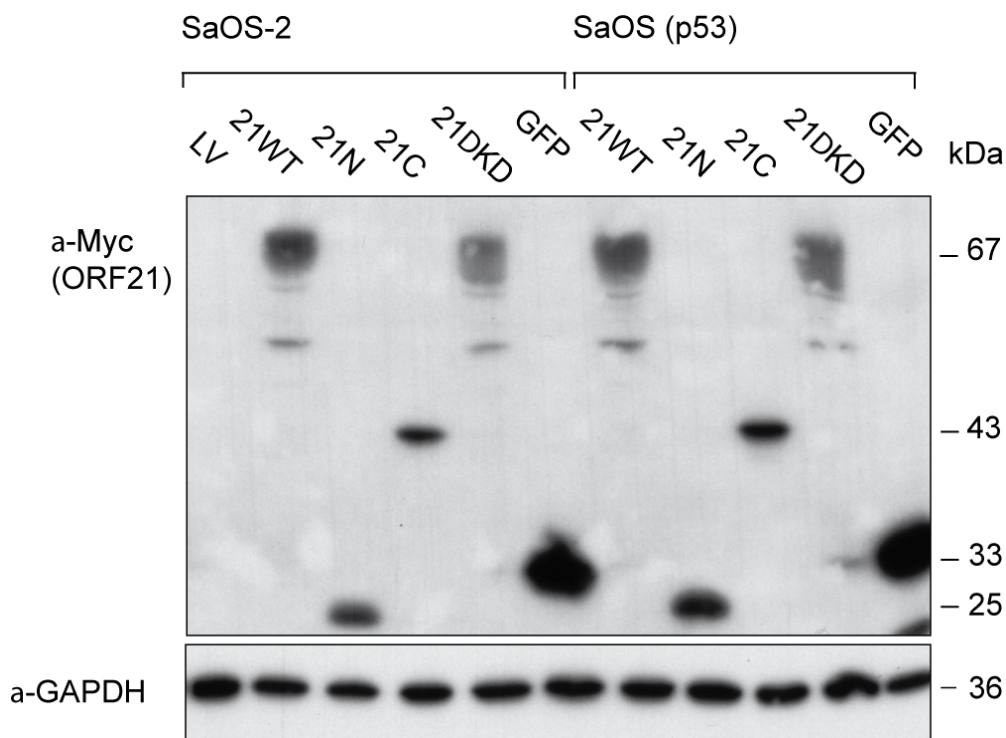


Abb.23: Expressionsnachweis rekombinanter ORF21-Proteine in SaOS-Zellen. Westernblot-Analyse der transfizierten SaOS-Zellen ohne, bzw. mit exprimierendem p53 (Zellklon 10), die mit dem Leervektor (LV), 21WT, 21N, 21C, 21ΔKD oder GFP-Expressionsvektor transfiziert worden waren. Da alle hier dargestellten Proteine C-terminal mit Myc-Epitop fusioniert sind, erfolgte der Expressionsnachweis mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper (α -Myc). Nach dem Entfernen der gebundenen Antikörper wurde die Membran zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmenge mit einem monoklonalen GAPDH-Antikörper (α -GAPDH) inkubiert.

Um den durch ORF21 induzierten Apoptose-ähnlichen Phänotyp vor einem p53-defizienten Hintergrund zu untersuchen, wurden SaOS-2-Zellen (LV), oder SaOS(p53)-Zellen (Klon 10) mit pcDNA4-*orf21*, -*orf21ΔC*, -*orf21ΔN* oder -*orf21ΔKD* transfiziert bzw. mit dem Leervektor, pcDNA3-*p53* (p53), oder pcDNA4-*k4.2* als Kontrollen transient transfiziert. 15 h nach Transfektion wurde mittels des JC-1-Farbstoffs das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) in den Populationen beider Zelllinien bestimmt (Abb.24).

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von ORF21 (21WT), dem N-terminalen Teil von ORF21 (21N) oder der Thymidinkinasedefizienten ORF21-Mutante (21ΔKD) und auch die Expression des C-terminalen Teils (21C) in SaOS-2 - Zellen (LV) zu einem Anteil von depolarisierten $\Delta\Psi$ von ca. 30 % führt. Als Positivkontrolle für ein depolarisiertes Membranpotential wurden Leervektor-transfizierte Zellen für 15 h mit 100 nM Staurosporin, gelöst in DMSO, behandelt, oder mit pcDNA3-p53 (p53) transfiziert. Die entsprechende DMSO-Kontrolle ist abgebildet (Abb.24). Zur Bestimmung des natürlichen mitochondrialen Potenzials wurden beide Zelllinien mit einem Expressionsvektor für das HHV-8-Protein K4.2 transfiziert.

Wird diese Untersuchung mit p53 stabil exprimierenden Zellen durchgeführt, so steigt die depolarisierende Wirkung von ORF21 auf die Mitochondrien allerdings bei allen eingesetzten ORF21-Expressionskonstrukten: Bei Expression von ORF21WT (21WT) 58 %, des N-terminalen Teil von ORF21 (21N) 56 %, des C-terminalen Teils von ORF21 (21C) 42 % oder der Thymidinkinasedefizienten ORF21-Mutante (21ΔKD) 55 %.

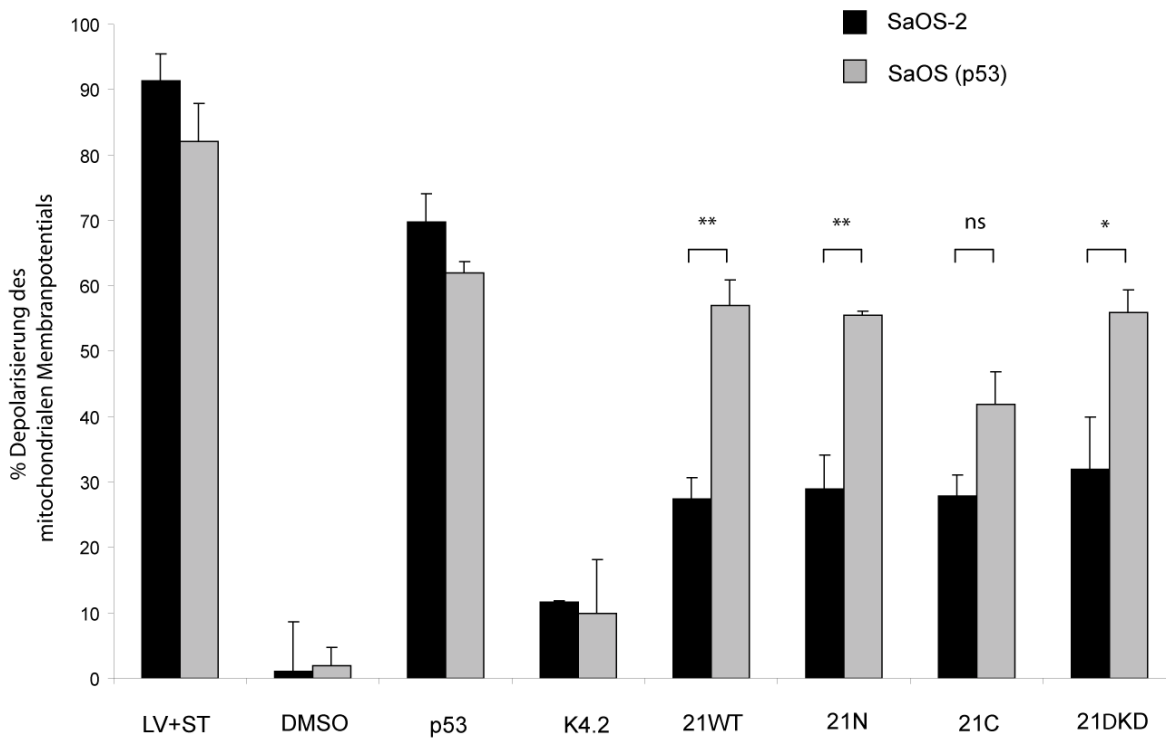


Abb.24: Induktion eines Apoptose-ähnlichen Phänotyps durch ORF21 in SaOS(p53)-Zellen.

Bestimmung mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) mittels JC-1-Färbung in SaOS-2- bzw. SaOS(p53)-Zellen. Als Positivkontrollen für eine Depolarisierung der Mitochondrien wurden Leervektor-transfizierte SaOS-Zellen für 15 h mit 100 nM Staurosporin (gelöst in DMSO) behandelt (LV+ST), bzw. mit p53-Expressionsvektor (p53) transfiziert. Desweiteren wurden folgende Konstrukte transfiziert: K4.2 (K4.2), ORF21 (21WT), der N-terminalen Teil von ORF21 (21N), der C-terminalen Teil von ORF21 (21C), oder die Thymidinkinasedefiziente Mutante von ORF21 (21 Δ KD). 15 h nach Transfektion wurden die Zellen mit JC-1 gefärbt. Intakte Mitochondrien wurden bei einer Anregung mit 590 nm in einem Fluoreszenzmessgerät analysiert und der Anteil der Zellen mit depolarisierten Mitochondrien dargestellt. In drei unabhängigen Versuchen wurde jeder Ansatz in dreifacher Ausfertigung durchgeführt, davon Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und der Anteil toter Zellen im Vergleich zur Kontrolle (LV+ST = 100 %) angegeben. Angaben zur statistischen Signifikanz nach Student T-Test: (**) $p < 0,0001$, (*) $p < 0,002$, ns (nicht signifikant) $p > 0,05$.

In diesem Experiment wurde gezeigt, dass SaOS-Zellen mit stabiler p53-Expression generell sensitiver als SaOS-Zellen ohne p53 auf ORF21 reagierten, was sich durch eine doppelt so hohe Rate an depolarisierten Mitochondrien in den transfizierten Zellen ausdrückt. Dies lässt sich bei allen Zellpopulationen die ORF21, die verkürzten ORF21-Proteine oder die Thymidinkinase-defiziente ORF21-Mutante exprimierten, nachweisen. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass der durch

ORF21-induzierte Apoptose-ähnliche Phänotyp durch d Anwesenheit ie von p53 verstärkt wird.

4. Diskussion

Das humane Herpesvirus-8 ist mit angioproliferativen Erkrankungen wie dem Kaposi Sarkom assoziiert und eine Infektion mit diesem Virus ist Voraussetzung für die KS-Entstehung. HHV-8 kodiert für zahlreiche virale Proteine mit tumorigenen Eigenschaften, die wesentlich zu der Entwicklung dieses multifokalen Tumors beitragen. Trotz zahlreicher viraler Proteine mit anti-apoptotischen Eigenschaften ist zu Beginn dieser Erkrankung eine hohe Apoptoserate in KS-Läsionen nachweisbar, die sich in späteren Krankheitsstadien abschwächt (Stürzl et al., 1999).

Sowohl in der Latenz- als auch in der lytischen Phase der HHV-8-Infektion werden Gene exprimiert, welche den zellulären Tumorsuppressor p53 inhibieren und somit eine Apoptose unterdrücken können (Dourmishev et al., 2003). Während der KS-Entwicklung scheint p53 aber eine funktionale Rolle einzunehmen, da im Verlauf der Krankheit eine gesteigerte p53 Expression histologisch nachweisbar ist (Hodak et al., 1999; Noel et al., 1997). Anders als bei der Mehrzahl humaner maligner Tumore liegen bei HHV-8-assoziierten Erkrankungen selten p53-Mutationen vor, die einen Funktionsverlust des Tumorsuppressors induzieren und somit einen Beitrag zur KS-Entwicklung leisten (Katano et al., 2001; Li et al., 1997).

