

Detektion und genetische Charakterisierung von neuen Herpesviren in Primaten

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien
Universität Berlin



vorgelegt von

Katja Spieß
aus Garlstedt

2012

Erster Gutachter: Prof. Dr. Georg Pauli

Robert Koch-Institut, Berlin

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Freie Universität Berlin

Disputation am 20. April 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Herpesviren	7
1.2	Genomorganisation, Partikelbau und Vermehrungszyklus	9
1.3	Epstein-Barr Virus	11
1.3.1	Epstein-Barr Virus: Krankheitsbilder beim Menschen	11
1.3.1.1	EBV-assoziierte Krebserkrankungen bei immunsupprimierten Patienten	12
1.3.1.2	EBV-assoziierte Krebserkrankungen bei immunkompetenten Individuen	12
1.3.1.3	EBV-assoziierte Nasopharyngeal-Karzinome	13
1.3.2	Lymphocryptoviren bei nicht-humanen Primaten	13
1.4	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)	15
1.4.1	Signalweitergabe	17
1.4.2	Regulierung der Signalweitergabe	18
1.4.3	Chemokinrezeptoren und Chemokine	19
1.4.4	Durch Herpesviren kodierte GPCRs	19
1.4.5	BILF1 des Epstein-Barr Virus	21
2	Zielsetzung der Arbeit	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Material	24
3.1.1	Geräte	24
3.1.2	Glaswaren	26
3.1.3	Kunststoffartikel	26
3.1.4	Filterpapier und Membranen	27
3.1.5	Biochemikalien	27
3.1.6	Enzyme und Marker	29
3.1.7	Proteinstandard	29
3.1.8	Längenstandards	30

3.1.9	Antikörper	30
3.1.10	Expressionsvektoren	30
3.1.11	Oligonukleotide und Primer	31
3.1.12	Zelllinien	31
3.1.13	Zellkulturmedien	31
3.1.14	Antibiotika	32
3.1.15	Reagenziensätze	33
3.1.16	Puffer-und Gebrauchslösungen	33
3.1.17	Software	35
3.1.18	Biologisches Material	36
3.1.19	Rekombinante Plasmide	37
3.2	Methoden	38
3.2.1	PCR (Polymerase Chain Reaction) Techniken	38
3.2.1.1	Prinzip der DNA-Amplifikation durch die PCR	38
3.2.1.2	Konventionelle PCR	38
3.2.1.3	Panherpes-Konsensus-PCR	39
3.2.1.4	Long-Distance-PCR	42
3.2.1.5	Long-Distance-PCR mit <i>Touch up</i> Modifikation	43
3.2.1.6	Expand High Fidelity PCR-System	44
3.2.1.7	Locked Nucleic Acids (LNAs)	46
3.2.2	DNA-Rekombinationstechniken	46
3.2.2.1	Restriktionsanalyse	46
3.2.2.2	Ligation von DNA-Fragmenten	47
3.2.2.3	Topo TA Cloning	47
3.2.3	Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	48
3.2.4	Transformation rekombinanter Plasmide	48
3.2.4.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	49
3.2.4.2	Transformation von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden	49
3.2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA	50
3.2.4.4	Bakterielle Vermehrung in Flüssigkultur für die nachfolgende Aufreinigung	50
3.2.4.5	DNA-Präparation durch Ethanol-fällung	50
3.2.4.6	Plasmid-DNA Präparation (kleiner Maßstab)	51
3.2.4.7	Plasmid-DNA-Präparation (großer Maßstab)	51

3.2.4.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Absorptionsspektromie	52
3.2.4.9	Sequenzierung von Nukleinsäuren	52
3.2.5	Elektrophorese.....	53
3.2.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	54
3.2.5.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
3.2.6	Immuno-/Western Blot.....	55
3.2.6.1	Deglykosylierung.....	56
3.2.6.2	<i>In vitro</i> Proteinexpression.....	57
3.2.7	Zellbiologische Methoden.....	57
3.2.7.1	Kultivierung von Zelllinien	57
3.2.7.2	Zellzählung	58
3.2.7.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	59
3.2.7.4	Beschichtung von Zellkulturplatten mittels Poly-D-Lysine Hydrobromide	59
3.2.8	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	60
3.2.8.1	Transfektion mit dem “Effectene Transfection Reagent” der Firma Qiagen	60
3.2.8.2	Transfektion mit “Lipofectamine 2000 Transfection Reagent” der Firma Invitrogen.....	61
3.2.9	CREB-Luziferase Versuch.....	61
3.2.9.1	CREB-Luziferase Versuch nach Forskolin-Stimulation	63
3.2.9.2	NFAT/NFkB-Luziferase Versuch	64
3.2.9.3	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	64
3.2.10	Immunfluoreszenz	65
3.2.10.1	Indirekter Immunfluoreszenztest mit kultivierten Zellen.....	65
3.2.10.2	Ko-Lokalisation von Proteinen	66
3.2.10.3	pEGFP-F als Kotransfektionsmarker	66
3.2.10.4	Protein-Disulfide-Isomerase-Immunfluoreszenztest.....	66
3.2.10.5	Nachweis der Internalisierung von 7TM-Rezeptoren	67
3.2.11	Konfokale Laserscan-Mikroskopie.....	68
3.2.12	Phylogenetische Analysen	68
3.2.13	Nomenklatur der Primatenherpesviren.....	69
4	Ergebnisse	70
4.1	Charakterisierung von LCV nicht-humaner Primaten.....	70
4.1.1	Sequenzaufklärung eines konservierten Genblocks bei LCV der Genogruppe I.....	70

4.1.2	Sequenzaufklärung eines konservierten Genblocks im Genom von LCV der Genogruppe II.....	73
4.1.3	Phylogenetische Analyse der LCV auf Basis der Sequenzen des kompletten gB-Gens.....	74
4.1.4	Phylogenetische Analyse der LCV auf Basis von gB- bis DPOL Sequenzen	76
4.1.5	Suche nach unbekanntem Lymphocryptoviren der Genogruppe II	77
4.1.5.2	Suche nach neuen Lymphocryptoviren der Genogruppe II in Schimpansen	79
4.2	Funktionelle Analysen von viralen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aus Lymphocryptoviren nicht humaner Primaten	80
4.2.1	Amplifikation und Klonierung von vGPCRs aus Lymphocryptoviren der Genogruppe II vom Gorilla, Gibbon und Orang-Utan.....	80
4.2.2	Identifikation von Transmembranhelices und konservierten Sequenzabschnitten der vGPCR	83
4.2.3	Bestimmung des Molekulargewichtes und Untersuchungen des Glykosylierungsgrades der vGPCRs.....	84
4.2.4	Lokalisation der vGPCRs in der transfizierten Zelle	86
4.2.5	Lokalisation von BILF1 und HsynLCV1-GPCR im Endoplasmatischen Retikulum.....	90
4.2.6	Internalisierung der konstitutiv aktiven GPCRs	91
4.2.7	Zelloberflächenexpression der vGPCRs	93
4.2.8	Konstitutive Aktivität der vGPCRs und Bestimmung der vGPCRS Untereinheit, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB führt	94
4.2.9	Ausschluss der Signalweitergabe über die G α s- Untereinheit.....	97
4.2.10	Aktivierung des nukleären Faktors kappaB (NF κ B).....	98
4.2.11	Stimulierung des nukleären Faktors aktivierter T-Zellen (NFAT).....	99
4.2.12	Hemmung der vGPCRs induzierten Signalkaskadewege durch selektive Inhibitoren.....	100
5	Diskussion	103
5.1	Sequenzaufklärung bei LCV von nicht-humanen Primaten	103

5.1.1	Erzeugung kontinuierlicher Sequenzabschnitte vom MDBP- bis zum DPOL-Gen von LCV der Genogruppe I und deren Analyse.....	103
5.1.2	Erzeugung von kontinuierlichen Sequenzabschnitten vom MBDP-DPOL-Gen von LCV der Genogruppe II	104
5.1.3	Suche nach unbekanntem LCV der Genogruppe II	105
5.1.4	Neuinterpretation des LCV-Stammbaums	106
5.2	Funktionelle Analysen von viralen G-Protein gekoppelten Rezeptoren aus Lymphocryptoviren.....	108
5.2.1	Identifikation von vGPCR-kodierenden Genen mit Homologie zu BILF1 bei LCV der Genogruppe II.....	108
5.2.2	Proteinstrukturanalyse der BILF1 –homologen ORFs.....	109
5.2.3	DRY-Motiv und konstitutive Aktivität	109
5.2.4	Expression und Glykosylierungsgrad der untersuchten vGPCRs	111
5.2.5	Zellokalisierung und Internalisierung der vGPCRs	111
5.2.6	Zelloberflächenexpression und konstitutive Aktivität der vGPCRs	113
5.2.7	Stimulierung des nukleären Faktors kappaB (NFκB).....	115
5.2.8	Stimulierung des nukleären Faktors aktivierter T-Zellen (NFAT) und Inaktivierung der durch vGPCR induzierten Signal-Kaskadewege durch selektive Inhibitoren	116
6	Zusammenfassung.....	119
7	Summary	121
8	Ausblick.....	123
9	Literaturverzeichnis.....	124
10	Abkürzungsverzeichnis	130
11	Anhang.....	133
11.1	Oligonukleotide.....	133

11.2 Lymphcryptoviren, Abkürzungen, Nomenklatur sowie Informationen über das Probenmaterial	135
11.3 Vektorkarten und N-terminale Markierung	144
11.4 Theoretisch bestimmte Modifikationen der vGPCRs	148
12 Danksagung	149
13 Erklärung	150

1 Einleitung

1.1 Herpesviren

Die Vertreter der Herpesviren bilden eine der größten Virusfamilien und stellen bei Mensch und Tier bedeutende Krankheitserreger dar. Es wurden bisher über 200 verschiedene Herpesviren in Säugetieren, Vögeln, Reptilien und Fischen nachgewiesen, davon über 100 in Primaten. Beim Menschen sind derzeit acht Herpesviren bekannt, die entweder mit ihren herkömmlichen Namen oder als humane Herpesviren (HHV) Typ 1 bis 8 bezeichnet werden (Tabelle 1) (Siakallis et al., 2009). Um eine bessere Unterscheidung von Herpesviren zu erreichen, entstand Ende der 1970er Jahre eine Differenzierung und Klassifizierung der Viren auf der Basis biologischer Eigenschaften. Der Einsatz von molekularbiologischen Methoden, insbesondere durch sequenzbasierte Analysen der Virusgenome bestätigte weitgehend die bisherige Eingruppierung der verschiedenen Herpesviren und führte zudem zur Beschreibung bisher unbekannter Vertreter dieser Virusfamilie. Die Familie der *Herpesviridae* wird in drei Unterfamilien α -, β - und γ -*Herpesvirinae* eingeteilt.

Die ***α -Herpesvirinae*** zeichnen sich durch ein relativ breites Wirtsspektrum, einen kurzen Replikationszyklus, einen schnell eintretenden zytopathischen Effekt und das Vermögen aus, v.a. in sensorischen Ganglien latent zu persistieren. Drei Spezies der *α -Herpesvirinae* sind beim Menschen bekannt: die zum Genus Simplexvirus gehörenden Herpes-simplex-Virus 1 und 2 (HSV-1 und HSV-2 bzw. HHV-1 und -2) sowie das Varizella-Zoster-Virus (VZV bzw. HHV-3), das zum Genus Varicellovirus gruppiert wird.

In vivo infizieren Vertreter der *α -Herpesvirinae* primär Epithelzellen oraler und genitaler Schleimhäute, was zu nekrotisiertem Gewebe und Gewebsflüssigkeitsaustritt und dem phänotypischen Erscheinungsbild von Hautbläschen führt. In der latenten Infektionsphase verbleiben *Simplexviren* in Form von episomaler DNA in den Neuronen der Trigeminalganglien, wohingegen das Genom der *Varizelloviren* in den sensorischen Ganglien des Rückenmarks vorliegt. Eine Reaktivierung der latenten Viren kann durch verschiedene Faktoren wie Stress oder Immunsuppression erfolgen.

Die ***β -Herpesvirinae*** weisen ein enges Zellspektrum und lange Replikationszyklen auf. Sie persistieren latent in Speicheldrüsen, lymphoretikulären Zellen, Nieren und anderem Gewebe. Humane Herpesviren, die in die Unterfamilie *β -Herpesvirinae* eingruppiert werden gehören zu

zwei Genera: Cytomegalievirus und Roseolovirus. Ein wichtiger humaner Vertreter ist das Cytomegalievirus (HCMV bzw. HHV-5). Eine Primärinfektion mit HCMV verläuft meist asymptomatisch. Die Schwere des Krankheitsverlaufs ist jedoch abhängig von der Immunkompetenz des Wirtes. HCMV-Infektionen stellen vor allem für immunsupprimierte Personen wie AIDS- und Organtransplantationspatienten sowie für Neugeborene von infizierten schwangeren Frauen ein Gesundheitsrisiko dar (Katlama, 1993). Weitere Vertreter der ***β-Herpesvirinae*** sind die humanen Herpesviren 6 und 7. Die Primärinfektion mit diesen Viren erfolgt häufig asymptomatisch. Bei immunsupprimierten Transplantationspatienten kann es jedoch zu einer Reaktivierung des humanen Herpesvirus 6 kommen (Abdel Massih et al., 2009). Insgesamt ähnelt die klinische Symptomatik dann derjenigen der Cytomegalovirusinfektion.