4.1. Etablierung eines KS-ähnlichen Tiermodells

Zur *in vivo* Untersuchung des möglichen Zusammenspiels von endogenem Tumorsuppressor p53 und HHV-8-kodierenden Faktoren sollte versucht werden, eine transgene Mauslinie zu etablieren, in der die Funktion eines einzelnen viralen Gens im Kontext mit dem Gesamtorganismus untersucht werden kann.

Hierzu sollte LANA-1 endothelspezifisch in der Maus exprimiert werden. LANA-1 besitzt u.a. antiapoptotische, transformierende und differenzierende Eigenschaften (Bubman et al., 2007; Friborg et al., 1999; Radkov et al., 2000; Wang et al., 2004). Da es zudem konstitutiv im Lebenszyklus von HHV-8 exprimiert wird, ist es ein hervorragender Kandidat, um die Mechanismen der Pathogenese von HHV-8 zu untersuchen. Aufgrund der bisher bekannten tumorigenen Eigenschaften von LANA-1 (Friborg et al., 1999; Radkov et al., 2000) sollte ein induzierbares Konstrukt hergestellt werden, um später mögliche Störungen der Embryogenese der transgenen Tiere zu vermeiden.

Zu diesem Zweck wurde ein LANA-1-Konstrukt kloniert, das unter dem Einfluss eines TRE-Promoter, des induzierbaren Tet-Systems (Tet-off), steht. In Zellkulturen konnte

die Induktion von LANA-1 durch den zugehörigen Transaktivator tTA-A2 erfolgreich nachgewiesen werden. In HEK293-Zellen, welche mit dem induzierbaren TRE_LANA-1-Konstrukt und tTA-A2 kotransfiziert wurden, reichten bereits geringe Mengen an Doxycyclin, um die Expression von LANA-1 zu reprimieren. Diese Ergebnisse stimmen mit den bereits beschriebenen Bedingungen zur Induktion dieses binären Expressionssystems überein (Urlinger et al., 2000).

Zur Etablierung dieser induzierbaren LANA-1-Expressionskassette in der Maus wurde ein sogenannter *knock-in* Ansatz gewählt, bei dem das DNA-Konstrukt mittels homologer Rekombination in ES-Zellen eingebracht wird, und diese rekombinanten ES-Zellen anschließend in Mäuseembryonen implantiert werden. Als genomischer Zielort wurde der *rosa26*-Lokus gewählt. Im Southernblot wurden insgesamt vier rekombinante ES-Zellklone identifiziert, die das Transgen TRE_LANA-1 trugen.

Aus zwei unabhängig rekombinanten TBV-2 ES-Zellklonen entstanden insgesamt 6 chimäre Männchen mit dem Agouti-Phänotyp (C57BL/6J;Ola129/Sv). Bei der Rückkreuzung der chimären Männchen mit C57BL/6J-Weibchen zur Überprüfung der Keimbahntransmission des Transgens, zeigten 47 Nachkommen von vier fertilen Chimären den Agouti-Phänotyp. Dieser Phänotyp wird zwar durch die verwendeten ES-Zellen (Ola129/Sv) bedingt, aber es konnte bei keinem der 47 Nachkommen der homolog rekombinierte *rosa26*-Lokus mit dem Transgen TRE_LANA-1 im Southernblot identifiziert werden. Daraus kann gefolgert werden, dass ausschließlich das Wildtyp-Allel des *rosa26*-Lokus in der Keimbahn weitervererbt wurde. Das rekombinante Allel mit dem Transgenkonstrukt TRE_LANA-1 wurde hingegen nicht an die Nachkommen vererbt. Somit gelang es nicht, eine stabil transgene Mauslinie für das induzierbare TRE_LANA-1 Konstrukt zu etablieren.

Das Scheitern der Keimbahntransmission des Transgens kann damit erklärt werden, dass das Transgen trotz der Wahl eines induzierbaren Promoters in der Keimbahn exprimiert wurde, und es somit zum Verlust der haploiden Keimzelle gekommen ist. Ein Verlust des Transgens während der Expansion der rekombinierten ES-Zellen wegen fehlenden Selektionsdrucks kann ausgeschlossen werden, da die rekombinanten ES-Zellen bis kurz vor der Blastozysten-Injektion mit G418 behandelt wurden. Zudem zeigte sich ja auch bei der männlichen Chimäre IVE9-6 bei der Genotypisierung ein positives Rekombinationssignal mit der 5'-spezifischen *rosa26* DNA-Sonde (siehe Abb.6). Eine weitere Erklärung für den Verlust des Transgens in der Keimbahn könnten die hoch repetitiven Sequenzmotive in der cDNA von LANA-

1 selbst sein (Zhang et al., 2000). Hier könnte es unerwünschter Weise zu einem intragenen Rekombinationsereignis gekommen sein, was zur Deletion des Transgen bzw. von Bereichen des rekombinanten *rosa*-Lokus führte.

Mittlerweile gelang es der Arbeitsgruppe Dittmer eine transgene LANA-1-Maus zu etablieren (Fakhari et al., 2006). Transgene Mäuse, die LANA-1 unter der Kontrolle seines eigenen Promoters exprimieren, wurden bei diesem Ansatz mittels Pronukleus-Injektion erzeugt. Die lebensfähigen Tiere entwickelten eine Hyperplasie durch expandierende B-Zellen und in der Folge Lymphome (Fakhari et al., 2006). Zukünftige Untersuchungen zur Interaktion von LANA-1 mit dem Tumorsuppressor p53 werden von Fakhari und Mitarbeitern angeregt. Der Versuch in der vorliegenden Arbeit, ein KS-ähnliches Tiermodell mit HHV-8-LANA-1 in der Maus zu etablieren, wurde daraufhin eingestellt.

4.2. HHV-8-ORF21 aktiviert den Tumorsuppressor p53

Eine Aktivierung von p53 und eine Translokation in den Zellkern ist *in vivo* immunhistochemisch an Biopsien später KS-Stadien nachweisbar (Hodak et al., 1999; Noel et al., 1997). Bislang gab es noch keine vertiefenden Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von p53 in der KS-Pathogenese, aber verschiedene Arbeiten legen nahe, dass HHV-8-kodierte Faktoren an der Induktion und Deaktivierung von p53 beteiligt sein könnten. So wurde erst kürzlich für das HHV-8-kodierte K8 β ein p53-akkumulierender Effekt in BCBL-1-Zellen nachgewiesen (Yamanegi et al., 2005). Bei K8 β handelt es sich um eine alternative *Splice*-Variante der K8-mRNA, die früh in der lytischen Replikationsphase von HHV-8 exprimiert wird (Yamanegi et al., 2005). Die Konsequenzen aus dieser Stabilisierung und möglichen Aktivierung von p53 für die betroffenen Zellen wurden aber nicht weiter untersucht.

Auf der Suche nach HHV-8-kodierten Faktoren, welche p53 aktivieren oder stabilisieren, wurde in unserem Labor mittels einer Hochdurchsatzanalyse gezeigt, dass eine transiente ORF21-Expression in HEK293T-Zellen endogenes p53 aktiviert und gleichzeitig zytopathische Effekte hervorruft (Leubert, 2007). ORF21 kodiert für eine Thymidinkinase und wird in der lytischen Replikationsphase von HHV-8 exprimiert (Russo et al., 1996). Bisherige Studien mit ORF21 wurden nur zur Funktion der Kinase-Aktivität und deren möglichen Substrate durchgeführt (Gustafson et al., 2000; Lock et al., 2002). Dabei wurde allerdings entweder ein schlechtes Wachstum der ORF21-transfizierten Zellen beobachtet oder es gelang

nicht, stabil ORF21-exprimierende Zelllinien zu generieren (Cannon et al., 1999; Gustafson et al., 2000). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der ORF21-Expression und der Induktion von Apoptose durch p53-Aktivierung sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels eines Reporter-gen-Testsystems gezeigt, dass eine transiente Expression von ORF21 in HEK293-Zellen eine starke Transkriptionsaktivität von p53 auslöst und mit einem Verlust der Adhäsion der transfizierten Zellen einhergeht. Der zelluläre Tumorsuppressor p53 unterliegt einer ubiquitin-abhängigen Degradation, welche durch MDM-2 vermittelt wird. Erfolgt ein Stress-Stimulus so kommt es zu einer Stabilisierung von p53 durch Phosphorylierungen. Dabei wird die Bindung an MDM-2 gelöst und p53 kann in den Zellkern translozieren. In seiner aktiven Form als Tetramer kann p53 als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Zielgene aktivieren, welche mit der Induktion von Apoptose assoziiert sind (Bode & Dong, 2004).

Da bekannt ist, dass einer Transkriptionsaktivität des Tumorsuppressors p53 eine Stabilisierung, vornehmlich über diverse Phosphorylierungen an Threonin- bzw. Serin-Resten, vorausgeht, wurde der Phosphorylierungsstatus von p53 an Ser15 analysiert. Die Phosphorylierung von p53 an Ser15 führt zu einer reduzierten Interaktion mit MDM2, wodurch die Akkumulierung und Aktivierung von p53 gefördert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine transiente Expression von ORF21 sowohl in Zelllinien (HEK293 und SaOS(p53)-Zellen), als auch in primären Zellen (HUVEC), eine Phosphorylierung an Ser15 auslöst. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen, die bereits in HEK293T-Zellkulturen gemacht wurden (Leubert, 2007) und unterstreichen somit dieses Funktionsmerkmal von ORF21, eine Phosphorylierung von p53 an Ser15 auszulösen.

Die Akkumulierung von phosphoryliertem p53 im Zellkern konnte sowohl in der Zelllinie SaOS(p53) als auch in primären Zellen (HUVEC) demonstriert werden. Allerdings konnte in HEK293-Zellen, im Gegensatz zu HUVEC, keine quantitative Erhöhung der intrazellulären p53-Proteinkonzentration nachgewiesen werden. Dieser Unterschied könnte zelltypspezifisch sein und darauf beruhen, dass der p53-Signalweg in den primären Zellen noch in seiner nativen Form funktionell ist und nicht durch p53-interagierende Proteine, wie z.B. dem viralen E1B-Protein der transformierten HEK293-Zellen, beeinflusst ist. Neben E1B ist auch für das *Large T-*

Antigen des SV40-Virus in transformierten HEK293T-Zellen bekannt, das p53-Funktion inhibiert wird und sich u.a. in einer Stabilisierung von p53 widerspiegelt. Neben den beiden beschriebenen Faktoren der lytischen Replikationsphase von HHV-8, ORF21 und K8 β , gibt es auch einen Faktor der latenten Infektionsphase der den p53-Signalweg beeinflussen kann. Die Wirkung von HHV-8-*orf72*, das für vCycD kodiert und in der Latenzphase exprimiert wird, auf den p53-Signalweg ist detaillierter beschrieben (Chang et al., 1996). Die Interaktion von vCycD mit zellulärem Cdk6 forciert den Übergang der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus und aktiviert sukzessive den Tumorsuppressor p53. Resultierend aus dieser irreversiblen Aktivierung ist ein Zellzyklus-Arrest und p53-abhängige Apoptose. Wurde allerdings vCycD transient in p53-defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEF) transfiziert, konnte im Vergleich zu *wt* MEFs eine reduzierte Apoptoserate gemessen werden (Chang et al., 1996). Interessanterweise zeigte die Transfektion von vCycD in *alternative reading frame*-defizienten (ARF^{-/-}) oder in E2F1^{-/-} MEFs eine vergleichbar hohe Apoptoserate wie in *wt* MEFs, woraus gefolgert werden kann, dass vCycD-induzierte Apoptose auf eine p53-abhängige Weise abläuft und nicht durch alternative Signalwege gesteuert wird (Chang et al., 1996). Zusätzlich konnte nach vCycD-Expression in MEFs eine fehlerhafte Zytokinese beobachtet werden, welche in einem polyploiden Phänotyp resultierte und somit eine wesentliche tumorigene Eigenschaft von HHV-8 darstellen kann (Chang et al., 1996).

In einer neueren Arbeit wurde gezeigt, dass vCycD über die Interaktion mit zellulärem Cdk9 die Phosphorylierung von p53 an Serin33 induziert und nachfolgend ein Zellzyklusarrest in den transfizierten Zellen eingeleitet wird (Chang & Li, 2007). Weiterhin konnten Chang und Mitarbeiter nachweisen, dass der vCycD-induzierte Zellzyklusarrest p53-abhängig ist. Die Transfektion von vCycD in eine p53-defiziente Zelllinie (SaOS-2) zeigte keinen Effekt auf den Zellzyklus (Chang & Li, 2007).

4.2.1. HHV-8-ORF21 induziert einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp

Im Verlauf des programmierten Zelltods wird, ausgehend vom stimulierenden Auslöser, eine Signalkaskade von aktivierten Caspasen ausgelöst, an deren Ende sogenannte Effektor-Caspasen zelluläre Strukturen zerschneiden (Earnshaw et al., 1999). Ein weiteres charakteristisches Merkmal bei allen Formen des Zelltodes ist der Zusammenbruch mitochondrialer Membranen und daraus resultierend eine irreversible Depolarisierung mitochondrialer Membranen (Ly et al., 2003).

Weiterführende Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass die transiente ORF21-Expression in HEK293-Zellen einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp induziert. Zusätzlich zu der Caspasen-Aktivität in HEK293-Zellen konnte eine Depolarisierung mitochondrialer Membranen mit Hilfe des spezifischen Farbstoffs JC-1 sowohl in Zelllinien (HEK293 und SaOS(p53)-Zellen) als auch in Primärzellen (HUVEC) nach transienter ORF21-Expression in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Es bleibt aber zunächst festzuhalten, dass mit den durchgeführten JC-1 Färbungen in dieser Arbeit nur das transiente mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) erfasst wurde. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Depolarisierung reversibler Natur ist und vorübergehend zu der bereits beschriebenen Wachstumshemmung durch ORF21-Transfektion führt. Allerdings liefert der Befund der Phosphorylierung von p53 an Ser15 in allen verwendeten Zellsystemen dieser Arbeit Hinweise auf eine Aktivierung von Apoptose. Ebenso müsste noch genauer spezifiziert werden, welche Caspasen durch ORF21 induziert worden sind, da in der hier durchgeführten Caspase-Messung potentiell alle aktivierten Caspasen erfasst werden. Dieser experimentelle Nachweis könnte Aufschluss über die Art des Apoptose-Signalwegs geben.

Eine Induktion von Apoptose in der Wirtszelle durch ein Virus scheint zunächst nicht sinnvoll, da dadurch das Überleben des Virus gefährdet ist. Aber dennoch ist die KS-Pathogenese wenigstens partiell mit Apoptose assoziiert, da besonders in frühen KS-Stadien eine hohe Apoptoserate in KS-Läsionen nachgewiesen wurde (Stürzl et al., 1999). Interessanterweise wurde demonstriert, dass die Induktion des lytischen Replikationszyklus von HHV-8 in PEL-Zellen Apoptose auslöst, trotz der bekanntermaßen zeitgleichen Expression viraler anti-apoptotischer Gene (Klass et al., 2005). Hierbei wurde der lytische Replikationszyklus von HHV-8 mit den Induktoren Valproat oder Butyrat induziert und gleichzeitig die Produktion viraler Partikel chemisch unterbunden. Es wurde gefolgert, dass für den Zelltod virale Transkripte und/oder Proteine verantwortlich sind, die während des lytischen Replikationszyklus exprimiert werden. Da sich der Zelltod nicht durch eine chemische Blockade der Virusproduktion beeinflussen ließ, schlussfolgerten Klass und Mitarbeiter, dass eine oder mehrere zelluläre Komponenten den Zelltod ausführen, den virale Produkte der lytischen Replikationsphase ausgelöst haben (Klass et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise, dass ORF21 möglicherweise ein beteiligter Faktor dieses Prozesses sein könnte.

4.2.2. Der N-Terminus von ORF21 induziert einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde mittels einer Struktur-Funktionsanalyse überprüft, inwieweit die Kinase-Domäne von ORF21 bei der Induktion eines Apoptose-ähnlichen Phänotyps durch eine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi$) eine Rolle spielt. Dabei zeigte sich, dass der bislang wenig untersuchte 200 Aminosäuren lange N-terminale Teil von ORF21 eine Depolarisierung induziert. In transienten Expressionsexperimenten zeigte sich in den transfizierten Zellen eine vergleichbar hohe Depolarisierungsrate der Mitochondrien im Vergleich zwischen dem ORF21 Vollängen-Konstrukt sowie einem Konstrukt, das nur den N-terminalen Teil von ORF21 exprimiert bzw. einem Konstrukt, bei dem die Kinase-Domäne durch einen Aminosäureaustausch ausgeschaltet wurde. Die Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotenzials durch den N-terminalen Teil konnte sowohl in den Zelllinien HEK293 und SaOS(p53) als auch in Primärzellen (HUVEC) bestätigt werden. Wurde hingegen die Kinase-Domäne von ORF21 alleine in HEK293- oder HUVEC-Zellen exprimiert, beeinträchtigte dies nicht $\Delta\Psi$. Einzig SaOS-2-Zellen reagierten auf eine Expression der Kinase-Domäne und zeigten in diesem Experiment eine ähnliche Steigerung der Depolarisierung von $\Delta\Psi$ der Mitochondrien wie nach Transfektion der restlichen ORF21-Expressionskonstrukte. In dieser speziellen Zelllinie kann also eine Beeinträchtigung der Zellvitalität durch die Kinase-Funktion von ORF21 nicht ausgeschlossen werden.

Der Sequenzvergleich bekannter herpesviraler Thymidinkinasen zeigt besonders im N-terminalen Teil von HHV-8-ORF21 hohe Divergenzen (Cannon et al., 1999). Zudem konnte in einem weiteren Sequenzabgleich keinerlei Ähnlichkeit zu bisher bekannten Proteinen festgestellt werden (Gill et al., 2005). In dieser kürzlich veröffentlichten Studie zeigten die Autoren, dass der N-terminale Teil von HHV-8-ORF21 in HEK293T-Zellen ebenso die Zelladhäsion löst, wie es auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Hierbei wurde zudem mit verschiedenen GFP-ORF21 Fusionskonstrukten gezeigt, dass ORF21 nicht mit Mikrofilamenten, Mikrotubuli oder dem intermediären Filament-Netzwerk der Zelle kolokalisiert (Gill et al., 2005). Somit wird eine direkte Beeinflussung der genannten zellulären Strukturkomponenten durch ORF21 ausgeschlossen. Auch wurde durch Gabe von Inhibitoren der Thymidinkinase-Funktion demonstriert, dass der Verlust der Adhäsion

ausschließlich durch den N-terminalen Teil von ORF21 induziert wird (Gill et al., 2005). Allerdings wurde ebenso wie in der Veröffentlichung von Gustafson und Mitarbeitern kein apoptotischer Phänotyp der transient transfizierten HEK293T-Zellen nachgewiesen (Gustafson et al., 2000).

Bei der Untersuchung Virion-assoziiertes HHV-8-Proteine und deren möglicher Funktion bei einer *de novo*-Infektion konnte durch Immunpräzipitation gezeigt werden, dass ORF21 mit Capsid-Proteinen von HHV-8 assoziiert ist und somit möglicherweise zusätzliche Funktionen ausüben kann, die über die bislang beschriebene einer Thymidinkinase hinausgehen (Zhu et al., 2005). Auch hier wurde über eine mögliche weitere Funktion des N-terminalen Teils von ORF21 spekuliert, der weder eine Homologie zu bislang bekannten N-Termini von TKs, noch Ähnlichkeiten zu anderen bekannten Proteinen aufweist (Zhu et al., 2005).

4.2.3. ORF21 induziert in Anwesenheit von p53 einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp

Um zu überprüfen, inwieweit der ORF21-induzierte Apoptose-ähnliche Phänotyp von der Anwesenheit von p53 beeinflusst ist, wurden in dieser Arbeit zwei experimentelle Ansätze verfolgt. Zum einen sollte ORF21 gleichzeitig mit einem HHV-8-Gen exprimiert werden, von dem bekannt ist, dass es zu einer funktionellen Hemmung von p53 führt. Für diesen Ansatz wurde LANA-1 gewählt, das konstitutiv in der KS-Pathogenese exprimiert wird und dessen p53-inhibitorische Funktion dokumentiert ist (Friborg et al., 1999). Zum anderen sollte ORF21 vor einem p53-defizienten Hintergrund exprimiert werden. Hierzu wurden Osteosarkomzellen (SaOS-2) verwendet, sowohl ohne als auch mit stabil exprimiertem p53.

Bei der Analyse der Eigenschaft von p53 als Transkriptionsfaktor nach Transfektion von ORF21 zeigte sich in HEK293-Zellen ein starkes Signal eines p53-GFP-Reporterkonstrukts. Im Vergleich dazu war das Signal des Reporterplasmids in stabil LANA-1-exprimierenden Zellen (HEK293^{LANA-1}) deutlich reduziert. Dies belegt, dass die ORF21-bedingte Aktivierung von p53 durch LANA-1 teilweise inhibiert wird. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen von LANA-2, dass ebenfalls die ORF21-induzierte Aktivierung des p53-Reporterkonstruktes unterdrücken konnte (Leubert, 2007). Allerdings zeigte sich in den ORF21-transfizierten HEK293^{LANA-1}-Zellen ein positives Signal für p53-Aktivität, das auch mit einem Ablösen der Zellen korrelierte. Dies könnte aber darauf zurückzuführen sein, dass in manchen Zellen

trotz der Anwesenheit von LANA-1 der Effekt von ORF21 durch Überexpression überwiegt.

Auch bei der Analyse der ORF21-induzierten Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi$) in HEK293-Zellen zeigte sich ein schützender Effekt von LANA-1. Hier war nach Transfektion von ORF21 in HEK293^{LANA-1}-Zellen ein geringerer Anteil von Zellen mit einer Depolarisierung von $\Delta\Psi$ nachweisbar als bei HEK293-Zellen.

Unter Berücksichtigung der veröffentlichten Daten, die bislang zur anti-apoptotischen Wirkung von LANA-1 vorliegen, deuten die Ergebnisse dieses Abschnitts darauf hin, dass ORF21 ein p53-abhängiges Apoptose-Signal induzieren könnte (Abb.24). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ORF21 in p53-defiziente Zellen transfiziert (SaOS-2) und die Depolarisierung von $\Delta\Psi$ der Mitochondrien mit Zellen verglichen, welche p53 stabil exprimierten (SaOS(p53)). Hier zeigte sich nicht nur, dass ORF21 in SaOS(p53) im Vergleich zu SaOS-2-Zellen eine höhere Depolarisierungsrate induziert, sondern auch, dass an diesem Prozess maßgeblich der N-terminale Teil von ORF21 beteiligt ist. Allerdings erzielten in diesem Experiment alle ORF21-Konstrukte in Anwesenheit von p53 eine vergleichbar hohe Rate von depolarisiertem $\Delta\Psi$ der Mitochondrien in transfizierten Zellen. Daher kann mit diesem Zellsystem nicht eindeutig gezeigt werden, dass der ORF21-induzierte Effekt von p53 abhängig ist.