Für die ***γ-Herpesvirinae*** sind zwei humane Vertreter bekannt, das zum Genus Lymphocryptovirus zählende Epstein-Barr-Virus (EBV bzw. HHV-4) und das zum Genus der Rhadinovirus zugehörige humane Herpesvirus Typ 8 (HHV-8). Beide Viren weisen ein enges Zellspektrum sowie lange Replikationszyklen auf. Ein weiteres Charakteristikum dieser Viren ist die Replikation und Latenz in lymphoblastoiden Zellen. Die Primärinfektion mit EBV ist meistens asymptomatisch, jedoch kann es in infizierten B-Lymphozyten zur polyklonalen Aktivierung von B-Zellen kommen und dies zu einer infektiösen Mononukleose führen. In latent infizierten B-Zellen kann ein immortalisierter Zustand ausgelöst werden. Diese durch EBV induzierte B-Zell-Proliferation kann zu einem malignen Wachstum von B-Zellen führen. Für das HHV-8 (auch als KSHV für Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus bezeichnet) wird ein Zusammenhang mit der Pathogenese des Kaposi-Sarkoms vermutet (Cathomas, 2003).

Herpesviren treten weltweit mit einer hohen Durchseuchungsrate auf, allerdings ist die phänotypische Ausprägung der viralen Erkrankung stark beeinflusst von der Immunkompetenz des Patienten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Krankheiten nach einer Infektion mit humanen Herpesviren

Spezies	Subfamilie	Seroprevalenz	Primäres Krankheitsbild	Krankheitsbilder nach Reaktivierung	Latenz
Herpes simplex Virus 1 (HHV-1)	α	60-80%	Gingivostomatitis Ekzema herpeticatum	Herpes labialis	Zellkörper der dorsalen Hinterwurzelganglien
Herpes simplex Virus 2 (HHV-2)	α	22%	Genitalinfektionen Ekzema herpeticatum	Herpes genitalis	Zellkörper der dorsalen Hinterwurzelganglien
Varizella-Zoster-Virus (HHV-3)	α	95%	Windpocken	Herpes Zoster	Trigeminale-und Hinterwurzelganglien
Epstein-Barr-Virus (HHV-4)	γ	50-100%	infektiöse Mononukleose	Tumore	B-Lymphozyten und epithelialen Zellen
Cytomegalovirus (HHV-5)	β	60-80%	Retinitis* Meningoenzephalitis* Hepatitis* Pneumonie*	Retinitis* Meningoenzephalitis* Hepatitis* Pneumonie*	Endotheliale Zellen periphere Blut und mononukleare Zellen
HHV-6A/HHV-6B	β	39-100%	Exanthema subitum	normalerweise unsymptomatisch Meningoenzephalitis* Hepatitis	Monozyten und deren Vorläuferzellen
HHV-7	β	75%	Pityriasis rosea	normalerweise unsymptomatisch Meningoenzephalitis* Hepatitis	Monozyten
HHV-8	γ	10%	grippeähnliche Symptome	normalerweise unsymptomatisch	B-Zellen, Endothel-Zellen und Zellkörper der dorsalen Hinterwurzelganglien

* in Neugeborenen und in immunsupprimierten Patienten
(Modifiziert nach Rosenkilde et al., 2006b)

1.2 Genomorganisation, Partikelbau und Vermehrungszyklus

Das doppelsträngige, lineare DNA-Genom der Herpesviren variiert in seiner Größe von 124-240 kb und kodiert für über 200 Gene. Diese haben normalerweise ihren eigenen Promotor und werden in der Regel nicht gespleißt. Die DNA liegt im Virus-Core assoziiert mit einer fibrillären Proteinmatrix vor und wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben (siehe Abbildung 1). Das Kapsid ist von einer Lipiddoppelmembran (Virushülle) umgeben, die sich von zellulären Membranen ableitet, in welche zuvor viral kodierte Glykoproteine und nicht-glykosylierte

Polypeptide eingelagert worden sind. Diese Proteine spielen eine wichtige Funktion im Bereich der Virus-Wirt-Interaktion. Zwischen Kapsid und Virushülle befindet sich das Tegument, welches eine Reihe von Virusproteinen enthält, denen regulatorische Funktionen in der Frühphase des Replikationszyklus zugeschrieben werden.

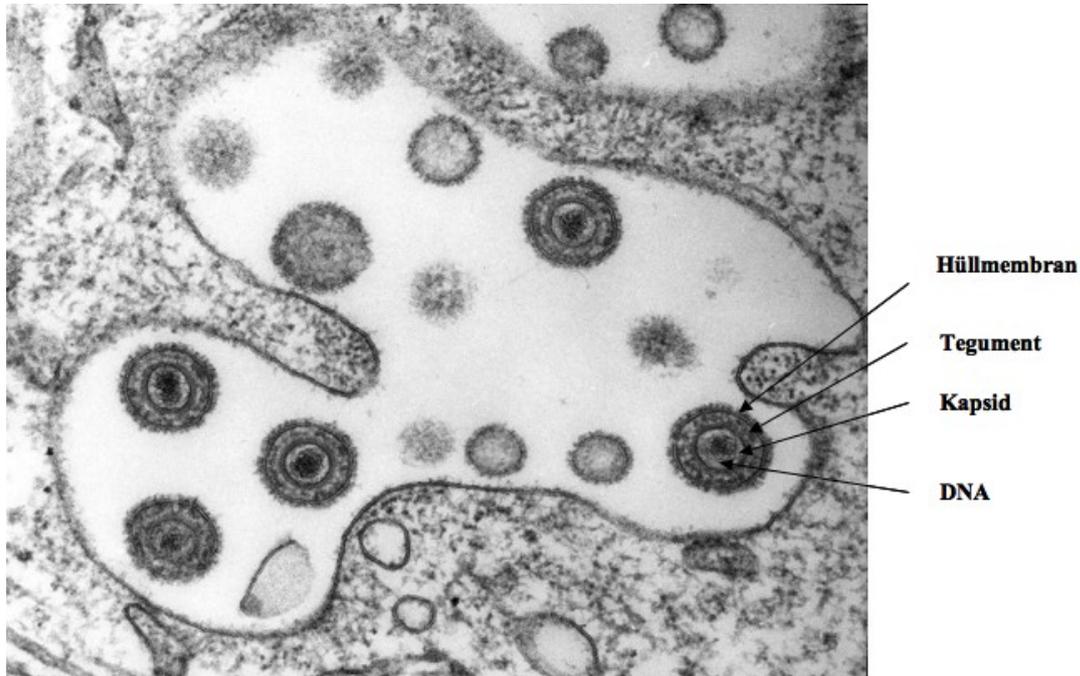


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes einer Herpesvirus-infizierten Zellkultur. Im Kapsid befindet sich elektronendichte DNA, die von einer doppelsträngigen Membran umhüllt ist. Zwischen der äußeren Hüllmembran und dem Kapsid ist das Tegument zu sehen. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Kurth; Robert Koch-Institut).

Herpesviren replizieren lytisch, wodurch es zur Zerstörung der Wirtszelle und der Freigabe infektiöser Viruspartikel kommt. Darauf folgt die Etablierung eines latenten Zustandes, in der die virale DNA als zirkuläres, episomales DNA-Molekül im Zellkern der infizierten Zelle vorliegt. Infolge einer Immunsuppression des Wirtes kann jedoch die lebenslange Phase der Latenz jederzeit durch einen lytischen Vermehrungszyklus unterbrochen werden (Roizman, 1996).

Der Ablauf einer Herpesvirus-Infektion kann generell wie folgt dargestellt werden, wobei Unterschiede bei einzelnen Virus-Zell-Kombinationen bestehen können. Nach der Bindung des Virus an die Zelloberfläche („attachment“) folgt die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle („penetration“). Die virale DNA wird zum Zellkern transportiert und durch die Kernporen in den Zellkern geschleust. Dort wird die lineare DNA zirkularisiert. Die Genexpression von Herpesviren ist streng reguliert und erfolgt als eine geordnete Kaskade,

wobei man die „immediate early“- , „early“- und „late“ Genexpression unterscheidet. Mit Hilfe von zellulären Transkriptionsfaktoren und des zellulären Translationsapparates findet die Synthese der immediate early-Proteine statt, welche den Ablauf des lytischen Zyklus durch Transaktivierung der „delayed early“-Gene regulieren. Die exprimierten „delayed early“-Gene sind vorwiegend für die Virusreplikation und als Enzyme im Nucleinsäurestoffwechsel von Bedeutung. Es folgt die Aktivierung der „late“-Gene, welche vor allem für Strukturproteine kodieren. Durch einen komplexen Vorgang des Virion-Assemblies wird der Replikationszyklus fast abgeschlossen, wobei der Zusammenbau des Nucleokapsids im Zellkern stattfindet. Weitere Modifikationen tragen zur Reifung des Virions bei woraufhin die infektiösen Partikel zur Oberfläche transportiert und durch Knospung durch die Zellmembran freigesetzt werden („budding“).

1.3 Epstein-Barr Virus

In dieser Arbeit sollte ein besseres Verständnis von Lymphocryptoviren (LCV), zu denen EBV zählt, erlangt werden. In den folgenden Kapiteln wird daher die klinische Symptomatik von EBV, aber auch LCV aus nicht-humanen Primaten und potentielle Onkogene exprimiert von LCV näher beschrieben.

1.3.1 Epstein-Barr Virus: Krankheitsbilder beim Menschen

EBV wird oral übertragen und etabliert seinen Replikationsfokus im oralen Epitheliumgewebe. Zum gleichen Zeitpunkt erfolgt die Infektion von B-Zellen in denen das Virus in den Zustand der Latenz übergeht. Zwei verschiedene Typen von EBV wurden bisher gefunden: EBV 1 und 2. Sie unterscheiden sich in dem Gen, welches für das EBV-nucleäre Antigen (EBNA) kodiert. Erstinfektionen mit EBV während der Kindheit sind in der Regel asymptomatisch, hingegen kann EBV beim Erwachsenen eine infektiöse Mononukleose (IM) auslösen. Der Schweregrad der IM kann unterschiedlich ausfallen: von mildem, kurzfristigem Fieber bis zu wochenlang anhaltendem Fieber und Unwohlsein. Patienten, die an einem „X-linked lymphoproliferative syndrome“ (XLP) erkrankt sind, sind in einem verstärkten Maß anfällig für eine EBV-Infektion. Bei einer XLP-Erkrankung kommt es zu einer Mutation des XLP-Gens im Genom des

Menschen. Durch den Gendefekt ist die Immunkompetenz geschwächt und es liegt eine erhöhte Sensitivität für eine EBV-Infektion vor. Infektionen in XLP-Patienten resultieren in massiven EBV-gesteuerten B-Zellproliferationen, Proliferationen von aktivierten T-Zellen und der Nekrose von Organen, was zum Tode der Patienten führt (Schuster et al., 2000).

1.3.1.1 **EBV-assoziierte Krebserkrankungen bei immunsupprimierten Patienten**

Verschiedene Krebserkrankungen in immunkompetenten und immunsupprimierten Wirten sind mit EBV assoziiert. Patienten deren Immunsystem durch Medikamente geschwächt ist, z.B. durch Chemotherapie nach einer Transplantation, haben ein erhöhtes Risiko ein B-Zelllymphom zu entwickeln. Die Entstehung von „post-transplant lymphoproliferative disorders“ (PTLD) erfolgt häufig im ersten Jahr nach der Transplantation und fast alle PTLDs sind EBV-positiv (Young et al., 2004). Auch können andere immunsupprimierte Patienten wie z.B. AIDS Patienten Lymphome entwickeln, von denen 50 % mit EBV assoziiert sind.

1.3.1.2 **EBV-assoziierte Krebserkrankungen bei immunkompetenten Individuen**

Das **Hodgkin Lymphom** (HL) führt zu einer Vergrößerung der Lymphknoten, in denen Reed-Sternberg (RS) Zellen nur einen geringen Prozentsatz des Tumors ausmachen (Kutok et al., 2006). Die Mehrzahl von proliferativen Zellen in diesen Tumoren sind reaktive Entzündungszellen. Ist jedoch eine EBV-Infektion nachweisbar, tritt diese klonal in allen präsenten RS-Zellen auf. EBV-infizierte RS-Zellen exprimieren LMPI, ein latent zyklisches Protein, welches eine starke Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert. (Young et al., 2004). Es gibt drei verschiedene Ausprägungen des **Burkitt Lymphoms** (BL): endemische, sporadische und die mit einer Immunschwäche assoziierte Variante. Sie sind alle unterschiedlich mit EBV assoziiert. Die endemische Form von BL kommt nur in afrikanischen Regionen vor, in denen auch eine hohe Rate von Malaria nachweisbar ist. Für diese Variante des BLs besteht eine 100 %ige Assoziation mit EBV. Die sporadische Form von BL ist eher selten und nur in 15 % der Fälle ist sie mit EBV assoziiert.