In den bisherigen Arbeiten zur ORF21-Funktion konnte kein apoptotischer Phänotyp in transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Cannon et al., 1999; Gill et al., 2005; Gustafson et al., 2000). Allerdings konnte bislang auch keine stabil ORF21-exprimierende Zelllinie etabliert werden, obwohl verschiedene Promotoren zur Expression von ORF21 ausgewählt worden waren (Cannon et al., 1999). In diesen Veröffentlichungen wurden aber, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, HEK293T-Zellen für die transienten Expressionsexperimente verwendet (Cannon et al., 1999). Diese Zellen tragen, im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten HEK293-Zellen, zusätzlich das *Large T-Antigen* des SV40-Virus, das bekanntermaßen mit p53 interagiert und dessen Funktion inhibieren kann (Lane & Crawford, 1979; Lilyestrom et al., 2006). Somit können HEK293T-Zellen ähnlich wie HEK293^{LANA-1}-Zellen die ORF21-induzierte Apoptose inhibieren, ohne aber das Ablösen der Zellen zu verhindern. Damit unterstützen auch die Daten dieser Veröffentlichungen die vorliegenden Ergebnisse, die implizieren, dass prinzipiell die

Anwesenheit von funktionellem p53 eine Voraussetzung für einen ORF21-induzierten Apoptose-ähnlichen Phänotyp ist.

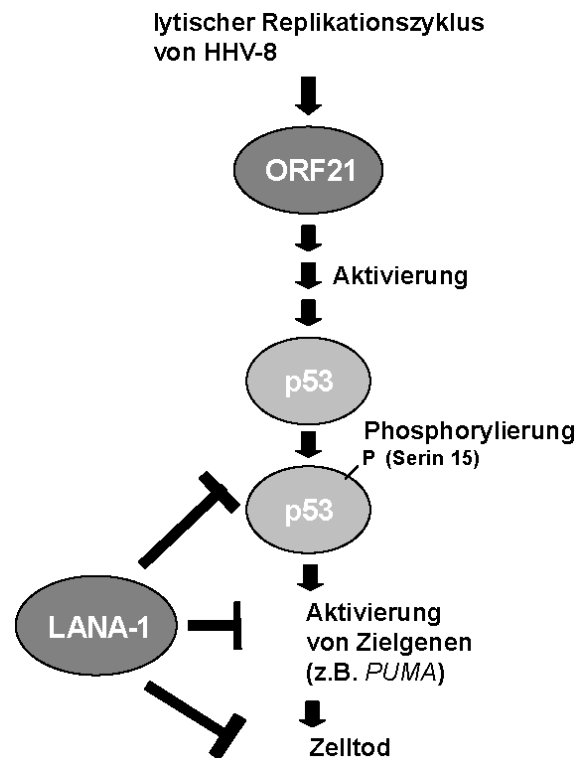


Abb. 24: Schematische Zusammenfassung der ORF21-induzierten Wirkung in Zellkulturen.

HHV-8-ORF21 aktiviert über einen noch unbekanntem Mechanismus den Tumorsuppressor p53 durch eine Phosphorylierung an Ser15 und induziert in Anwesenheit von p53 einen Apoptose-ähnlichen Phänotyp. LANA-1 kann ORF21-induzierte Aktivierung von p53, dessen Phosphorylierung an S15, dessen Eigenschaft als Transkriptionsfaktor und schlussendlich den Zelltod inhibieren.

Neuere Studien zur Wirksamkeit verschiedener Wirkstoffe bei HHV-8-assoziierten Erkrankungen und in Zellkulturen belegen außerdem, dass der p53-Signalweg in HHV-8 infizierten Zellen reaktivierbar ist (Curreli et al., 2005; Petre et al., 2007; Sarek et al., 2007). Vor kurzem wurde gezeigt, dass Glycyrrhizic-Säure die latente Infektionsphase von HHV-8 in infizierten B-Lymphozyten beeinflusst und p53-abhängige Apoptose induzieren kann (Curreli et al., 2005). Dies wird über eine Verminderung der Expression von LANA-1 erreicht, wodurch p53 reaktiviert wird. Dies führt über einen Funktionsverlust der Mitochondrien schlussendlich zu Apoptose (Curreli et al., 2005). Ebenso zeigt Nutlin-3a, ein Inhibitor des MDM-2-p53 Komplexes, zytotoxische Effekte in PEL-Zelllinien (Sarek et al., 2007). Die zytotoxische Wirkung von Nutlin-3a in HHV-8-infizierten Zellen setzt allerdings ein

funktionales, nicht-mutiertes p53 voraus, da die Gabe von Nutlin-3a zu Burkitt-Lymphom Zellen, die ein mutiertes p53 exprimieren, keine Wirkung zeigt (Sarek et al., 2007).

Auch Untersuchungen zur Wirkung von Doxorubicin, einem DNA-schädigenden Agens, auf PEL-Zelllinien bestätigen, dass der p53-abhängige Apoptose-Signalweg in HHV-8-infizierten Zelllinien funktionell ist (Petre et al., 2007). Angeregt wurde diese Untersuchung durch die Beobachtung, dass der medikamentöse Einsatz von Doxorubicin sehr effizient die Behandlung von Patienten mit PEL oder AIDS-KS unterstützt (Boulanger et al., 2001; Nunez et al., 2001; Stürzl et al., 1994). Der Grossteil der Patienten, die an dieser Studie teilnahmen, zeigte eine Reaktion auf die Behandlung, die sich vor allem verlangsamend bis stabilisierend auf den Krankheitsverlauf auswirkte und in wenigen Fällen sogar zu einer deutlichen Verbesserung führte. Petre und Mitarbeiter demonstrierten an verschiedenen PEL-Zelllinien, dass trotz der Expression verschiedener p53-inhibierender viraler Proteine die Behandlung mit Doxorubicin zu p53-abhängigem Zellzyklusarrest, sukzessiver Phosphorylierung von p53 und Aktivierung von p53-abhängigen Zielgenen führt (Petre et al., 2007).

Zusammenfassend belegen die Studien der letzten Jahre die Funktionalität des p53-Signalwegs in HHV-8-infizierten Zelllinien, und dass virale Faktoren der lytischen Replikationsphase ein Zelltodprogramm induzieren können. Die Daten der vorliegenden Arbeit identifizieren den N-Terminus von HHV-8-ORF21 als einen induzierenden Faktor eines Apoptose-ähnlichen Phänotyps in Anwesenheit von p53. Somit liegen erstmals Hinweise vor, dass ein HHV-8-kodierter Faktor der lytischen Replikationsphase möglicherweise eine proapoptotische Funktion ausführt, welche von dem p53-Signalweg abhängig ist.

4.2.4. Zelltod als mögliche Ursache von Inflammation in der Pathogenese von KS

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine ORF21-Expression in Zellkulturen einen apoptotischen Phänotyp induziert, da eine Caspasenaktivierung nachgewiesen wurde. Ebenso kann ein ORF21-induzierter nekrotischer Zelltod nicht völlig ausgeschlossen werden, da die Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi$), anhand der JC-1- bzw. Propidiumjodid-Färbung gezeigt, auch im Verlauf der Nekrose stattfinden (Proskuryakov et al., 2003). Die

Anwesenheit inflammatorischer Zytokine in frühen KS-Tumorstadien (Ensoli & Stürzl, 1998), lassen allerdings auf einen nekrotischen Zelltod schließen, da Apoptose keine Entzündungsreaktionen hervorruft.

Es ist von Interesse, ob ORF21 auch *in vivo* den Zelltod induziert und demzufolge auch maßgeblich an der Inflammation im frühen KS-Tumorstadium beteiligt ist. Anhand des durchgeführten Testsystems konnte nicht detailliert gezeigt werden, welche Caspasen im speziellen aktiviert werden. Sogenannte pro-inflammatorische Caspasen, wie z.B. Caspase-1, -4, -5 & -12, können u.a. Interferone oder Interleukine induzieren und somit zu einer Entzündungsreaktion beitragen (Festjens et al., 2006a; Nadiri et al., 2006).

Eine kürzlich von Chan und Mitarbeitern veröffentlichte Arbeit zeigt eine biologisch relevante Rolle für diesen alternativen Weg eines programmierten Zelltods auf (Chan et al., 2003). In diesen Untersuchungen wurden Zellen mit dem *Vaccinia*-Virus infiziert, um eine natürliche Bedingung zu schaffen, in der Apoptose inhibiert ist. Wird diesen infizierten Zellen das inflammatorische Zytokin TNF- α zugegeben, so sterben die Zellen an Nekrose anstelle der zu erwartenden Apoptose. Die Konsequenzen für das Immunsystem, die aus einer solchermaßen ausgelösten Nekrose resultieren, sind noch nicht vollständig geklärt. In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, wie die verschiedenen Leukozyten diese Entzündungssignale erfassen und mit nekrotischen Zellen interagieren (Krysko et al., 2006; Proskuryakov et al., 2002).

4.3. Ausblick

Eine interessante Frage für zukünftige Untersuchungen ist, über welchen Mechanismus ORF21 die Aktivierung von p53 induziert. Ein detailliert charakterisierter Apoptose-Signalweg über den Tumorsuppressor p53 wird durch die bekannten Onkoproteine Ras, E2F1, E1A und c-Myc ausgelöst und ist an das Gen *Alternative Reading Frame* (ARF) gekoppelt (Bates et al., 1998; de Stanchina et al., 1998; Palmero et al., 1998; Zindy et al., 1998). Eine Aktivierung dieser Onkoproteine induziert die Expression von humanem p14^{ARF}, welches direkt mit MDM2 interagiert und somit dessen Fähigkeit, p53 zu ubiquitinieren und zu degradieren, unterbindet (Kamijo et al., 1998; Pomerantz et al., 1998; Zhang et al., 1998). Somit führt die Aktivierung von humanem p14^{ARF} direkt zu einer p53 Stabilisierung, nachfolgendem

Zellzyklus-Arrest und Apoptose. Hier ist zu klären, ob ORF21 an einer Aktivierung von p14^{ARF} beteiligt ist.

Eine Möglichkeit zur gezielten Untersuchung einzelner Gene im Kontext einer viralen Infektion bietet der Ansatz, komplette virale Genome als *Bacterial Artificial Chromosomes* (BAC), in *E.coli* zu klonieren (Messerle et al., 1997). Diese Technik gestattet es, virale Genome als Plasmide in *E. coli* zu amplifizieren und genetisch zu manipulieren. Das rekombinante bzw. mutagenisierte BAC-Plasmid kann in eukaryotische Zellen transfiziert werden und somit können veränderte, infektiöse virale Partikel zur weiteren Funktionsanalyse gewonnen werden (Brune et al., 2000). Die Klonierung von HHV-8 als BAC-Plasmid und die anschließende Produktion von infektiösen, rekombinanten Viruspartikeln in HEK293-Zellen wurde bereits erfolgreich durchgeführt (Zhou et al., 2002).

Für weitere *in vitro* Untersuchungen der proapoptotischen ORF21-Funktion könnte das *orf21* Gen im BAC-Plasmid deletiert und der Funktionsverlust im Kontext des viralen Infektionszyklus untersucht werden. Mit diesem Ansatz kann die Rolle von ORF21 im lytischen Zyklus näher definiert werden. Hier ist besonders von Interesse, inwieweit der Zelltod in der finalen Replikationsphase durch ORF21 beeinflusst wird, bevor die Viruspartikel aus der infizierten Zelle freigesetzt werden. Zudem könnte Aufschluss darüber erlangt werden, welche Bedeutung ORF21 bei einer *de novo*-Infektion hat, da bereits gezeigt werden konnte, dass ORF21 mit viralen Capsidproteinen assoziiert ist (Zhu et al., 2005).

Bislang konnte wegen Schwierigkeiten in der Übertragbarkeit noch kein Tiermodell für eine KSHV-Infektion etabliert werden (Dourmishev et al., 2003; Picchio et al., 1997). Allerdings wurden bereits verschiedene transgene Mauslinien generiert, mit denen die Expression einzelner HHV-8-Gene *in vivo* untersucht wurde (Couty & Gershengorn, 2004; Dourmishev et al., 2003; Fakhari et al., 2006; Katano & Sata, 2000). So kann beispielsweise die Wirkung der ORF21-Expression an einem transgenen Mausmodell untersucht werden. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollte allerdings ein konditionales Expressionsmodell gewählt werden, da eine konstitutive ORF21-Expression die Vitalität einer transgenen Maus beeinträchtigen könnte. Von besonderem Interesse ist hierbei, inwieweit und mit welchen Konsequenzen der p53-abhängige Apoptose-Signalweg *in vivo* induziert wird. Letztendlich wird das Entschlüsseln der Wechselwirkungen von HHV-8-kodierten Proteinen mit endogenen Tumorsuppressoren wie p53 zu einem besseren

Verständnis der KS-Pathogenese und allen weiteren HHV-8-assoziierten angioproliferativen Erkrankungen führen (Dittmer & Krown, 2007; Uetz et al., 2006). Hierbei unterstützen neueste Tumormodelle in der Maus den Therapieansatz, p53 als Angriffspunkt zur Behandlung von HHV-8-assoziierten Erkrankungen zu verwenden. Eine Reaktivierung von p53 in p53-defizienten Tumoren in der Maus führte zu Apoptose oder Seneszenz, je nach Art des untersuchten Tumors (Martins et al., 2006; Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007).

Obwohl neuartige Therapieformen gegen AIDS, wie z.B. HAART, oder verbesserte konventionelle chemotherapeutische Ansätze auch eine Erleichterung für KS-Patienten bringen, zeigen diese Medikamente schwere Nebenwirkungen und sind wegen hoher Kosten nur in Industrieländern allgemein verfügbar. Zudem ist die Entwicklung resistenter Virenstämme nur eine Frage der Zeit (Di Lorenzo et al., 2007; Krown, 2004). Daher wäre es wünschenswert, weitere Optionen zur Behandlung dieser Patientengruppe zu haben.

5. Literaturverzeichnis

- Albini, A., Barillari, G., Benelli, R., Gallo, R.C. und Ensoli, B. (1995) Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4838-4842.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. und Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171.
- Arora, A., Chiao, E. und Tying, S.K. (2007) AIDS malignancies. *Cancer Treat Res*, **133**, 21-67.
- Barbaro, G. und Barbarini, G. (2007) HIV infection and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy (Review). *Oncol Rep*, **17**, 1121-1126.
- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L. und Vousden, K.H. (1998) p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*, **395**, 124-125.
- Belanger, C., Gravel, A., Tomoiu, A., Janelle, M.E., Gosselin, J., Tremblay, M.J. und Flamand, L. (2001) Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein inhibits Fas-mediated apoptosis through binding and prevention of procaspase-8 maturation. *J Hum Virol*, **4**, 62-73.
- Beral, V., Peterman, T.A., Berkelman, R.L. und Jaffe, H.W. (1990) Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet*, **335**, 123-128.
- Blasig, C., Zietz, C., Haar, B., Neipel, F., Esser, S., Brockmeyer, N.H., Tschachler, E., Colombini, S., Ensoli, B. und Stürzl, M. (1997) Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J Virol*, **71**, 7963-7968.
- Bode, A.M. und Dong, Z. (2004) Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, **4**, 793-805.
- Boulanger, E., Agbalika, F., Maarek, O., Daniel, M.T., Grollet, L., Molina, J.M., Sigaux, F. und Oksenhendler, E. (2001) A clinical, molecular and cytogenetic study of 12 cases of human herpesvirus 8 associated primary effusion lymphoma in HIV-infected patients. *Hematol J*, **2**, 172-179.
- Breckenridge, D.G. und Xue, D. (2004) Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 647-652.
- Brune, W., Messerle, M. und Koszinowski, U.H. (2000) Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet*, **16**, 254-259.
- Bubman, D., Guasparri, I. und Cesarman, E. (2007) Dereglulation of c-Myc in primary effusion lymphoma by Kaposi's sarcoma herpesvirus latency-associated nuclear antigen. *Oncogene*, **26**, 4979-4986.
- Cannon, J.S., Hamzeh, F., Moore, S., Nicholas, J. und Ambinder, R.F. (1999) Human herpesvirus 8-encoded thymidine kinase and phosphotransferase homologues confer sensitivity to ganciclovir. *J Virol*, **73**, 4786-4793.

- Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P.S., Said, J.W. und Knowles, D.M. (1995) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med*, **332**, 1186-1191.
- Cesarman, E., Nador, R.G., Aozasa, K., Delsol, G., Said, J.W. und Knowles, D.M. (1996) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in non-AIDS related lymphomas occurring in body cavities. *Am J Pathol*, **149**, 53-57.
- Chan, F.K., Shisler, J., Bixby, J.G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., Orenstein, J., Moss, B. und Lenardo, M.J. (2003) A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem*, **278**, 51613-51621.
- Chang, P.C. und Li, M. (2007) KSHV K-cyclin Interacts with Cdk9 and Stimulates Cdk9-mediated Phosphorylation of p53 Tumor Suppressor. *J Virol*.
- Chang, P.J., Shedd, D., Gradoville, L., Cho, M.S., Chen, L.W., Chang, J. und Miller, G. (2002) Open reading frame 50 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus directly activates the viral PAN and K12 genes by binding to related response elements. *J Virol*, **76**, 3168-3178.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M. und Moore, P.S. (1994) Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, **266**, 1865-1869.
- Chang, Y., Moore, P.S., Talbot, S.J., Boshoff, C.H., Zarkowska, T., Godden, K., Paterson, H., Weiss, R.A. und Mitnacht, S. (1996) Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature*, **382**, 410.
- Ciufo, D.M., Cannon, J.S., Poole, L.J., Wu, F.Y., Murray, P., Ambinder, R.F. und Hayward, G.S. (2001) Spindle cell conversion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: formation of colonies and plaques with mixed lytic and latent gene expression in infected primary dermal microvascular endothelial cell cultures. *J Virol*, **75**, 5614-5626.
- Corbellino, M., Poirel, L., Aubin, J.T., Paulli, M., Magrini, U., Bestetti, G., Galli, M. und Parravicini, C. (1996) The role of human herpesvirus 8 and Epstein-Barr virus in the pathogenesis of giant lymph node hyperplasia (Castleman's disease). *Clin Infect Dis*, **22**, 1120-1121.
- Cornali, E., Zietz, C., Benelli, R., Weninger, W., Masiello, L., Breier, G., Tschachler, E., Albin, A. und Stürzl, M. (1996) Vascular endothelial growth factor regulates angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol*, **149**, 1851-1869.
- Cossarizza, A., Baccharani-Contrì, M., Kalashnikova, G. und Franceschi, C. (1993) A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun*, **197**, 40-45.
- Couty, J.P. und Gershengorn, M.C. (2004) Insights into the viral G protein-coupled receptor encoded by human herpesvirus type 8 (HHV-8). *Biol Cell*, **96**, 349-354.
- Curreli, F., Friedman-Kien, A.E. und Flore, O. (2005) Glycyrrhizic acid alters Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency, triggering p53-mediated apoptosis in transformed B lymphocytes. *J Clin Invest*, **115**, 642-652.

- de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J. und Lowe, S.W. (1998) E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev*, **12**, 2434-2442.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W. und Old, L.J. (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 2420-2424.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. und Martinou, J.C. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 891-901.
- Di Lorenzo, G., Konstantinopoulos, P.A., Pantanowitz, L., Di Trolio, R., De Placido, S. und Dezube, B.J. (2007) Management of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Lancet Oncol*, **8**, 167-176.
- Dittmer, D., Lagunoff, M., Renne, R., Staskus, K., Haase, A. und Ganem, D. (1998) A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, **72**, 8309-8315.
- Dittmer, D.P. und Krown, S.E. (2007) Targeted therapy for Kaposi's sarcoma and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Curr Opin Oncol*, **19**, 452-457.
- Dourmishev, L.A., Dourmishev, A.L., Palmeri, D., Schwartz, R.A. und Lukac, D.M. (2003) Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 175-212, table of contents.
- Duman, S., Toz, H., Asci, G., Alper, S., Ozkahya, M., Unal, I., Celik, A., Ok, E. und Basci, A. (2002) Successful treatment of post-transplant Kaposi's sarcoma by reduction of immunosuppression. *Nephrol Dial Transplant*, **17**, 892-896.
- Dupin, N., Fisher, C., Kellam, P., Ariad, S., Tulliez, M., Franck, N., van Marck, E., Salmon, D., Gorin, I., Escande, J.P., Weiss, R.A., Alitalo, K. und Boshoff, C. (1999) Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4546-4551.
- Earnshaw, W.C. (1995) Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 337-343.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. und Kaufmann, S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 383-424.
- Edinger, A.L. und Thompson, C.B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 663-669.
- Engels, E.A., Biggar, R.J., Marshall, V.A., Walters, M.A., Gamache, C.J., Whitby, D. und Goedert, J.J. (2003) Detection and quantification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus to predict AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Aids*, **17**, 1847-1851.
- Ensoli, B., Barillari, G. und Gallo, R.C. (1992) Cytokines and growth factors in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Immunol Rev*, **127**, 147-155.

- Ensoli, B., Barillari, G., Salahuddin, S.Z., Gallo, R.C. und Wong-Staal, F. (1990) Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature*, **345**, 84-86.
- Ensoli, B., Gendelman, R., Markham, P., Fiorelli, V., Colombini, S., Raffeld, M., Cafaro, A., Chang, H.K., Brady, J.N. und Gallo, R.C. (1994) Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature*, **371**, 674-680.
- Ensoli, B., Sgadari, C., Barillari, G., Sirianni, M.C., Stürzl, M. und Monini, P. (2001) Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer*, **37**, 1251-1269.
- Ensoli, B. und Stürzl, M. (1998) Kaposi's sarcoma: a result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents. *Cytokine Growth Factor Rev*, **9**, 63-83.
- Fakhari, F.D. und Dittmer, D.P. (2002) Charting latency transcripts in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by whole-genome real-time quantitative PCR. *J Virol*, **76**, 6213-6223.
- Fakhari, F.D., Jeong, J.H., Kanan, Y. und Dittmer, D.P. (2006) The latency-associated nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus induces B cell hyperplasia and lymphoma. *J Clin Invest*, **116**, 735-742.
- Festjens, N., Cornelis, S., Lamkanfi, M. und Vandenabeele, P. (2006a) Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation. *Biol Chem*, **387**, 1005-1016.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T. und Vandenabeele, P. (2006b) Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*, **1757**, 1371-1387.
- Fraser, A. und Evan, G. (1996) A license to kill. *Cell*, **85**, 781-784.
- Friberg, J., Jr., Kong, W., Hottiger, M.O. und Nabel, G.J. (1999) p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature*, **402**, 889-894.
- Fridman, J.S. und Lowe, S.W. (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, **22**, 9030-9040.
- Friedman, P.N., Chen, X., Bargonetti, J. und Prives, C. (1993) The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3319-3323.
- Friedrich, G. und Soriano, P. (1991) Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*, **5**, 1513-1523.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X. und Ronai, Z. (1998) Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene*, **17**, 2543-2547.
- Gao, S.J., Kingsley, L., Li, M., Zheng, W., Parravicini, C., Ziegler, J., Newton, R., Rinaldo, C.R., Saah, A., Phair, J., Detels, R., Chang, Y. und Moore, P.S. (1996) KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med*, **2**, 925-928.