BL treten auch bei HIV-Patienten auf bevor die AIDS-Erkrankung voll in Erscheinung tritt. In 30-40% sind die Tumore EBV-positiv (Young et al., 2003; Kutok et al., 2006). EBV kann in

selteneren Fällen T- und NK-Zellen infizieren. Damit steigt das Risiko an **T-Zell- und NK-Zell-Lymphomen** zu erkranken. Die T-Zell- und NK-Zell-Lymphome können im südostasiatischen Raum nach einer akuten primären EBV-Infektion nachgewiesen werden. Die Tumore können als Nasallymphome auftreten und können fortschreitende Fäule von Knochengewebe auslösen (Young et al., 2004).

1.3.1.3 EBV-assoziierte Nasopharyngeal-Karzinome

Es gibt im Wesentlichen zwei Subtypen von Nasopharynx-Karzinomen (NPK): nicht-keratinisierende und keratinisierende Tumore. Nicht-keratinisierende Tumore sind zu fast 100% mit EBV assoziiert. Diese Tumore sind selten, treten aber in südostasiatischen und nordafrikanischen Populationen auf (Deyrup, 2008). Die monoklonale Detektion von EBV in diesen Tumoren lässt vermuten, dass die EBV-Infektion vor der unkontrollierten Zellteilung der Karzinomazellen stattfindet (Kutok et al., 2006). Es ist jedoch nicht bewiesen, dass es einen Zusammenhang zwischen einer EBV-Infektion und der Entwicklung von NPKs gibt. So könnten EBV-infizierte Zellen in einem erhöhten Maße für genetische Veränderungen durch Karzinogene empfänglich sein. Ein weiterer Kofaktor für die Entstehung von NPKs könnte mit der Lebensweise und der Nahrungsaufnahme zusammenhängen. Epidemiologische Studien belegten, dass NPK stark verbreitet in südlichen Regionen von China und Taiwan sind. Dies könnte mit der asiatischen Ernährung von gesalzenen Gemüsen, Fisch und Fleisch zusammenhängen (Fang et al., 2008).

1.3.2 Lymphocryptoviren bei nicht-humanen Primaten

Alpha-, Beta-, und Gammaherpesviren konnten in humanen und nicht humanen Primaten, nachgewiesen werden. Untersuchungen von Altweltaffen, welche auch Menschenaffen umfassen, zeigten, dass diese mit verschiedenen Herpesviruspezies, insbesondere mit Gammaherpesviren, latent infiziert sind. Einige Viren wurden in Tieren mit Tumoren oder bei neoplastischen Erkrankungen gefunden, andere bei systematischen Untersuchungen von gesunden Tieren (Wang et al., 2001).

Vertreter des Genus Lymphocryptovirus (LCV), welche in Menschenaffen nachgewiesen wurden, sind eng verwandt mit dem humanen EBV. Aufgrund der engen Koevolution zwischen diesen Herpesviren und dem jeweiligen natürlichen Wirt (McGeoch et al., 2006) können Studien von LCVs aus Menschenaffen das Verständnis von EBV als onkogenes Herpesvirus erweitern, da auch hier ein möglicher Zusammenhang zwischen der Tumorgenese und der Infektion mit LCVs bestehen könnte.

Desweiteren könnten bisher unbekannte LCVs eine Rolle bei nicht EBV-assoziierten Krankheitsbildern beim Menschen spielen. So hatte die Entdeckung bisher unbekannter LCV bei Primaten vor ca. 10 Jahren zu der Hypothese geführt, dass sich LCV von Primaten in drei Genogruppen gliedern (siehe Abbildung 2): eine Genogruppe bestand aus LCV von Neuweltaffen (Genogruppe III) und zwei weitere aus LCV von Altweltaffen (Genogruppe I und II). Die Genogruppe II wurde in Gorilla-, Orang-Utan und Gibbon-Proben erstmalig nachgewiesen und unterschied sich signifikant von Vertretern der Genogruppe I, in die das humane EBV eingeordnet wurde (Altwelt-LCV Genogruppe I) (Ehlers et al., 2003). Die Abgrenzung dieser neuen Genogruppe II von dem menschlichen EBV könnte darauf hinweisen, dass ein entsprechendes Virus auch beim Menschen auftreten kann.

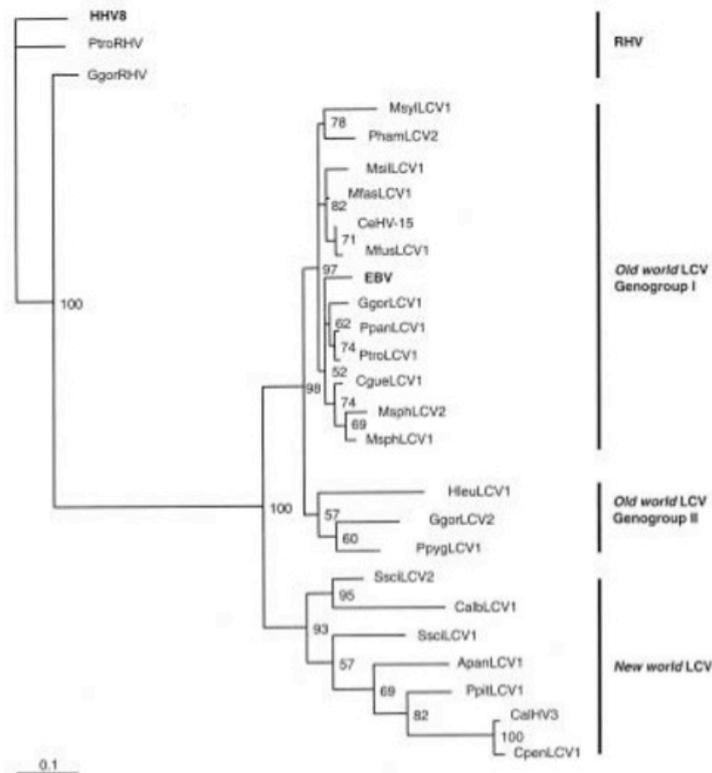


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum von Lymphocryptoviren aus Alt- und Neuweltaffen. Es sind zwei Genogruppen der Gamma-1-Herpesviren dargestellt. In der Altweltaffen Genogruppe I ist unter anderem das humane EBV eingeordnet. Die sich davon abgrenzende Genogruppe II von Altweltaffen beinhaltet Vertreter der *Hominoidae* HleuLCV1, GgorLCV2 und PpygLCV1. Für die Zuordnung der Spezies und Viren sowie deren Nomenklatur und Abkürzungen siehe Abschnitt 3.2.13 und Anhang 12.2. (aus Ehlers et al., 2003).

1.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

Die Superfamilie der GPCRs ist die größte Familie von Proteinen im menschlichen Genom. Neben den humanen zellulären GPCRs existieren auch „pirated“ viral veränderte GPCRs (vGPCRs), die eine entscheidende Rolle in verschiedenen Phasen der Virusinfektion spielen, so u.a. Immunevasion, Gewebeerkenkung (Wirtzellbereich), Zelleintritt, zelluläre Umprogrammierung, virale Replikation und Zellmigration.

Die charakteristische Struktur von GPCRs ist gekennzeichnet durch sieben membranständige α -Helixes, die durch sich abwechselnde intrazelluläre und extrazelluläre Loops verbunden sind. Ihr N-Terminus befindet sich im extrazellulären Raum und der C-Terminus im Zytosol (siehe Abbildung 3).

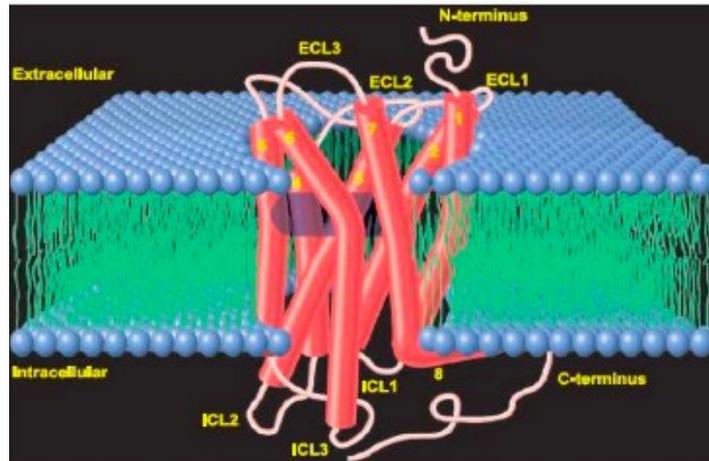


Abbildung 3: Struktur von GPCR in der Plasmamembran. (aus Kristiansen, 2004).

GPCRs spielen eine Schlüsselrolle in nahezu allen physiologischen und pathologischen Prozessen und können von einer Vielzahl von Liganden, wie z.B. von Ca^{2+} Ionen und Lichtphotonen aber auch Neurotransmitter und Hormone aktiviert werden.

Mit mehr als 800 Mitgliedern vertreten die GPCRs bei weitem die größte Familie von Zellmembran-Molekülen und sind in die Signalweitergabe involviert. Diese erfolgt beispielsweise durch Bindung eines Liganden an den GPCR, wodurch eine Konformationsänderung des Rezeptors induziert wird, welcher zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden führt (Schwartz et al., 2006). Einige GPCRs sind hingegen in Abwesenheit eines Liganden aktiv, ein Phänomen, welches als konstitutive Aktivierung bekannt ist (Milligan, 2003).

GPCRs werden in verschiedene Familien eingeteilt, abhängig von ihrer Sequenzhomologie. Die Einteilung erfolgt in die drei Familien A, B und C. Die **Familie A** beinhaltet Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren, davon sind 276 nicht-sensorische Rezeptoren. Liganden für diese Klasse von Rezeptoren sind z.B. Wachstumshormone und Chemokine. Ein Charakteristikum von Rezeptoren der **Familie B** ist eine lange N-terminale Domäne (~100 Aminosäuren). Durch Bindung von Hormonen an diese Domäne kommt es zur Aktivierung dieser Rezeptoren. Metabotrophe Glutamat-Rezeptoren sind die Prototypen der **Familie C**. Ihre sehr lange N-terminale Domäne ist in die Bindung der entsprechenden endogenen Liganden involviert. Beispiele für Liganden sind: Glutamat, Calcium und Gamma-Aminobuttersäure (GABA).

Es gibt GPCRs die klassifiziert wurden, für die jedoch kein Ligand bekannt ist. Diese GPCRs werden als „orphan“-Rezeptoren bezeichnet (Levoye et al., 2008).

1.4.1 Signalweitergabe

Wie auch schon der Name von GPCRs impliziert, binden diese Rezeptoren für die Signalweitergabe an ein heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein). Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor erfolgt eine Aktivierung von sekundären Botenstoffen und nachfolgenden Effektoren. Effektormoleküle der G-Proteine sind entweder zytosolische Enzyme oder Ionenkanäle in der Zellmembran.

Kommt es zur Aktivierung eines Rezeptors durch Bindung eines Liganden wird ein Konformationswechsel innerhalb des Rezeptors induziert. Dadurch steigt die Bindungsaffinität des G-Proteins an den Rezeptor, und es erfolgt der Austausch von GDP zu GTP durch die $G\alpha$ -Untereinheit. Beide Einheiten, die $G\alpha$ -Untereinheit und die $G\beta\gamma$ -Untereinheit sind zu diesem Zeitpunkt voneinander dissoziiert und damit in der Lage andere Signalmoleküle zu modellieren. Die spezifische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit hydrolysiert das GTP wieder zu GDP, welches die Reassoziierung der $G\alpha$ - und der $G\beta\gamma$ -Untereinheit zur Folge hat. In diesem Zustand ist der Rezeptor inaktiv (siehe Abbildung 4).

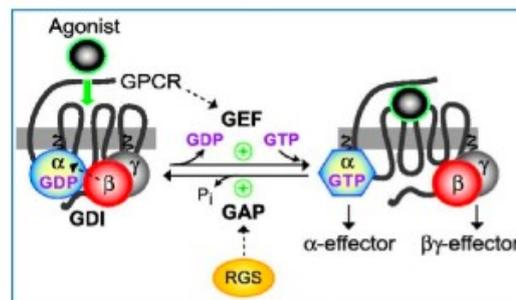


Abbildung 4: Signalweitergabe durch das G-Protein. (aus Johnston et al., 2007).