- Garcia-Blanco, M.A. und Cullen, B.R. (1991) Molecular basis of latency in pathogenic human viruses. *Science*, **254**, 815-820.
- Gill, M.B., Murphy, J.E. und Fingeroth, J.D. (2005) Functional divergence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and related gamma-2 herpesvirus thymidine kinases: novel cytoplasmic phosphoproteins that alter cellular morphology and disrupt adhesion. *J Virol*, **79**, 14647-14659.
- Godden-Kent, D., Talbot, S.J., Boshoff, C., Chang, Y., Moore, P., Weiss, R.A. und Mittnacht, S. (1997) The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. *J Virol*, **71**, 4193-4198.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. und Bujard, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766-1769.
- Gottlieb, G.J., Ragaz, A., Vogel, J.V., Friedman-Kien, A., Rywlin, A.M., Weiner, E.A. und Ackerman, A.B. (1981) A preliminary communication on extensively disseminated Kaposi's sarcoma in young homosexual men. *Am J Dermatopathol*, **3**, 111-114.
- Gradoville, L., Gerlach, J., Grogan, E., Shedd, D., Nikiforow, S., Metroka, C. und Miller, G. (2000) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50/Rta protein activates the entire viral lytic cycle in the HH-B2 primary effusion lymphoma cell line. *J Virol*, **74**, 6207-6212.
- Gustafson, E.A., Schinazi, R.F. und Fingeroth, J.D. (2000) Human herpesvirus 8 open reading frame 21 is a thymidine and thymidylate kinase of narrow substrate specificity that efficiently phosphorylates zidovudine but not ganciclovir. *J Virol*, **74**, 684-692.
- Gwack, Y., Hwang, S., Byun, H., Lim, C., Kim, J.W., Choi, E.J. und Choe, J. (2001) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50 represses p53-induced transcriptional activity and apoptosis. *J Virol*, **75**, 6245-6248.
- Hammerschmidt, W. und Sugden, B. (1990) DNA replication of herpesviruses during the lytic phase of their life-cycles. *Mol Biol Med*, **7**, 45-57.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Hansen, A., Boshoff, C. und Lagos, D. (2007) Kaposi sarcoma as a model of oncogenesis and cancer treatment. *Expert Rev Anticancer Ther*, **7**, 211-220.
- Hodak, E., Hammel, I., Feinmesser, M., Zelinger, A., Maron, L., Sulkes, J. und David, M. (1999) Differential expression of p53 and Ki-67 proteins in classic and iatrogenic Kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol*, **21**, 138-145.
- Hogan, B. (1994) *Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R. und Harris, C.C. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3551-3555.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. und Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.

- Honda, R., Tanaka, H. und Yasuda, H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*, **420**, 25-27.
- Hong, Y.K., Foreman, K., Shin, J.W., Hirakawa, S., Curry, C.L., Sage, D.R., Libermann, T., Dezube, B.J., Fingerhuth, J.D. und Detmar, M. (2004) Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet*, **36**, 683-685.
- Horn, C. und Wimmer, E.A. (2000) A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev Genes Evol*, **210**, 630-637.
- Hymes, K.B., Cheung, T., Greene, J.B., Prose, N.S., Marcus, A., Ballard, H., William, D.C. und Laubenstein, L.J. (1981) Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases. *Lancet*, **2**, 598-600.
- Israels, L.G. und Israels, E.D. (1999) Apoptosis. *Stem Cells*, **17**, 306-313.
- Jenner, R.G., Alba, M.M., Boshoff, C. und Kellam, P. (2001) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J Virol*, **75**, 891-902.
- Jenner, R.G. und Boshoff, C. (2002) The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochim Biophys Acta*, **1602**, 1-22.
- Judde, J.G., Lacoste, V., Briere, J., Kassa-Kelembho, E., Clyti, E., Couppe, P., Buchrieser, C., Tulliez, M., Morvan, J. und Gessain, A. (2000) Monoclonality or oligoclonality of human herpesvirus 8 terminal repeat sequences in Kaposi's sarcoma and other diseases. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 729-736.
- Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F. und Sherr, C.J. (1998) Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8292-8297.
- Kaposi, M. (1872) Idiopathisches multiples Pigmentsarkom der Haut. *Arch. Dermatol. und Syphilis*, **4**, 265-273.
- Katano, H. und Sata, T. (2000) Human herpesvirus 8 virology, epidemiology and related diseases. *Jpn J Infect Dis*, **53**, 137-155.
- Katano, H., Sato, Y. und Sata, T. (2001) Expression of p53 and human herpesvirus-8 (HHV-8)-encoded latency-associated nuclear antigen with inhibition of apoptosis in HHV-8-associated malignancies. *Cancer*, **92**, 3076-3084.
- Kellam, P., Boshoff, C., Whitby, D., Matthews, S., Weiss, R.A. und Talbot, S.J. (1997) Identification of a major latent nuclear antigen, LNA-1, in the human herpesvirus 8 genome. *J Hum Virol*, **1**, 19-29.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. und Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
- Klass, C.M., Krug, L.T., Pozharskaya, V.P. und Offermann, M.K. (2005) The targeting of primary effusion lymphoma cells for apoptosis by inducing lytic replication of human herpesvirus 8 while blocking virus production. *Blood*, **105**, 4028-4034.
- Komatsu, T., Barbera, A.J., Ballestas, M.E. und Kaye, K.M. (2001) The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen. *Viral Immunol*, **14**, 311-317.

- Kroemer, G., Dallaporta, B. und Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, **60**, 619-642.
- Krown, S.E. (2004) Highly active antiretroviral therapy in AIDS-associated Kaposi's sarcoma: implications for the design of therapeutic trials in patients with advanced, symptomatic Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol*, **22**, 399-402.
- Krysko, D.V., D'Herde, K. und Vandenabeele, P. (2006) Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis*, **11**, 1709-1726.
- Lagunoff, M. und Ganem, D. (1997) The structure and coding organization of the genomic termini of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology*, **236**, 147-154.
- Lane, D.P. und Crawford, L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, **278**, 261-263.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G. und Earnshaw, W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, **371**, 346-347.
- Leubert, R. (2007) Modulation von p53 durch die N-terminale Domäne der Thymidinkinase des Humanen-Herpesvirus-8. *GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit*. LMU München, München-Neuherberg.
- Li, J.J., Huang, Y.Q., Cockerell, C.J., Zhang, W.G., Nicolaides, A. und Friedman-Kien, A.E. (1997) Expression and mutation of the tumor suppressor gene p53 in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol*, **19**, 373-378.
- Lilyestrom, W., Klein, M.G., Zhang, R., Joachimiak, A. und Chen, X.S. (2006) Crystal structure of SV40 large T-antigen bound to p53: interplay between a viral oncoprotein and a cellular tumor suppressor. *Genes Dev*, **20**, 2373-2382.
- Linzer, D.I. und Levine, A.J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, **17**, 43-52.
- Lock, M.J., Thorley, N., Teo, J. und Emery, V.C. (2002) Azidodeoxythymidine and didehydrodeoxythymidine as inhibitors and substrates of the human herpesvirus 8 thymidine kinase. *J Antimicrob Chemother*, **49**, 359-366.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. und Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-490.
- Ly, J.D., Grubb, D.R. und Lawen, A. (2003) The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, **8**, 115-128.
- Mallat, Z. und Tedgui, A. (2000) Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol*, **130**, 947-962.
- Martin, G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 7634-7638.
- Martin, J.N., Ganem, D.E., Osmond, D.H., Page-Shafer, K.A., Macrae, D. und Kedes, D.H. (1998) Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med*, **338**, 948-954.

- Martins, C.P., Brown-Swigart, L. und Evan, G.I. (2006) Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell*, **127**, 1323-1334.
- McAllister, S.C. und Moses, A.V. (2007) Endothelial cell- and lymphocyte-based in vitro systems for understanding KSHV biology. *Curr Top Microbiol Immunol*, **312**, 211-244.
- Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H. und Koszinowski, U.H. (1997) Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14759-14763.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. und Moll, U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, **11**, 577-590.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. und Reed, J.C. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, **9**, 1799-1805.
- Moore, P.S. und Chang, Y. (1995) Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. *N Engl J Med*, **332**, 1181-1185.
- Moore, P.S., Gao, S.J., Dominguez, G., Cesarman, E., Lungu, O., Knowles, D.M., Garber, R., Pellett, P.E., McGeoch, D.J. und Chang, Y. (1996) Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J Virol*, **70**, 549-558.
- Moses, A.V., Fish, K.N., Ruhl, R., Smith, P.P., Strussenberg, J.G., Zhu, L., Chandran, B. und Nelson, J.A. (1999) Long-term infection and transformation of dermal microvascular endothelial cells by human herpesvirus 8. *J Virol*, **73**, 6892-6902.
- Nadiri, A., Wolinski, M.K. und Saleh, M. (2006) The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *J Immunol*, **177**, 4239-4245.
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, **256**, 12-18.
- Nakano, K. und Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, **7**, 683-694.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H. und Tsujimoto, Y. (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14681-14686.
- Neipel, F., Albrecht, J.C., Ensser, A., Huang, Y.Q., Li, J.J., Friedman-Kien, A.E. und Fleckenstein, B. (1997) Human herpesvirus 8 encodes a homolog of interleukin-6. *J Virol*, **71**, 839-842.
- Noel, J.C., De Thier, F., Simonart, T., Andre, J., Hermans, P., Van Vooren, J.P. und Heenen, M. (1997) p53 protein overexpression is a common but late event in the pathogenesis of iatrogenic and AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol Res*, **289**, 660-661.
- Nunez, M., Saballs, P., Valencia, M.E., Santos, J., Ferrer, E., Santos, I., Berrocal, A., Galindo, M.J., Podzamczar, D. und Gonzalez-Lahoz, J. (2001) Response to liposomal doxorubicin and clinical outcome of HIV-1-infected patients with Kaposi's sarcoma receiving highly active antiretroviral therapy. *HIV Clin Trials*, **2**, 429-437.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. und Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053-1058.