Basierend auf primären Sequenzähnlichkeiten der α -Untereinheiten können heterotrimäre G-Proteine in vier Familien eingeteilt werden: G_s , G_i , G_q und G_{12} . Die $G\alpha_i$ -Familie inhibiert die Adenylatzyklase „adenylate cyclase“ (AC), hingegen stimulieren $G\alpha_s$ -Proteine die Aktivierung der AC. Dies beeinflusst dementsprechend die Konzentration an intrazellulärem cAMP, welches in der Zelle als „Second messenger“ dient. Bei Inhibierung der AC wird folglich kein cAMP gebildet. $G\alpha_q$ -Proteine aktivieren die Phospholipase-C- β . Dieses membranständige Enzym spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) zu Inositolphosphat (IP_3) und Diacylglycerol

(DAG). IP₃ ist ebenfalls ein „Second messenger“. Es bindet an Ionenkanäle im endoplasmatischen Retikulum (ER) und führt so zur Freisetzung von Calcium ins Zytosol (siehe Abbildung 5). G $\alpha_{12/13}$ - Proteine aktivieren Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (Marinissen et al., 2001). Zusätzlich können aktivierte G $\beta\gamma$ -Dimere eine Vielfalt von Signalmolekülen regulieren, einschließlich AC, Kinasen und Ionenkanälen (Mirshahi et al., 2002).

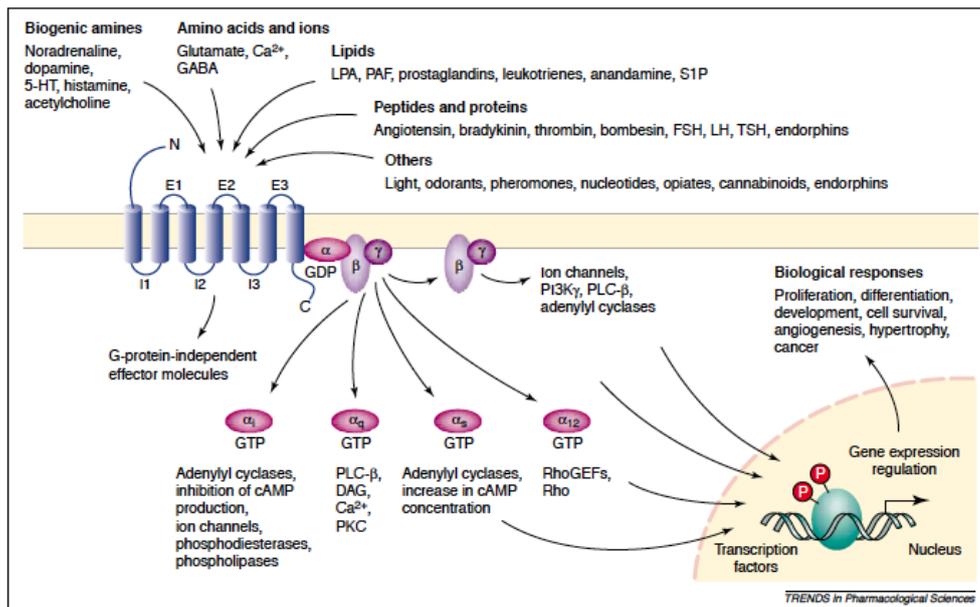


Abbildung 5: Signaltransduktionskaskaden via G-Proteine. (aus Marinissen et al., 2001).

1.4.2 Regulierung der Signalweitergabe

Die Aktivierung von GPCRs muss reguliert werden. Aktivierte GPCRs werden von GPCR Kinasen (GRK) phosphoryliert. Nach dem Phosphorylierungsschritt folgt die Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor, die Inhibierung der Interaktion von G-Protein und Rezeptor und die Internalisierung des Rezeptors (Greulich et al., 2005). Es gibt zwei Wege wie mit dem Rezeptor weiter verfahren wird: Er kann nach der Internalisierung zur Zellmembran zurücktransportiert werden oder er wird in den Lysosomen abgebaut (Calebiro et al.). Die Signalweitergabe von GPCRs kann auch durch Homo- oder Heterodimerisierung reguliert werden (Vischer et al., 2008).

1.4.3 Chemokinrezeptoren und Chemokine

Die zurzeit bekannten Chemokinrezeptoren sind 7 transmembrane Rezeptoren (7TM). Dazu zählen auch die GPCRs. Die Chemokinrezeptoren gehören zur Familie A, den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren (siehe Abschnitt 1.4) und sind vorwiegend an der Zelloberfläche von Leukozyten lokalisiert. Ihre Bindungseigenschaften für Chemokine reichen von eher unspezifisch bis hin zu sehr spezifisch. Chemokine sind von Zellen sezernierte Proteine, die zur Familie der Zytokine zählen und Chemotaxis auslösen können. Aus der Anzahl und Position der ersten konservierten Cysteinreste am N-Terminus leitet sich die systematische Nomenklatur der Chemokine ab. Drei Unterfamilien lassen sich so unterscheiden: Bei den CC-Chemokinen folgen die ersten beiden Cysteine direkt aufeinander, bei den CXC-Chemokinen sind sie durch eine Aminosäure, bei den CX3C-Chemokinen durch drei Aminosäuren voneinander getrennt. Chemokine und Chemokinrezeptoren sind wichtig für eine Reihe von vitalen Prozessen, z.B. die Angiogenese und die Immunantwort. Chemokinrezeptoren können aber auch unterstützend auf Infektionskrankheiten wirken (Streblov et al., 1999), als „entry“-Rezeptoren oder als viral kodierte Rezeptoren, die die Immunabwehr beeinträchtigen.

1.4.4 Durch Herpesviren kodierte GPCRs

Virale GPCRs (vGPCRs) werden von β - und γ -Herpesviren kodiert und sind basierend auf ihrer Sequenzhomologie in Familien unterteilt, (siehe Abbildung 6) (Paulsen et al., 2005; Rosenkilde et al., 2006b). Die klare Abgrenzung der einzelnen Familien spiegelt die evolutionäre Verwandtschaft der Viren wieder.

Eine Eigenschaft von vGPCRs ist ihre konstitutive Aktivität, dies trifft auch für die Rezeptoren US28 und ORF74 zu (Arvanitakis et al., 1997; Waldhoer et al., 2002). US28 kann die Untereinheiten $G\alpha_q$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_{12}$ aktivieren, was zur weiteren Aktivierung von Kinasen und Transkriptionsfaktoren führt. Nahezu die gleichen Signaltransduktionswege werden vom ORF74 über die Untereinheiten $G\alpha_q$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ aktiviert (Waldhoer et al., 2002; McLean et al., 2004). Weiterhin stimulieren beide Rezeptoren die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, inklusive des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) (Bais et al., 1998). Für den ORF74 konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptor ein potentiell Onkogen ist, mit der Eigenschaft, Zellen *in vivo* zu transformieren (Bais et al., 1998) und dem Kaposi's Sarkoma ähnliche Lesionen bei Mäusen auszulösen (Montaner et al., 2003). Auch der US28 Rezeptor weist ein onkogenes Potenzial auf. Der Rezeptor kann Zellen *in vivo* transformieren und induziert die Tumorgenese in Mäusen (Maussang et al., 2006).

1.4.5 BILF1 des Epstein-Barr Virus

Es konnte gezeigt werden, dass auch EBV einen vGPCR kodiert. BILF1 ist ein 50-kDa großes, glykosyliertes Protein und vorrangig an der äußeren Zellmembran lokalisiert. Der Rezeptor ist bis jetzt nicht als Chemokinrezeptor charakterisiert. Er ist folglich ein sogenannter „orphan“ Rezeptor (siehe Abschnitt 1.4). In verschiedenen EBV-positiven Zelltypen konnte BILF1-spezifische mRNA während der „immediate early“ und der „early“-Replikationsphase von EBV nachgewiesen werden (Beisser et al., 2005; Rosenkilde et al., 2006a). Auch in der latenten Phase konnte BILF1-mRNA in einem niedrigen Expressionslevel in EBV-positiven B-Zelllinien und in der Höhe wechselnden Expressionsleveln in einer Lymphoblastoidenzelllinie nachgewiesen werden (Beisser et al., 2005).

Kürzlich wurde das Transformationspotential von BILF1 beschrieben. BILF1 induziert die Transformation von NIH/3T3 Zellen *in vitro* und die Tumorentstehung in „nude mice“ *in vivo*. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass BILF1 ein Onkogen ist (Lyngaa et al., 2010).

Wie zuvor für US28 und den ORF74 beschrieben (siehe Abschnitt 1.4.4) wird auch BILF1 in hohen Mengen konstitutiv exprimiert (Paulsen et al., 2005). Im Gegensatz zu US28 und den ORF74 ist jedoch laut Literatur nur bekannt, dass BILF1 mit der $G\alpha_i$ -Untereinheit wechselwirkt (Paulsen et al., 2005). Zusätzlich zur Aktivierung der $G\alpha_i$ -Untereinheit konnte

gezeigt werden, dass BILF1 die NF- κ B vermittelte Transkription steigern kann. (Beisser et al., 2005).

Weiterhin konnte BILF1 eine weitere Funktion, unabhängig von der G-Protein-gekoppelten Signalweitergabe, zugeordnet werden. BILF1 interagiert auf direktem Wege mit MHC-I-Komplexen und steigert die Internalisierung und Degradation dieser Komplexe. Durch diesen Prozess können infizierte Zellen nicht von CD8⁺ T-Zellen der Immunabwehr erkannt werden (Zuo et al., 2009). Weiterhin ist der BILF1 Rezeptor in der Lage eine Heterodimerisierung mit verschiedenen endogenen Chemokinrezeptoren wie z.B. CCR9 und CXCR3 einzugehen (Vischer et al., 2008). Diese Bindung von BILF1 an diese Rezeptoren könnte die Signalweiterabeeigenschaften der Rezeptoren verändern. Die genaueren Zusammenhänge der Bindung von BILF1 an die zuvor genannten Rezeptoren sind bis jetzt noch nicht bekannt.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Entdeckung bisher unbekannter LCVs bei Primaten und deren Einteilung in drei verschiedene Primaten-Genogruppen hatte vor ca. zehn Jahren zu der Hypothese geführt, dass neben EBV, das sich in die Genogruppe I eingruppiert lässt, ein weiteres, zur Genogruppe II gehörendes humanes LCV existieren könnte. Im ersten Teil der Arbeit sollte diese Hypothese durch folgende Versuchsansätze überprüft werden. Zum einen sollte nach weiteren LCV der zweiten Genogruppe in Menschenaffen aber auch beim Menschen gesucht werden. Zum anderen sollten von LCVs Sequenzinformationen generiert werden, die mindestens eine Spanne von vier Genen (MDBP- bis DPOL-Gen) umfassen. Hiermit sollte die Qualität der phylogenetischen Analyse von LCVs verbessert werden und dies eine sicherere Interpretation der Evolution von LCV ermöglichen.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit sollten Eigenschaften von BILF1-homologen vGPCRs von LCVs nicht humaner Primaten untersucht werden. Der vGPCR von EBV, kodiert vom BILF1 Leserahmen signalisiert Liganden-unabhängig und ist konstitutiv aktiv. Diese funktionellen Merkmale waren mit der EBV-assoziierten Tumorgenese in Zusammenhang gebracht worden. Mit molekularbiologischen Methoden sollten vGPCRs von LCVs aus Menschenaffen identifiziert und funktionell im Vergleich zum BILF1-GPCR charakterisiert werden. Es sollte untersucht werden, ob LCV-GPCRs funktionell einheitlich sind oder ob Genogruppen-spezifische Unterschiede bestehen. Die Ergebnisse sollten zu einem besseren Verständnis des BILF1-GPCR und seiner Homologe in LCV von Menschenaffen führen und weitere Rückschlüsse auf eine mögliche funktionelle Beteiligung in LCV-assoziiierter Tumorgenese ermöglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

ABI PRISM™ Genetic Analyzer		Applied Biosystems, Foster City/USA
ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer		Applied Biosystems, Foster City/USA
Bakterienschüttler		New Brunswick Scientific, Edison/USA
Blotkammer		BIO-RAD, Hercules/USA
Brutschränke		Binder, Tuttlingen/D Heraeus/ D
Deckgläser		Roth, Karlsruhe, D
Feinwaage		Sartorius, Göttingen/D
Fotodokumentationssystem		Intas, Göttingen/D
Gefrierschränke	-80°C	Heraeus, Osterode/D Forma Scientific, Marietta/USA Liebherr, Biberach an der Riß/D
	-20°C	Bosch, Stuttgart/D
Gelelektrophoresekammer		Biometra, Göttingen/D
Glaswaren (Kolben, Bechergläser usw.)		Schott, Mainz/D
Konfokales Laser Scannig Mikroskop		Zeiss, Jena/D
Kühlschränke		Bosch, Stuttgart/D Liebherr, Biberach an der Riß/D
Laborzentrifuge		Sorvall, Newton/USA
Lichtmikroskope		Zeiss, Jena/D Nikon, Tokio/J
Magnetrührer		Jahnke & Kunkel, Staufen/D

Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer	Kühn & Bayer, Nidderau, D
Nikon TE 2000-E	Nikon, Melville/USA
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe/D
pH-Messgerät	Beckman, Palo Alto/USA
Pipettboy	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt/D
Pipetten	Gilson, Middleton/USA Eppendorf, Hamburg/D
Rocking Plattform	Biometra, Göttingen/D
Röntgenfilmentwickler	AGFA, Mortsel/B
Röntgenfilmkassetten	Rothhaar & Schroeder, Heidelberg/D
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen/D GibcoBRL, Gaithersburg/USA
SpeedVac	UniEquip GmbH, Martinsried/D
SPECTRAFLUOR Plus	TECAN/D
Thermoblock	BioSan, Warren, USA
Thermocycler	Biometra, Göttingen/D Applied Biosystems, Foster City/USA Eppendorf, Hamburg/D
Tischzentrifuge	Heraeus Instruments, Newtown/USA
Transilluminator	Rothhaar & Schröder, Heidelberg/D
UV-Handlampe	Novodirekt, Karlsruhe/D
Vortexer	Jahnke & Kunkel, Staufen/USA
Wasserbad	Haake, Karlsruhe/D GFL, Burgwedel/D Roth, Karlsruhe/D
Zellkulturflaschen	TPP, CH
Zellkulturplatten	TPP, CH
Zentrifugen	Heraeus, Osterode/D

	Ried im Innkreis/A
Zentrifugengefäße	Falcon, USA

3.1.2 Glaswaren

Bechergläser	Labor Brand, Gießen/D
Erlenmeyerkolben	Labor Brand, Gießen/D
Erlenmeyerkolben mit Schikane	Labor Brand, Gießen/D
Messzylinder	Labor Brand, Gießen/D
Pipetten	Labor Brand, Gießen/D

3.1.3 Kunststoffartikel

Cryogefäße		Nunc, Roskilde/DK
Deckgläschen 12 mm		Roth, Karlsruhe/D
Einweg-Zellkulturgefäße		Nunc, Roskilde/DK
PCR-Reaktionsgefäße	0,2 ml	Eppendorf, Hamburg/D Applied Biosystems, Foster City/USA
Reaktionsgefäße	0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht/D
	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg/D
	15 ml, 50 ml	Falcon, Oxnard/USA Greiner, Nürtingen/D
Zentrifugengefäße		DuPont NEN, Boston/USA
		Kontron Instruments, Whatford/GB
		Falcon, Oxnard/USA
6-Loch Zellkulturplatten		TPP, Trasadingen, CH
24-Loch Zellkulturplatten		TPP, Trasadingen, CH

96-Loch Mikrotiterplatten	Nunc, Roskilde/DK
96-Loch Zellkulturplatten (weiß)	PerkinElmer, Shelton/USA

3.1.4 Filterpapier und Membranen

Filterpapier	Whatman, Dassel/D
Immobilon PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach/D
Sterilfilter (0,2 und 0,45 µl)	Roth, Karlsruhe/D

3.1.5 Biochemikalien

Sofern nicht anders vermerkt entsprachen die Chemikalien dem Reinheitsgrad p.a. oder aber der höchsten verfügbaren Reinheitsstufe.

Acrylamid 30 % (Arylamid-Bisacrylamid 37,5:1)	Roth, Karlsruhe/D
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe/D
Albumin Fraktion V Protease frei (BSA)	Roth, Karlsruhe/D
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt/D
Ammoniumpersulfat (APS)	Bethesda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg/USA
Bidestilliertes Wasser (ddH ₂ O)	Fluka, Buchs/CH
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg/D
BSA	Roth, Karlsruhe/D
Chloroform/Isoamylalkohol	Appligene Oncor, Illkirch/F
Desoxyribonukleotide (dNTPs), (Expand High Fidelity PCR System)	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Dextranblau	Serva, Heidelberg/D
Dimethylformamid	Sigma, St. Louis/USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis/USA

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Invitrogen, Karlsruhe/D
Ethylendiamintetraacetylsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt/D
Ethanol	Merck, Darmstadt/D
Ethidiumbromid (EtBr)	Biomol, Hamburg/D
Formaldehyd	Merck, Darmstadt/D
Forskolin	Sigma, St. Louis/USA
Glycerin	Merck, Darmstadt/D
Glycin	Merck, Darmstadt/D
H ₂ O, RNase-, DNase-frei	Fluka, Buchs/CH
IPTG	Biomol, Hamburg/D
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D
β-Mercapthoethanol	Roth, Karlsruhe/D
Methanol	Merck, Darmstadt/D
N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bethseda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg/USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt/D
Pertussistoxin	Sigma Saint Luis/USA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Appligene, Illkirch/FR
Polyacrylamid Lösung 30% (29:1)	Roth, Karlsruhe/D
Poly-D-lysine Hydrobromide	Sigma Saint Luis/USA
Polyethylenglycol (PEG)	Fluka, Buchs/CH
Ponceau S	Sigma, St. Louis/USA
ReadyRed™ Chloroform: Isoamylalkohol (24 :1)	Appligene-Oncor, Heidelberg/D
RNase-freies bidestilliertes Wasser	Fluka AG, Buchs/CH
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt/D
Sukrose	Biomol, Hamburg/D
TEMED (Tetramethylendiamin)	Roth, Karlsruhe/D

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck-Schuchart, Hohenbrunn/D
TritonX-100	Sigma, St. Louis/USA
Tween 20	Roth, Karlsruhe/D
U73122 (1-[6-(((17 β)-3-Methoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione)	Merck, Darmstadt/D
X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Biomol, Hamburg/D

3.1.6 Enzyme und Marker

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Enzyme von der Firma New England Biolabs, Beverly/USA bezogen und in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen und Puffern verwendet.

AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Branchburg/USA
Benzonase (25 KU/ μ l)	EMD Biosciences, San Diego/USA
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D
High Fidelity Polymerase (3,5x10 ³ U/ml), (Expand High Fidelity PCR System)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D
Proteinase K (5 mg/ml)	Quiagen, Valencia/USA
<i>TaKaRa Ex TaqTM</i>	Takara Bio Inc., Gennevilliers/F
Trypsin (0.5 %)	Invitrogen, Karlsruhe/D

3.1.7 Proteinstandard

Precision Plus Protein TM Standards All Blue	BIO-RAD, Hercules/USA
---	-----------------------

3.1.8 Längenstandards

λ-DNA, BstEII Verdau (150ng/μl)	New England Biolabs, Beverly/USA
λ-DNA, HindIII Verdau (150 ng/μl)	New England Biolabs, Beverly/USA
100 bp DNA ladder	New England Biolabs, Beverly/USA

3.1.9 Antikörper

Primärantikörper

Anti-c-Myc; Kaninchen; 0,8 mg/ml	SIGMA, St. Louis, USA
Monoclonal Anti-HA Clone HA-7 FITC conjugate; Maus; 0,7 mg/ml	SIGMA, St. Louis, USA
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (1,5 mg/ml)	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
Ziege anti-Kaninchen IgG polyklonal (POD-konjugiert, 0,6 mg/ml)	Dianova, Hamburg/D

Sekundärantikörper

Cy TM 5-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L); 1,5 mg/ml	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
Rodamine Red TM -X-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
Ziege anti-Maus IgG polyklonal (POD-konjugiert, 0,8 mg/ml)	Dianova, Hamburg/D

3.1.10 Expressionsvektoren

pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe/D
-------------	-------------------------

pCMV-HA	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pCMV-myc	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pCR [®] 2.1-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe/D
pEGFP-F	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pGADT7	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France

3.1.11 Oligonukleotide und Primer

Die Namen und Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und Primer sind dem Anhang 12.1 zu entnehmen.

3.1.12 Zelllinien

Die in den Versuchen verwendeten Zelllinien sind adhärente Zelllinien.

<u>Zelllinie</u>	<u>Zelltyp</u>	<u>Verfügbarkeit</u> <u>Zell-Katalog-Nummer</u>
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	ATCC: CRL 1573
Cos-7	Nierenzellen der Grünen Meerkatze	ATCC: 60

3.1.13 Zellkulturmedien

FKS	Life Technologies, Paisley/USA
<u>D-MEM-Medium</u>	DMEM-Pulver für 10 l
	37 g NaHCO ₃
	ad 10 l; pH 7,2 (HCl)
	sterilfiltrieren

<u>OptiMEM I</u>		Gibco/UK
<u>Einfriermedium</u>	70 %	DMEM-Medium
3.1.13.1.1	20 %	FKS
3.1.13.1.2	10 %	DMSO
3.1.13.1.3		
<u>Trypsin EDTA</u>	0,25 %	Trypsin
3.1.13.1.4	3 mM	EDTA in PBS, pH7,2
<u>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline + Mg/Ca</u>		
	0.9 mM	MgCL ₂
	0.49 mM	CaCL ₂
<u>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline + T_{0.05}</u>		
	0.05%	Tween20
<u>Zellkulturmedien (zelltypspezifisch)</u>		
HEK-293; Cos7		DMEM-Medium 5 % FKS 1 % Penicillin G/Streptomycin 1 % Glutamin

3.1.14 Antibiotika

Ampicillin	Sigma, St. Louis/USA
Kanamycin	Sigma, St. Louis/USA
Penicillin-Streptomycin (100 x)	Invitrogen, Karlsruhe/D

3.1.15 Reagenziensätze

ABI PRISM Big Dye™ Terminator Cycle v 3.0 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Perkin Elmer), Foster City/USA
Dneasy Tissue Kit	Qiagen, Valencia/USA
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Madison/USA
Western Blotting Detection Reagent	Amersham, Buckinghamshire/UK
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden/D
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Invisorb® Spin DNA Extraction Kit	Invitek, Berlin/D
Lipofectamine 2000™	Invitrogen, Karlsruhe/D
NucleoBond® Xtra Maxi	Machery-Nagel, Düren/D
QIAprep Gel Extraction Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden/D
Steady ^{lite} Reporter Assay System	PerkinElmer, Shelton/USA
TaKaRa Ex Taq™ PCR Kit	TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
TNT® T7 Coupled Wheat Germ Extract System	Promega, Madison/USA
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe/D
Western Blotting Detection Reagent	Amersham, Buckinghamshire/UK
Z-competent <i>E. coli</i> Transformation and Buffer Set™	Zymo Research, Orange/USA

3.1.16 Puffer-und Gebrauchslösungen

Wenn hier nicht angeführt, entspricht die Zusammensetzung der jeweiligen Puffer und Lösungen den Angaben der Hersteller.

Material & Methoden

10 % APS	100	g/l	APS
X-Gal-Lösung	50	g/l	X-Gal inDMF
PBS nach Dulbecco	140	mM	NaCl
	10	mM	Na ₂ HPO ₄
	2	mM	KCl
	2	mM	KH ₂ PO ₄
			pH 7,2 (HCl)
3 M NaAc-Lösung	246,09	g/l	NaAc
TE-Puffer	10	mM	Tris
	0,1	mM	EDTA
			pH 8,3 (HCl)
Restriktions-/Ligationspuffer	50	mM	Tris
	150	mM	NaCl
	10	mM	MgCl ₂
	5	mM	DTT
	1	mM	EDTA
			pH 7,5 (HCl)
DNA-Probenpuffer	7	Teile	Sucrose (70 %) gelöst in H ₂ O
	5	Teile	Bromphenolblaulösung gesättigt
Laufpuffer	2x		TBE
	0,4	µg/ml	Ethidiumbromid

TBE-Puffer	45	mM	Tris-Borat
	1	mM	EDTA
			pH 8,3
Waschpuffer			PBS (pH 7,2)
	0,05	%	Tween 20
Blockpuffer			Waschpuffer
	5	%	Milchpulver
Transferpuffer	28	mM	Tris
	22	mM	Glycin
	0,1	%	SDS
	11	%	Methanol
			ad 1 l
Ponceau S-Färbelösung	0,1	%	Ponceau S
	1	%	BSA
Entfärbelösung	500	ml	Methanol (98 %)
	1400	ml	H ₂ O
	100	ml	Essigsäure (100 %)

3.1.17 Software

ABI PRISM™ DNA Sequencing Analysis	Applied Biosystems, Foster City/USA
BLASTN	National Center for Biotechnology

EndNote X1	Thomson ResearchSoft, Carlsbad/USA
FileMaker Pro 9.0	FileMaker Inc., Unterschleißheim/D
Freehand MX	Adobe Systems Inc., San Jose/USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc./USA
Lasergene DNA-Suite 6	DNASTAR, USA
MacVector™	MacVector, Inc., Oxford Molecular/UK
Nis Elements ER 2.3	NIKON INSTRUMENTS INC.
Photoshop	Adobe Systems Inc., San Jose/USA
PrimerPremier™	PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA

3.1.18 Biologisches Material

Menschliches Probenmaterial wurde freundlicher Weise von Priv.-Doz. Dr. M. Hummel, Campus Benjamin Franklin Abt. Allg. Pathologie, Berlin zur Verfügung gestellt.

Primaten Proben wurden freundlicher Weise von folgenden Personen erhalten:

Person	Institution	Herkunft (Ort/Land)
Dr. F. Leendertz	Robert Koch-Institut	Alt Tai Nationalpark/ Elfenbeinküste
Dr. K. Mätz-Rensing	Deutsches Primaten Zentrum (DPZ)	Göttingen/ Deutschland
Prof. Dr. C. Hammer	Institut für chirurgische Forschung Maximilians-Universität	München/ Deutschland
Dr. A. Ochs	Zoologischer Garten	Berlin/ Deutschland
Dr R. Dolcetti	Department of Pre-Clinical and Epidermiological Research	Aviano / Italien
Prof. Dr. K. Kreuzer	Klinik I für Innere Medizin Universität Köln	Köln/ Deutschland
Dr. C. Kücherer/ Dr. F. Leendertz	Robert Koch-Institut	Berlin/Deutschland
Prof. Dr. A. Bell	Department of cancer studies	Birmingham/ England
Prof. C. Schempp	Universitäts Hautklinik	Freiburg/ Deutschland

Außerdem wurde Material von der European Collection of Cell Cultures (ECACC) bezogen.

Für nähere Informationen über das Probenmaterial siehe Anhang 12.2.

3.1.19 Rekombinante Plasmide

Das rekombinante Plasmid pCDNA-HHV8 (siehe Anhang 12.3), die Reporterplasmide (CREB, NAFT und NF κ B) sowie das chimäre G-Protein (Gqi4myr) wurden freundlicher Weise von Prof. Dr. Mette Rosenkilde (Fachbereich für Pharmakologie, Panum Institut, Universität Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellt.

3.2 Methoden

3.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction) Techniken

3.2.1.1 Prinzip der DNA-Amplifikation durch die PCR

Die seit 1986 etablierte *in vitro*-Methode der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986) ermöglicht die enzymatische, exponentielle Amplifikation von DNA-Abschnitten. Unter Verwendung einer hitzestabilen Polymerase und den notwendigen Bausteinen für die DNA-Synthese läuft die Reaktion unter geeigneten Pufferbedingungen in drei unterschiedlichen Temperaturstufen ab, welche sich zyklisch wiederholen. Im ersten Schritt erfolgt eine Temperaturerhöhung auf über 90 °C um die DNA, die zu Beginn als komplexe, doppelsträngige Struktur vorliegt, in ihre Einzelstränge zu trennen. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung (Annealing) zweier sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) an die komplementären DNA-Stränge (Matrize). Im dritten Schritt wird die Reaktionstemperatur auf 72 °C erhöht was dem Aktivitätsoptimum der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerase entspricht. Diese katalysiert eine schnelle Verlängerung (Extension) der Primer und somit die Synthese des zur Matrize komplementären DNA Stranges (Elongation). Nach dem Elongationsschritt folgt wieder die Denaturierung. Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation wird eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Fragmentes erreicht, da jeder neu gebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren Stranges genutzt werden kann. Durch die Veränderung von Temperaturen, Zeiten und Anzahl der Zyklen im Reaktionsprotokoll ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten zur Optimierung des PCR Verlaufes.

3.2.1.2 Konventionelle PCR

Für eine Vielzahl von PCR-Reaktionen in denen Fragmente < 2 kb amplifiziert werden, wird die so genannte konventionelle PCR angewendet. Hierfür wurde standardmäßig das in Tabell 2 aufgeführte Protokoll verwendet.

Die Amplifikationsreaktion wurde, abhängig von der zu erwartenden Länge des Produkts, mit variierenden zyklischen Reaktions- und finalen Elongationszeiten unter den in den Tabellen 2 und 3 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 2: : Standard-PCR-Ansatz für die konventionelle PCR

Reagenz	Endkonzentration	Volumen
Template (x ng)	x ng	x µl
PCR-Gold-Puffer (10 x)	1 x	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	2,0 µl
3'-Primer (10 µM)	1 µM	2,5 µl
5'-Primer (10 µM)	1 µM	2,5 µl
dNTP (10 µM jeweils)	200 µM	0,5 µl
AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/µl)	1 U	0,2 µl
DMSO	2-5%	1 µl
H ₂ O		ad 25 µl

Tabelle 3: Standard-PCR Bedingungen für die konventionelle PCR

Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1x	95 °C	12 min	Aktivierung des Enzyms
45x	95 °C	30 sek	Denaturierung der DNA
	x °C	30 sek	Primeranlagerung
	72 °C	x sek	Elongation
1x	72 °C	x min	Finale Elongation
	4 °C	∞	Reaktionsstopp

Die Annealingtemperatur ist abhängig von den gewählten Primern. Sie liegt ca. 2 °C höher als die vom Hersteller für die Primer angegebene Schmelztemperatur.

3.2.1.3 Panherpes-Konsensus-PCR

Die Panherpes-Konsensus-PCR wurde, wie publiziert (Chmielewicz et al., 2001), durchgeführt. Die PCR stellt eine Modifikation der 1996 von Van Devanter etablierten PCR dar. Hierbei kommen degenerierte und inosinylierte Primer zum Einsatz, welche die Amplifikation zahlreicher Herpesviren aus verschiedenen Tierspezies ermöglichen.

Die Panherpes-Konsensus-PCR wurde i.d.R. nach dem in Tabelle 4 dargestellten Schema angesetzt.

Tabelle 4: Standard-PCR Ansatz für die Panherpes-Konsensus-PCR

Reagenz	Endkonzentration	Volumen
Template (x ng)	250 ng	x µl
PCR-Gold-Puffer (10x)	1x	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	2,0 µl
3'-Primer (10 µM)	1 µM	2,5 µl
5'-Primer (10 µM)	1 µM	2,5 µl
dNTP (10µM jeweils)	200 µM	0,5 µl
AmpliTaQ Gold Polymerase (5 U/µl)	2 U/Ansatz	0,4 µl
DMSO	2-5%	1 µl
H ₂ O		ad 25 µl

Das Besondere an der Panherpes-Konsensus-PCR liegt in der Wahl von degenerierten bzw. meist auch Desoxyinosin-substituierten Primern. Die Bindung der Primer erfolgt in hochkonservierten Sequenzabschnitten der zu untersuchenden Gene um möglichst Fehlbasenbindungen der Primer im 3'-Bereich zu vermeiden. Die einzelnen Primersequenzen sind von einem Vertreter der *Herpesviridae* oder einer der gesuchten Subfamilien, in dieser Arbeit speziell die der *γ-Herpesvirinae* (mit möglicher zusätzlicher Spezifizierung für eine bestimmte Wirtsgattung), abgeleitet. Im Bereich der ersten zehn bis zwölf Nukleotide des 3'-Endes befinden sich mehrere sich wiederholende Blöcke aus je zwei konservierten Nukleotiden. Innerhalb dieser Blöcke liegt in der Regel nur ein nicht konserviertes Nukleotid, welches der 'wobble'-Position nach dem Prinzip des degenerierten Codes entspricht. Die 'wobble'-Positionen sind degeneriert und/oder mit Desoxyinosin substituiert. Dadurch wird an dieser Position eine Fehlbasenbindung vermieden, anders als am 5'-Ende wo es auch bei herkömmlichen Primern zu einer Loopausbildung in diesem Bereich kommen kann. Deshalb entspricht das 5'-Ende der ursprünglichen Sequenz. Aus dieser Primerbeschaffenheit ergeben sich sehr hohe Degenerationsfaktoren, welche in Kombination mit einer Annealingtemperatur von 46°C ein breites Spektrum an Hybridisierungsmöglichkeiten bieten. Die verschiedenen Primersets sind im Anhang 12.1 aufgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die Panherpes-Konsensus-PCR, welche im weiteren Verlauf als Standard- Panherpes Protokoll deklariert wird sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Standard-PCR Bedingungen für die Panherpes-Konsensus-PCR

Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1x	94 °C	12 min	Aktivierung es Enzyms
40x	94 °C	30 sek.	Denaturierung der DNA
	46 °C	30 sek.	Primeranlagerung
	72 °C	60 sek.	Elongation
1x	72 °C	10 min	Finale Elongation
	4 °C	∞	Reaktionsstopp

Eine abgeänderte Version der Panherpes-Konsensus-PCR (Nezlisah Yasmun, Diplomarbeit, siehe auch Literaturverzeichnis) wurde in einigen Fällen hinsichtlich des Nachweisspektrums und der Sensitivität durchgeführt. Die wesentliche Veränderung besteht in einer verzögerten Aktivierung der Hot-Start-AmpliTaqGold-Polymerase, welche durch die Verkürzung des initialen Aktivierungsschrittes von 12 min auf 2 min erlangt wurde. Die vollständige Aktivierung erfolgt während der darauf folgenden Denaturierungsschritte. Zur Kompensierung der anfänglichen verminderten Aktivität des Enzyms wird die Zykluszahl von 40 auf 50 erhöht. Außerdem wurde die `ramp-time`, also die Geschwindigkeit des Temperaturwechsels zwischen dem Annealing- und dem Elongationsschritt, von 5°C/sec auf 0,09°C/sek verringert, was die Primerbindung durch die verstärkte Toleranz für Falschpaarungen fördert. Die Reaktionsbedingungen (Tabelle 6) dieser PCR sind im weiteren Verlauf als „modifiziertes Panherpes-Konsensus-PCR-Protokoll“ bezeichnet.

Tabelle 6: Modifizierte PCR-Bedingungen für die Panherpes-Konsensus-PCR

Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1x	94°C	2 min	teilweise Aktivierung des Enzyms
40 Zyklen	94°C	30 sek.	Denaturierung der DNA/weitere Aktivierung des Enzyms
	46 °C	30 sek.*	Primeranlagerung
	72 °C	60 sek.	Elongation
1x	72 °C	10 min	finale Elongation
	4 °C	∞	Reaktionsstopp

Die Panherpes-Konsensus-PCR wurde als „nested“ oder „semi-nested“ PCR durchgeführt, d.h. es werden zwei PCR-Läufe nacheinander durchgeführt, wobei die Produkte der ersten Runde als Template für die zweite Runde verwendet werden. Bei einer „semi-nested“ PCR wird ein Primer aus der ersten Runde mit einem Primer aus der zweiten Runde kombiniert. Unspezifische Produkte der ersten Runde werden in der Regel bei der ‘nested‘ oder ‘semi-nested‘ PCR nicht mitamplifiziert.

3.2.1.4 Long-Distance-PCR

Fragmente mit einer Länge von mehr als 2 kb wurden mit dem Kit „TaKaRa-Ex-Taq“ amplifiziert. Es wurde nach dem Protokoll der Hersteller verfahren. Die Polymerase dieses Systems besitzt die Korrekturlese-Aktivität der 5'-3'Exonuklease, wodurch eine nahezu fehlerfreie Amplifikation von Long-Distance-PCR-Produkten gewährleistet ist. Es wurde eine Extensionsrate von 1 kb/min für die TaKaRa-Ex-Polymerase gewählt. Tabelle 7 zeigt die verwendeten Reaktionsbedingungen:

Tabelle 7 : Standard-PCR-Bedingungen für die Long-Distance-PCR

Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1x	94 °C	5min	Aktivierung es Enzyms
15	98 °C	20 sek.	Denaturierung der DNA
	x °C 70 °C	30 sek. x min	Primeranlagerung Elongation
15	98 °C	20 sek.	Denaturierung der DNA
	x °C 70 °C	30 sek. x min* ¹	Primeranlagerung Elongation
1x	72 °C	10 min	Finale Elongation
	4 °C	∞	Reaktionsstopp

*¹ Zeitanstieg pro Zyklus um 5 °C

3.2.1.5 Long-Distance-PCR mit *Touch up* Modifikation

Trat bei der Amplifikation von Long-Distance-Produkten keine saubere Bande in der Gelelektrophoreseanalyse auf, wurde eine sogenannte *Touch up* PCR durchgeführt. Durch die kontinuierliche Erhöhung der Annealing-Temperatur pro Zyklus, ausgehend von einem geringen Temperaturniveau, wird das Temperaturoptimum für die Primeranlagerung bei der „*Touch up*“ PCR erreicht. Diese Modifikation der Long-Distance-PCR wurde nur in der ersten Runde der „nested“ PCR angewendet. Tabelle 8 zeigt die modifizierten Reaktionsbedingungen.

Tabelle 8 : Modifizierte Long-Distance-PCR

Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1x	94 °C	5min	Aktivierung des Enzyms
15 Zyklen	98 °C	20 sek.	Denaturierung der DNA
	53 °C * ¹ 70 °C	30 sek. x min	Primeranlagerung Elongation
15 Zyklen	98 °C	20 sek.	Denaturierung der DNA
	53 °C* ¹ 70 °C	30 sek. x min * ²	Primeranlagerung Elongation
1x	72 °C	10 min	Finale Elongation
	4 °C	∞	Reaktionsstopp

*¹ Temperaturanstieg/ Zyklus 0,3 °C
*² Zeitanstieg/ Zyklus 5 s

In der zweiten Runde wurde das Standard Long-Distance-PCR Protokoll verwendet (siehe Abschnitt 3.2.1.4)

3.2.1.6 Expand High Fidelity PCR-System

Für die Amplifikation genetischer Bereiche wurde ein Enzymgemisch aus hitzestabiler Taq-DNA-Polymerase und einer Tgo-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität verwendet. Die Reaktionsbedingungen der PCR wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (Roche) angewendet (siehe Tabellen 9 und 10).