- Ozoren, N. und El-Deiry, W.S. (2003) Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol*, **13**, 135-147.
- Palmero, I., Pantoja, C. und Serrano, M. (1998) p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*, **395**, 125-126.
- Parkin, D.M. (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, **118**, 3030-3044.
- Parravicini, C., Chandran, B., Corbellino, M., Berti, E., Paulli, M., Moore, P.S. und Chang, Y. (2000) Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castlemans' disease. *Am J Pathol*, **156**, 743-749.
- Petre, C.E., Sin, S.H. und Dittmer, D.P. (2007) Functional p53 signaling in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lymphomas: implications for therapy. *J Virol*, **81**, 1912-1922.
- Picchio, G.R., Sabbe, R.E., Gulizia, R.J., McGrath, M., Herndier, B.G. und Mosier, D.E. (1997) The KSHV/HHV8-infected BCBL-1 lymphoma line causes tumors in SCID mice but fails to transmit virus to a human peripheral blood mononuclear cell graft. *Virology*, **238**, 22-29.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C. und DePinho, R.A. (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, **92**, 713-723.
- Proskuryakov, S.Y., Gabai, V.L. und Konoplyannikov, A.G. (2002) Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry (Mosc)*, **67**, 387-408.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G. und Gabai, V.L. (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res*, **283**, 1-16.
- Qunibi, W., Akhtar, M., Sheth, K., Ginn, H.E., Al-Furayh, O., DeVol, E.B. und Taher, S. (1988) Kaposi's sarcoma: the most common tumor after renal transplantation in Saudi Arabia. *Am J Med*, **84**, 225-232.
- Rabkin, C.S., Janz, S., Lash, A., Coleman, A.E., Musaba, E., Liotta, L., Biggar, R.J. und Zhuang, Z. (1997) Monoclonal origin of multicentric Kaposi's sarcoma lesions. *N Engl J Med*, **336**, 988-993.
- Radkov, S.A., Kellam, P. und Boshoff, C. (2000) The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med*, **6**, 1121-1127.
- Rainbow, L., Platt, G.M., Simpson, G.R., Sarid, R., Gao, S.J., Stoiber, H., Herrington, C.S., Moore, P.S. und Schulz, T.F. (1997) The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by orf73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J Virol*, **71**, 5915-5921.
- Reers, M., Smith, T.W. und Chen, L.B. (1991) J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, **30**, 4480-4486.
- Regezi, J.A., MacPhail, L.A., Daniels, T.E., DeSouza, Y.G., Greenspan, J.S. und Greenspan, D. (1993) Human immunodeficiency virus-associated oral Kaposi's sarcoma. A

- heterogeneous cell population dominated by spindle-shaped endothelial cells. *Am J Pathol*, **143**, 240-249.
- Rivas, C., Thlick, A.E., Parravicini, C., Moore, P.S. und Chang, Y. (2001) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. *J Virol*, **75**, 429-438.
- Russo, J.J., Bohenzky, R.A., Chien, M.C., Chen, J., Yan, M., Maddalena, D., Parry, J.P., Peruzzi, D., Edelman, I.S., Chang, Y. und Moore, P.S. (1996) Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14862-14867.
- Sambrook, J. und Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sarek, G., Kurki, S., Enback, J., Iotzova, G., Haas, J., Laakkonen, P., Laiho, M. und Ojala, P.M. (2007) Reactivation of the p53 pathway as a treatment modality for KSHV-induced lymphomas. *J Clin Invest*, **117**, 1019-1028.
- Sarid, R., Sato, T., Bohenzky, R.A., Russo, J.J. und Chang, Y. (1997) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. *Nat Med*, **3**, 293-298.
- Sax, J.K., Fei, P., Murphy, M.E., Bernhard, E., Korsmeyer, S.J. und El-Deiry, W.S. (2002) BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*, **4**, 842-849.
- Schlaeger, T.M., Bartunkova, S., Lawitts, J.A., Teichmann, G., Risau, W., Deutsch, U. und Sato, T.N. (1997) Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3058-3063.
- Schwartzman, R.A. und Cidlowski, J.A. (1993) Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*, **14**, 133-151.
- Seo, T., Park, J., Lee, D., Hwang, S.G. und Choe, J. (2001) Viral interferon regulatory factor 1 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus binds to p53 and represses p53-dependent transcription and apoptosis. *J Virol*, **75**, 6193-6198.
- She, Q.B., Chen, N. und Dong, Z. (2000) ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem*, **275**, 20444-20449.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. und Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, **91**, 325-334.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M. und Rogers, D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, **336**, 688-690.
- Soriano, P. (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*, **21**, 70-71.
- Soulier, J., Grollet, L., Oksenhendler, E., Miclea, J.M., Cacoub, P., Baruchel, A., Brice, P., Clauvel, J.P., d'Agay, M.F., Raphael, M. und et al. (1995) Molecular analysis of clonality in Castleman's disease. *Blood*, **86**, 1131-1138.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.

- Srinivasan, A., McClellan, A.J., Vartikar, J., Marks, I., Cantalupo, P., Li, Y., Whyte, P., Rundell, K., Brodsky, J.L. und Pipas, J.M. (1997) The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain. *Mol Cell Biol*, **17**, 4761-4773.
- Staskus, K.A., Zhong, W., Gebhard, K., Herndier, B., Wang, H., Renne, R., Beneke, J., Pudney, J., Anderson, D.J., Ganem, D. und Haase, A.T. (1997) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J Virol*, **71**, 715-719.
- Stürzl, M., Blasig, C., Schreier, A., Neipel, F., Hohenadl, C., Cornali, E., Ascherl, G., Esser, S., Brockmeyer, N.H., Ekman, M., Kaaya, E.E., Tschachler, E. und Biberfeld, P. (1997) Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classical and African Kaposi's sarcoma. *Int J Cancer*, **72**, 68-71.
- Stürzl, M., Brandstetter, H. und Roth, W.K. (1992) Kaposi's sarcoma: a review of gene expression and ultrastructure of KS spindle cells in vivo. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **8**, 1753-1763.
- Stürzl, M., Brandstetter, H., Zietz, C., Eisenburg, B., Raivich, G., Gearing, D.P., Brockmeyer, N.H. und Hofschneider, P.H. (1995) Identification of interleukin-1 and platelet-derived growth factor-B as major mitogens for the spindle cells of Kaposi's sarcoma: a combined in vitro and in vivo analysis. *Oncogene*, **10**, 2007-2016.
- Stürzl, M., Hohenadl, C., Zietz, C., Castanos-Velez, E., Wunderlich, A., Ascherl, G., Biberfeld, P., Monini, P., Browning, P.J. und Ensoli, B. (1999) Expression of K13/v-FLIP gene of human herpesvirus 8 and apoptosis in Kaposi's sarcoma spindle cells. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 1725-1733.
- Stürzl, M., Zietz, C., Eisenburg, B., Goebel, F.D., Gillitzer, R., Hofschneider, P.H. und Bogner, J.R. (1994) Liposomal doxorubicin in the treatment of AIDS-associated Kaposi's sarcoma: clinical, histological and cell biological evaluation. *Res Virol*, **145**, 261-269.
- Stürzl, M., Zietz, C., Monini, P. und Ensoli, B. (2001) Human herpesvirus-8 and Kaposi's sarcoma: relationship with the multistep concept of tumorigenesis. *Adv Cancer Res*, **81**, 125-159.
- Sugden, B., Kintner, C.R. und Mark, W. (1979) The molecular biology of lymphotropic herpesviruses. *Adv Cancer Res*, **30**, 239-278.
- Sun, R., Lin, S.F., Staskus, K., Gradoville, L., Grogan, E., Haase, A. und Miller, G. (1999) Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J Virol*, **73**, 2232-2242.
- Swanton, C., Mann, D.J., Fleckenstein, B., Neipel, F., Peters, G. und Jones, N. (1997) Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature*, **390**, 184-187.
- Uccini, S., Ruco, L.P., Monardo, F., Stoppacciaro, A., Dejana, E., La Parola, I.L., Cerimele, D. und Baroni, C.D. (1994) Co-expression of endothelial cell and macrophage antigens in Kaposi's sarcoma cells. *J Pathol*, **173**, 23-31.
- Uetz, P., Dong, Y.A., Zeretzke, C., Atzler, C., Baiker, A., Berger, B., Rajagopala, S.V., Roupelieva, M., Rose, D., Fossum, E. und Haas, J. (2006) Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science*, **311**, 239-242.

UNAIDS/WHO. (2007) AIDS epidemic update : December 2007.

Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H. und Hillen, W. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7963-7968.

Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R. und Jacks, T. (2007) Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, **445**, 661-665.

Vousden, K.H. und Lane, D.P. (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 275-283.

Vousden, K.H. und Lu, X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, **2**, 594-604.

Wabinga, H.R., Parkin, D.M., Wabwire-Mangen, F. und Mugerwa, J.W. (1993) Cancer in Kampala, Uganda, in 1989-91: changes in incidence in the era of AIDS. *Int J Cancer*, **54**, 26-36.

Wang, H.W., Trotter, M.W., Lagos, D., Bourboulia, D., Henderson, S., Makinen, T., Elliman, S., Flanagan, A.M., Alitalo, K. und Boshoff, C. (2004) Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet*, **36**, 687-693.

Weninger, W., Partanen, T.A., Breiteneder-Geleff, S., Mayer, C., Kowalski, H., Mildner, M., Pammer, J., Stürzl, M., Kerjaschki, D., Alitalo, K. und Tschachler, E. (1999) Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells. *Lab Invest*, **79**, 243-251.

West, J.T. und Wood, C. (2003) The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 regulator of transcription activation (RTA) in control of gene expression. *Oncogene*, **22**, 5150-5163.

Whitby, D., Marshall, V.A., Bagni, R.K., Miley, W.J., McCloud, T.G., Hines-Boykin, R., Goedert, J.J., Conde, B.A., Nagashima, K., Mikovits, J., Dittmer, D.P. und Newman, D.J. (2007) Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by natural products from Kaposi's sarcoma endemic regions. *Int J Cancer*, **120**, 321-328.

Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A. und Gough, N.M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, **336**, 684-687.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C. und Lowe, S.W. (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, **445**, 656-660.

Yamanegi, K., Tang, S. und Zheng, Z.M. (2005) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K8beta is derived from a spliced intermediate of K8 pre-mRNA and antagonizes K8alpha (K-bZIP) to induce p21 and p53 and blocks K8alpha-CDK2 interaction. *J Virol*, **79**, 14207-14221.

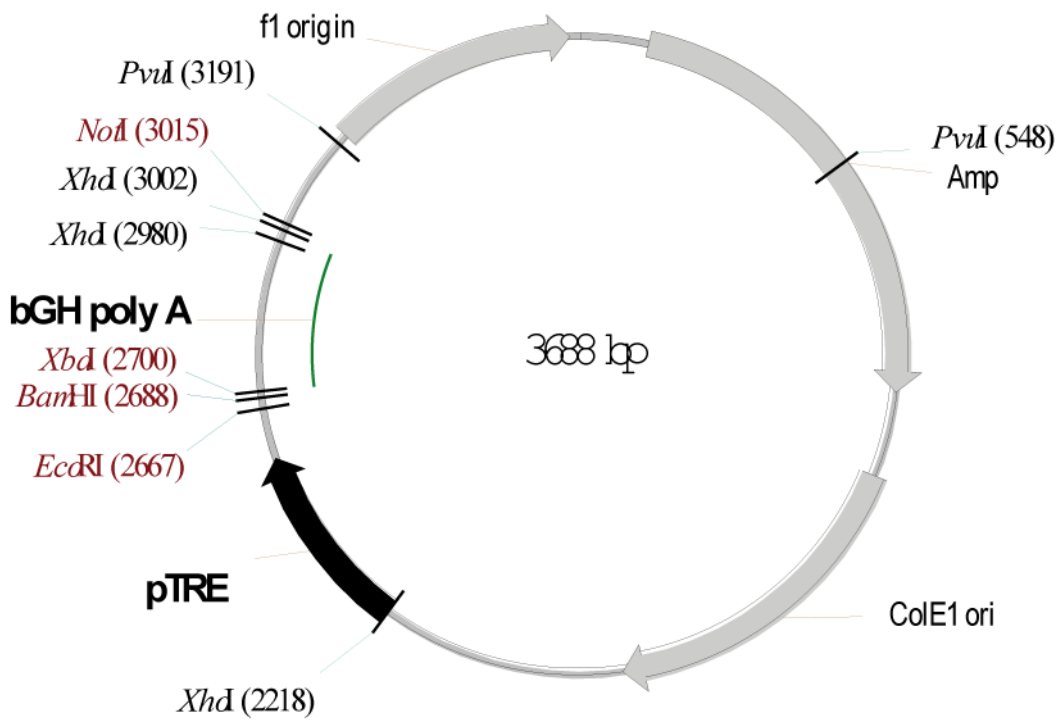
Zambetti, G.P. und Levine, A.J. (1993) A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *Faseb J*, **7**, 855-865.