Tabelle 9: Expand High Fidelity PCR Ansatz 1

Reagenz	Endkonzentration	Volumen
Template (x ng)	10-250 ng	x µl
3'-Primer (10 µM)	1 µM	3 µl
5'-Primer (10 µM)	1 µM	3 µl
dNTP (10µM jeweils)	0,4 µM	1 µl
H ₂ O		ad 50 µl

Tabelle 10: Expand High Fidelity PCR Ansatz 2

Reagenz	Endkonzentration	Volumen
Expand HiFi Reaction Buffer II (5x)	1x	10 µl
Expand HiFi ^{Plus} Enzyme Blend (5 U/ µl)	2,6 U/ Ansatz	0,75 µl
H ₂ O		ad 50 µl

Das Temperaturprofil sowie die Reaktionszeiten innerhalb des PCR-Zyklus wurden in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur (T_m -Wert) der eingesetzten Primer und der Länge der zu amplifizierenden DNA gewählt (Tabelle 11). Außerdem wurde der sense-Primer modifiziert, so dass am 5'-Ende des Gens eine SfiI-Schnittstelle vorliegt während der antisense-Primer am 5'-Ende des Gegenstrangs eine XhoI-Schnittstelle aufweist, um so die spätere Ligation des PCR-Produkts in einen Vektor zu ermöglichen.

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen der Expand High Fidelity PCR

Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1 x	94 °C	3 min	Aktivierung des Enzyms
35 x	94 °C	30 sek.	Denaturierung der DNA
	x °C	30 sek.	Primeranlagerung
	72 °C	60 sek.	Elongation
1 x	72 °C	7 min	Finale Elongation
	4 °C	∞	Reaktionsstopp

Um die Größe der amplifizierten PCR-Produkte zu kontrollieren, wurden diese im Anschluss in der Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.5) aufgetrennt. Nach der Aufreinigung wurden die DNA-Fragmente in die Restriktionsanalyse (siehe Abschnitt 3.2.2.1) eingesetzt.

3.2.1.7 **Locked Nucleic Acids (LNAs)**

LNAs sind Oligonukleotide, die ein oder mehrere LNA-Monomere [2'-O,4'-C-methylene- β -D-ribofuranosyl] enthalten. Die Modifikation des LNA-Nukleotids besteht in einer Methylenbrücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und dem 4'-Kohlenstoff der Ribose. Oligomere weisen mit inkorporierter LNA eine wesentlich höhere Hybridisierungsaffinität als normale DNA/DNA-Hybride auf, weil ein LNA-haltiger Doppelstrang wesentlich langsamer dissoziiert als das entsprechende dsDNA-Molekül. Das 3'-Ende der LNA wurde hier mit einer Aminogruppe (NH_2) versehen, um die Verlängerung des DNA-Stranges durch die Polymerase zu blockieren. Mit dieser Modifikation wurden LNA-Oligonukleotide als spezifische Inhibitoren der Amplifikation viraler DNA während der PCR eingesetzt. Die LNAs wurden i.d.R. mit einer Endkonzentration von 1 μM zusätzlich zu den beschriebenen Reaktionskomponenten in der PCR-Reaktion eingesetzt.

3.2.2 **DNA-Rekombinationstechniken**

3.2.2.1 **Restriktionsanalyse**

Die Methode der Restriktionsanalyse wird zur Charakterisierung doppelsträngiger DNA eingesetzt. Grundlagen der Analyse sind aus Bakterien gewonnenen Restriktionsendonukleasen, die fremde DNA, z.B. Phagen-DNA, erkennen und durch die Spaltung von Phosphordiesterbindungen restringieren. Die Wirts-DNA in den jeweiligen Bakterien wird dabei aber durch sequenzspezifische Methylierung vor dem Abbau geschützt. Restriktionsendonukleasen können an spezifischen Erkennungsstellen auf der DNA doppelsträngige DNA hydrolytisch spalten, unterscheiden sich aber in ihren Ursprungsorganismen, ihrer Erkennungssequenz und der Spaltstelle. Anhand ihres Aufbaus werden die Restriktionsenzyme in drei Kategorien eingeteilt: Typ I, Typ II, und Typ III.

Typ I und III der Restriktionsenzyme vereinen die Funktionen der Endonuklease und Methylase, während Typ II ausschließlich doppelsträngige DNA restringiert. Letztere spalten an spezifischen Erkennungssequenzen, die aus 4-7 bp bestehen und palindromisch sind. Bei der Restriktionanalyse können in Abhängigkeit von dem Enzym Spaltstellen mit glatten Enden (*blunt*) oder mit überhängenden Enden (*sticky*) entstehen.

Es wurde jeweils die Menge an Enzym eingesetzt, die 1 µg DNA bei optimierter Temperatur in einer Stunde schneidet.

3.2.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligation bedeutet die kovalente Verknüpfung von Nukleinsäure-Fragmenten miteinander. Für die Ligation benötigt man das Enzym Ligase aus dem Bakteriophagen T4, das in der Lage ist, unter ATP-Verbrauch doppelsträngige DNA zu ligieren. Es katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxy-Gruppe des einen Fragments und der 5'-Phosphatgruppe des anderen Fragments. Dabei müssen die zu ligierenden Fragmente entweder *blunt ends* oder kompatible *sticky ends* aufweisen. Letzteres ermöglicht eine gerichtete Ligation, da die *sticky ends* nur in der gewünschten Orientierung zueinander kompatibel sind. Für eine effiziente Ligation der DNA-Fragmente werden diese im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 eingesetzt. Wurde ein kleines DNA-Fragment in einen Vektor ligiert, wurde das Insert in dreifünffacher Molarität eingesetzt. Für den Ligationsansatz wurde ein Volumen von 1:10 T4-DNA-Ligase Puffer und 100 U/ml T4 DNA-Ligase verwendet. Die Reaktion wurde 0,5 bis 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Effizienz der Ligation zu überprüfen, wurde ein Aliquot des Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.5.1) aufgetrennt.

3.2.2.3 Topo TA Cloning

Für diese Art der Klonierung wurde das „TOPO TA Cloning Kit“ benutzt. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Anhängung eines zusätzlichen, templateunabhängigen Adenosins am 3'-Ende des neu synthetisierten Stranges durch eine Taq-Polymerase. Der Vektor pCR.2.1-TOPO besitzt für die Ligation ein komplementäres, überhängendes Thymidin (Marchuk et al., 1991). Eine weitere Besonderheit dieses Systems stellt eine an den offenen pCR.2.1-TOPO-

Vektor gekoppelte Topoisomerase I dar. Topoisomerasen führen zur Relaxation der DNA wobei sie Phosphodiesterbindungen spalten und dabei eine kovalente Bindung mit der DNA ausbilden. Folgendes Pipettierschema wurde für die Ligation verwendet:

TOPO TA Cloning	
PCR-Amplifikat	4 µl
Salt Solution	3 µl
TOPO Vektor	1 µl

3.2.3 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente nach PCR oder Restriktionsanalyse in weiteren Klonierungsschritten einsetzen zu können, mussten diese von anderen Nukleinsäuren, Proteinen und Salzen, welche nachfolgende Analysen negativ beeinflussen können, abgetrennt werden.

Zur Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das „Invisorb® Spin DNA Extraktion Kit“ (Invitek) eingesetzt. Die Vorgehensweise entsprach dem Standardprotokoll des Herstellers. Die DNA wurde in 20 µl- 40 µl Elutionspuffer oder dH₂O eluiert.

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten im Anschluss an die PCR erfolgte über den „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Mit dem „DNeasy Tissue Kit“ von Qiagen erfolgte die DNA-Extraktion aus Gewebematerial, gemäß den Angaben des Herstellers. Der initiale Proteinase K-Verdau in ATL-Puffer wurde über Nacht durchgeführt und die DNA im finalen Schritt mit dH₂O eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Lagerung erfolgte anschließend bei -20°C.

3.2.4 Transformation rekombinanter Plasmide

Rekombinante DNA lässt sich einfach und effizient unter Einsatz von Vektoren in verschiedenen Bakterienstämmen vermehren. Als Bakterienstämme wurden DH5α- und Top 10 Zellen verwendet

3.2.4.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Voraussetzung für die Aufnahme von DNA und deren Vermehrung sind kompetente Bakterienzellen, wobei die Transformationseffizienz entscheidend vom Kompetenzgrad der Rezipienten abhängig ist. Für die Präparation kompetenter Bakterienzellen wurden 50 ml SOB-Medium mit 200 μ l einer E. coli-Übertagkultur in einen 500 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und über Nacht bei 25 °C und 200 UpM auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte OD₅₈₈ von 0,4 - 0,6 wurden die DH5 α -Zellen für 10 min auf Eis gekühlt und für 6 min bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert. Um die notwendigen Pufferbedingungen einzustellen, wurde das Z-competente E. coli Buffer Set verwendet (Zymo Research, USA). Die Bakterien-Pellets wurden in jeweils 5 ml eisgekühlten Waschpuffer (1x) resuspendiert und erneut zentrifugiert (s.o.). Nach der Resuspendierung des Pellets in 5 ml eisgekühlten Kompetentpuffer (1x) wurden die Zellen zu jeweils 100 μ l in vorgekühlte Eppendorfgläser aliquotiert und bei -70°C gelagert.

3.2.4.2 Transformation von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden

Voraussetzung für eine Vermehrung von klonierten DNA-Fragmenten ist der Einsatz von Plasmiden, die sich episomal in Bakterien vervielfachen können und die über eine Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker verfügen. In Abhängigkeit von dem gewählten Vektor ist eine Selektion der insert-tragenden Plasmide auch über Blau-Weiß-Screening möglich. Eine im β -Galaktosidase (α -Fragment) Gen vorhandene Multiple Klonierungsstelle (MCS) ermöglicht die Integration zu klonierender DNA-Fragmente. Das Enzym β -Galaktosidase hydrolysiert X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl, welches durch den Sauerstoff der Luft zum tiefblauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo-Farbstoff oxidiert. Durch die Insertion eines DNA Fragments wird das β -Galaktosidase-Gen unterbrochen. Dadurch wird die Expression der Enzymaktivität verhindert und Transformanten mit Insert sind als weiße Klone zu erkennen. Die Transformation von kompetenten Bakterienzellen (DH5 α) erfolgte in einem Volumen von 50 μ l oder 100 μ l. Von der zu transformierenden DNA wurden, abhängig von der Konzentration, 1 μ l – 5 μ l zu den kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis wurden geeignete Mengen des Transformationsansatzes auf LB-Selektionsmedium (100 μ g/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei

37 °C inkubiert. Top 10 Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des TOPO TA cloning Ligationsansatzes versetzt (siehe Abschnitt 3.2.2.2). Es folgte ein vorsichtiges Mischen und eine Inkubation für 20 min auf Eis. Durch einen anschließenden Hitzeschock bei 42 °C für 30 s wurde die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien ermöglicht. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium und einer weiteren Inkubation für eine Stunde bei 37 °C wurden die Transformationsansätze, wie zuvor für die DH5α-Zellen beschrieben, ausplattiert. Auf die Platten wurde zuvor 50 µl X-Gal (40 µg/µl) ausplattiert und diese für 20 min im Brutschrank bei 37 °C präinkubiert.

3.2.4.3 **Isolierung von Plasmid-DNA**

In Abhängigkeit von der gewünschten Reinheit der zu erhaltenen DNA wurde eine der in den folgenden Abschnitten beschriebenen Aufreinigungsmethoden gewählt.

3.2.4.4 **Bakterielle Vermehrung in Flüssigkultur für die nachfolgende Aufreinigung**

5 ml LB-Flüssigmedium wurden mit Bakterien einer Kolonie inokuliert. Das LB-Flüssigmedium enthielt ein geeignetes Antibiotikum für die Selektion des rekombinanten Plasmids. Die Inkubation der Kulturen erfolgte schüttelnd über Nacht bei 37 °C. Die Kulturen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 11000 rpm für 10 min in einer Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden für eine spätere Aufarbeitung der Nukleinsäure bei -20 °C eingefroren.

3.2.4.5 **DNA-Präparation durch Ethanolfällung**

Die verwendeten Puffer P1 - N3 stammen aus dem QIAprep®Miniprep-Kit“. Nach der Vermehrung in Flüssigkultur wurden die pelletierten Zellen zunächst in 100 µl Puffer 1 resuspendiert und anschließend mit 100 µl Puffer 2 versetzt, der SDS und NaOH enthält. Durch SDS kommt es zur Lyse der Zellen und somit zur Freisetzung der DNA als auch zur Denaturierung der Proteine. Zusätzlich wird NaOH für die Denaturierung sowohl

chromosomaler und Plasmid DNA benötigt. Nach einer Zugabe von 250 µl Neutralisierungspuffer N3 wurden denaturierte Proteine, Zelltrümmer und chromosomale DNA als Salz-Detergenz-Komplexe durch einen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 13000 rpm präzipitiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 1 ml abs. Ethanol versetzt (p.a.) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das DNA-Pellet einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, um einen Teil der Salzkontamination zu entfernen. Nach einer abschließenden Zentrifugation wurde die DNA in der SpeedVac getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert.