- Zhang, Y., Xiong, Y. und Yarbrough, W.G. (1998) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, **92**, 725-734.
- Zhang, Y.J., Deng, J.H., Rabkin, C. und Gao, S.J. (2000) Hot-spot variations of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent nuclear antigen and application in genotyping by PCR-RFLP. *J Gen Virol*, **81**, 2049-2058.
- Zhou, F.C., Zhang, Y.J., Deng, J.H., Wang, X.P., Pan, H.Y., Hettler, E. und Gao, S.J. (2002) Efficient infection by a recombinant Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cloned in a bacterial artificial chromosome: application for genetic analysis. *J Virol*, **76**, 6185-6196.
- Zhu, F.X., Chong, J.M., Wu, L. und Yuan, Y. (2005) Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, **79**, 800-811.
- Ziegler, J.L., Simonart, T. und Snoeck, R. (2001) Kaposi's sarcoma, oncogenic viruses, and iron. *J Clin Virol*, **20**, 127-130.
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J. und Roussel, M.F. (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*, **12**, 2424-2433.

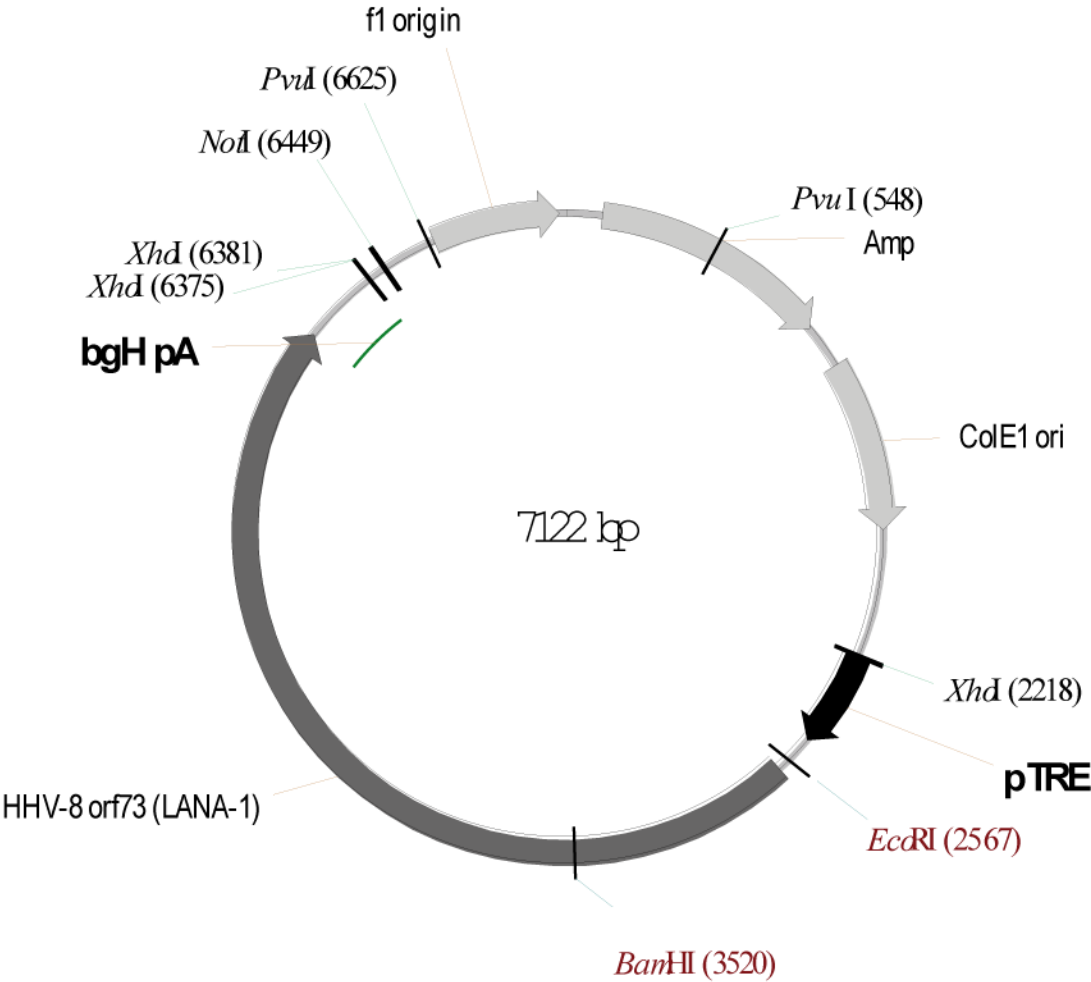
6. Anhang

Karten der hergestellten DNA-Konstrukte (siehe 2.2.2.11.)

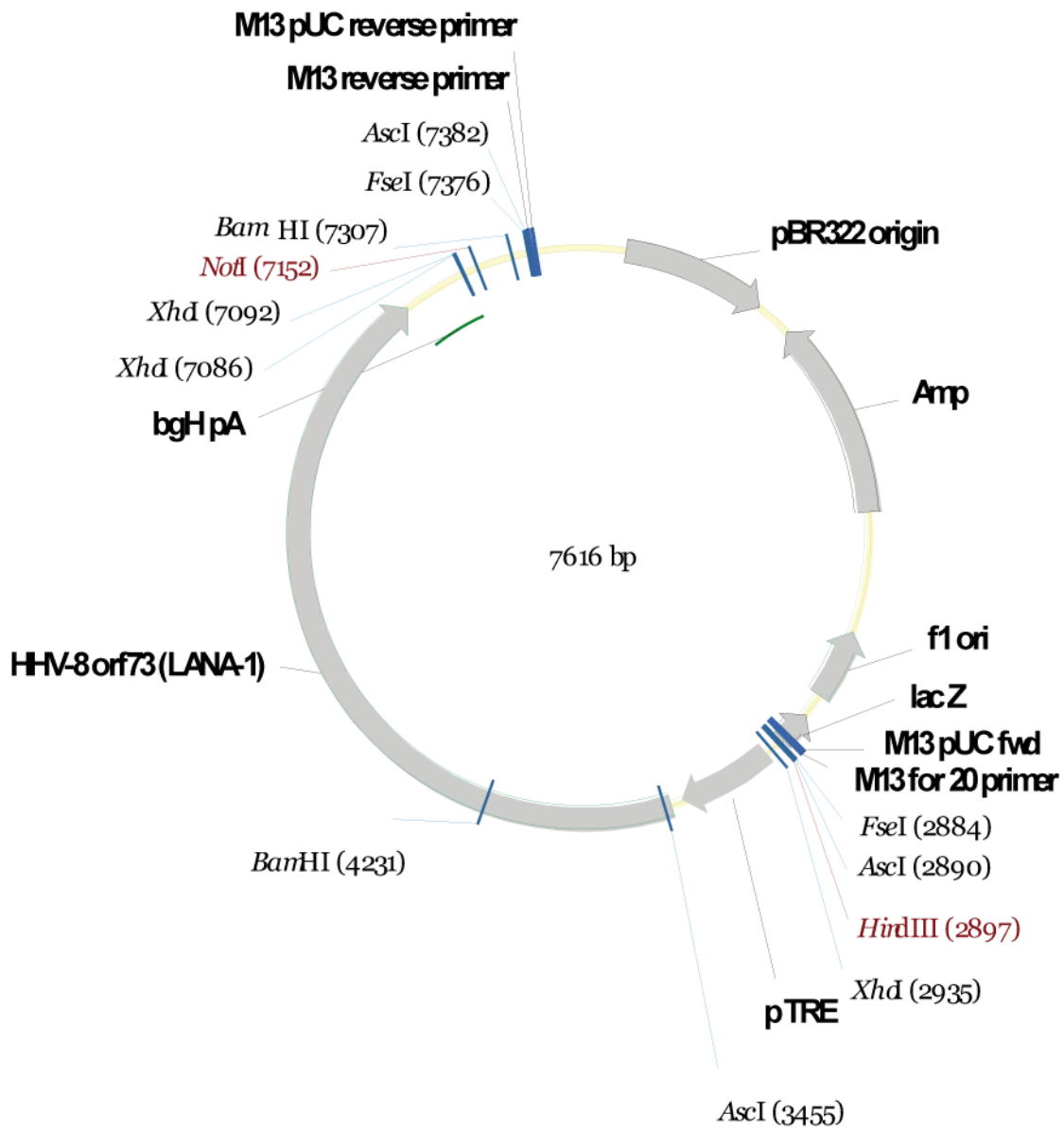
pBlueskript II KS TRE_bGHpolyA



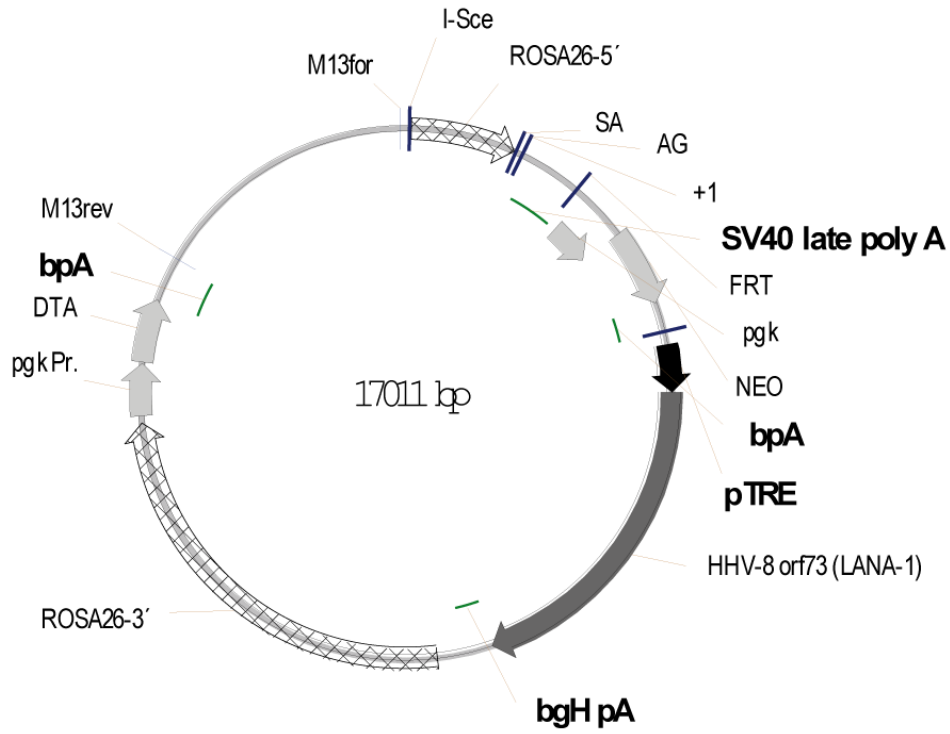
pBlueskript II KS-TRE_LANA-1-bGHpolyA



pSLfaTRE_LANA-1fa



pROSA26.6 TRE-LANA-1



(mittels I-Sce linearisiert)