3.2.4.6 Plasmid-DNA Präparation (kleiner Maßstab)

Die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde mit dem „*QIAprep®Miniprep-Kit*“ der Firma Qiagen durchgeführt. Nach einem initialen Zentrifugationsschritt der Überstand abgenommen und nach der Zellyse und Neutralisation auf die QIAprep Säulen pipettiert. Durch einen Zentrifugationsschritt wird die Plasmid-DNA an die Membran gebunden, während RNA, zelluläre Proteine und Metaboliten ungebunden vorliegen. Durch zwei aufeinanderfolgende Waschschrte mit dem ethanolhaltigen Puffer PE wurde die DNA auf der Membran von anhaftenden Salzen befreit und nachfolgend mit 50 µl ddH₂O eluiert. Ethanolreste, die folgende Versuchsschritte inhibieren könnten, wurde durch eine fünfminütige Vakuumbehandlung entfernt.

3.2.4.7 Plasmid-DNA-Präparation (großer Maßstab)

Für die Aufreinigung von größeren Plasmidmengen wurde das „NucleoBond® Xtra Maxi Kit“ von Machery und Nagel verwendet. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

3.2.4.8 **Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Absorptionsspektrometrie**

Für die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Aus dem Verhältnis der OD_{260} und OD_{280} erhält man eine Aussage über Proteinverunreinigungen innerhalb der Probe. Als optimaler Wert gilt ein Quotient von 1,8 für DNA-Lösungen.

Die Konzentrationsbestimmungen wurden am NanoDrop® ND 1000 Spectrophotometer durchgeführt. Bei diesem Gerät werden 2 µl der Probe durch Oberflächenspannung in einer Glasfaseroptik gehalten und photometrisch vermessen. Mit Hilfe der zugehörigen Software wird anhand einer vorhergehenden Null-Kalibrierung mit dem Elutionsmittel die DNA-Konzentration in ng/µl berechnet und einen Wert für den Quotienten OD_{260}/OD_{280} zur Abschätzung der Reinheit angegeben.

3.2.4.9 **Sequenzierung von Nukleinsäuren**

Die DNA-Sequenzierung ermöglicht die Bestimmung der Nukleotidabfolge innerhalb eines DNA-Moleküls. Das angewandte Verfahren beruht auf einer modifizierten Version der Didesoxymethode (Sanger et al., 1974). Das Prinzip der Methode ist die enzymatische Synthese von DNA Strängen, welche zu dem zu sequenzierenden Strang komplementär sind. Der Sequenzierungsansatz enthält neben dem Sequenzierungsprimer und den vier ddNTPs auch 2'-3'-disoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs). Diese werden auch Terminatoren genannt und ihnen fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom. Da in der Folge keine Phosphordiester-Bindung zwischen dem neu hinzukommenden Nukleotid und dem Ende des wachsenden Stranges geknüpft werden kann, kommt es zum Abbruch der Reaktion.

Für die Sequenzierung wurde das „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Ready Reaction Kit“ verwendet. Aufgrund der unterschiedlich markierten ddNTPs kann der Ansatz der Sequenzierungsreaktion in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Die Analyse erfolgte abschließend in der Kapillarelektrophorese. Das Pipettierschema für einen Sequenzierungsansatz ist Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12 : Pipettierschema für einen Sequenzierungsansatz

Reagenz	Volumen
Template (1-300 ng)	x µl
5 x Puffer	1,5 µl
Primer (sense, bzw. antisense 10µM)	0,5 µl
BigDye	1 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Die Menge der eingesetzten DNA war proportional zur Größe des Templats. Die Sequenzierungs-PCR erfolgte unter nachstehenden Bedingungen im computergesteuerten Thermostaten (siehe Tabelle 13):

Tabelle 13: Cycler-Setup für die Sequenzierungs-PCR

Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1x	90°C	2,5 min	Initiale Denaturierung
25x	96°C	10 sek	Denaturierung der DNA
	x °C	5 sek	Primeranlagerung
	60 °C	5 sek	Elongation
1x	60 °C	4 min	Finale Elongation
	4 °C	∞	Reaktionsstopp

Die Sequenzierung erfolgte als Serviceleistung des Sequenzierlabors des Robert Koch-Instituts am ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyser. Das vom Sequenzierlabor bereitgestellte Ergebnis konnte mit Hilfe verschiedener Computerprogramme ausgewertet werden.

3.2.5 Elektrophorese

Die Elektrophorese ist eine Methode, um Proteine oder Nukleinsäuren nach ihrer Größe, Konformation und Ladung aufzutrennen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in einem Trägermaterial. Die Wahl des Trägermaterials hängt von der Größe und der Art der zu analysierenden Substanz ab.

3.2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur größenabhängigen Auftrennung von Nukleinsäuren. Das Laufverhalten der Nukleinsäuremoleküle im Gel hängt nicht nur von ihrer absoluten Masse sondern auch von ihrer Form ab: superhelikal, doppelsträngig linear oder einzelsträngig. Zum anderen sind Agarosekonzentrationen, die angelegte Spannung und die Art des Laufpuffers für das Laufverhalten der DNA im Agarosegel ausschlaggebend. Zur Färbung wurden Ethidiumbromid (EtBr) und Gel RedTM verwendet. Als Laufpuffer diente 2 x TBE-Puffer, dem bereits EtBr in einer Konzentration von 4 µg/ml zugesetzt wurde. GelRedTM wurde 1 : 20000 im Gel verdünnt. Je nach der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente wurden Gele mit Agarosekonzentrationen zwischen 0,7 % (w/v) und 2 % verwendet. Die Elektrophorese wurden horizontal bei einer konstanten Spannung von 70 Volt in einer „X-cell sure lock“ Kammer der Firma Invitrogen durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die zu untersuchenden Proben mit einem 1/5 Volumen DNA-Ladungspuffer gemischt.

3.2.5.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht die Trennung von Proteinen und anderen Makromolekülen im elektrischen Feld. SDS (engl. Abkürzung für Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt durch Bindung an Proteine die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Die SDS-Protein-Micellen wandern aufgrund ihrer Ladung während der Elektrophorese zur Anode. Das Gel ist hierfür in zwei Bereiche unterteilt: das weitporige Sammelgel und das engporige Trenngel. Für die SDS-Page wurde das Tris-Chlorid/Tris-Glycin-System verwendet (Laemmli et al., 1970). Das Trenngel hat einen pH Wert von 8,8, das Sammelgel hingegen einen pH-Wert von 6,8. Der pH Wert des Sammelgels liegt nahe dem isoelektrischen Punkt des Glycins, welches im Laufpuffer vorhanden ist. Dadurch hat Glycin im Sammelgel eine geringe elektrische Mobilität und dient als sogenanntes Folge-Ion. Die Chlorid-Ionen, die in den Gelpuffern vorhanden sind, haben im Sammelgel eine hohe Mobilität und dienen als Leit-Ionen. Die Mobilitäten der Proteine liegen zwischen denen der Leit- und Folge-Ionen im Sammelgel. Die Proteine bilden während der Elektrophorese im Sammelgel einen Stapel in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten aus. Die Proteine mit der höchsten Mobilität wandern direkt hinter dem Leition, die mit der

schwächsten Mobilität werden vor dem Folge-Ion her geschoben. Infolge der Molekularsiebeigenschaften des Gels sind die Beweglichkeiten dem \log_{10} der relativen Molekularmassen (M_r) umgekehrt proportional. Lässt man Eichproteine mitlaufen, so kann man die M_r der unbekanntenen Proteine bestimmen. Im eingesetzten Molekulargewichtsmarker (Precision Plus Protein™ Standards) sind Proteine von 250 kDa bis 10 kDa enthalten. Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden 10 μ l des *in vitro* Expressionsansatzes mit 10 μ l Probenpuffer versetzt, gemischt und für 2 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die zu analysierenden, vorbereiteten Proben bzw. 5 μ l des Molekulargewichtsmarkers in die verschiedenen Geltaschen pipettiert, bevor die elektrophoretische Auftrennung in einer Mighty Small-Gelkammer (Hoefer Scientific Instrument, San Francisco/USA) durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 15 mA pro Gel gestartet wurde. Tabelle 14 enthält des Pipettierschema für insgesamt vier Sammel- und Trenngele.

Tabelle 14: SDS Gele

Denaturierendes Gel	
Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
7,50 ml Trenngelpuffer	2,50 ml Sammelgelpuffer
10,00 ml Acrylamid (30%)	3,30 ml Acrylamid
11,90 ml ddH ₂ O	13,70 ml ddH ₂ O
0,30 ml SDS (10%)	0,20 ml SDS (10%)
0,12 ml APS (10%)	0,12 ml APS
0,04 ml TEMED	0,04 ml TEMED

3.2.6 Immuno-/Western Blot

Der Westernblot bezeichnet den Kapillartransfer bzw. Elektrotransfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem Gel auf eine geeignete Träger-Membran. Durch die Immobilisierung auf der Membran können verschiedene Färbe-, Analyse- und Nachweismethoden durchgeführt werden, die im Gel nicht möglich sind.

In dieser Arbeit wurde eine Polyvinylfluorid-Membran verwendet. Aufgrund der Hydrophobizität der Membran wurde sie kurz mit Methanol befeuchtet, mit ddH₂O gewaschen und zusammen mit den Filterpapieren und dem Gel in Transferpuffer äquilibriert. Es wurde ein

Semidry-Blot durchgeführt. Die Apparatur besteht aus zwei Plattenelektroden, zwischen denen der Blot aus Filterpapier, Gel und Membran horizontal eingebettet wird. Die in Transferpuffer getränkten Blotbestandteile werden auf der Anode angeordnet, so dass die Proteine beim Anlegen einer Spannung vom Gel auf die Membran in Richtung Anode wandern können und dort haften bleiben. Der Semidry-Blot wurde bei konstanter Stromstärke durchgeführt (2 mA pro cm²) für 45 min bei Raumtemperatur.

3.2.6.1 Deglykosylierung

Um den Glykosylierungsgrad von Proteinen zu überprüfen, wurde nach der zellulären Expression der Proteine ein Verdau mit dem Enzym PNGase F durchgeführt. PNGase F (N-Glykosidase F) ist eine Amidase und hydrolysiert fast alle Typen von N-Glykan-Ketten. Das Enzym schneidet zwischen dem innersten N-Acetylglukosamin der Oligosaccharidkette und dem Asparagin des Proteins. N-glykosylierte Proteine weisen nach der Deglykosylierung durch PNGase F ein geringeres Molekulargewicht auf als Proteine ohne PNGase F Verdau. 293-Graham-Zellen wurden in 6-Loch-Plattchen ausgesät und für 24 h bei 37°C inkubiert. Es folgte die Transfektion (Abschnitt 3.2.8.1) mit der Plasmid-DNA. Nach 24 Stunden wurde der Zellrasen zweimal mit 1 mL PBS gewaschen. Für die Zellyse wurden die Zellen in 200 µl Denaturierungspuffer aufgenommen. Die Ansätze wurden bei 100°C für 10 min denaturiert. Es folgte der enzymatische Verdau für zwei Stunden bei 37°C nach folgendem Pipettierschema (Tabelle 15):

Tabelle 15: Pipettierschema für den Verdau mit PNGase F

Reagenz	Volumen
Zellysat	15 µl
G 7-Puffer	2 µl
NP-40	2 µl
PGNase F	1 µl

Die elektrophoretische Auftrennung der mit PNGase F behandelten und nicht behandelten Proteine erfolgte wie für die SDS-Page beschrieben (Abschnitt 3.2.5.2).

3.2.6.2 *In vitro* Proteinexpression

Proteine können als Modifikation N- und O Glykan Ketten aufweisen. Bei der Behandlung mit PGNase F können nur N-Glykan Ketten abgebaut werden. Bei der *in vitro* Expression mit dem „TNT[®] T7 Coupled Wheat Germ Extract System“ (Promega) werden die Proteine ohne Modifikationen synthetisiert. Diese Methode eignet sich für eine genauere Bestimmung des Molekulargewichts. Voraussetzung dafür ist, dass die zu exprimierenden Gene unter Kontrolle des T3-, T7- oder SP6-Promotors stehen. Als Matrize für die Expression wurden linearisierte Plasmide verwendet. Es wurde folgendermaßen auf Eis pipettiert (Tabelle 16):

Tabelle 16: Pipettierschema für die *in vitro* Expression

Reagenz	Volumen
Weizenkeimextrakt	25 µl
Puffer (im Kit enthalten)	2 µl
Aminosäuremix ohne Methionin bzw. Leucin	0,5 µl
RNAse Inhibitor	1 µl
Polymerase	1 µl
DNA (1 µg)	x µl
ddH ₂ O	add 50 µl

Es folgte die Inkubation für 90 min bei 30 °C im Brutschrank. Anschließend wurden die Proben mittels SDS- Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.2.7 Zellbiologische Methoden

3.2.7.1 Kultivierung von Zelllinien

Sowohl HEK293- als auch Cos-7-Zellen wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert. Die Kultivierung dieser adhärenen Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe. Als Kulturmedium wurde DMEM unter Zusatz von 5 % FKS für HEK 293 Zellen bzw. 10 % FKS für Cos-7 Zellen und jeweils 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 mM Glutamin verwendet. Für das Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und anschließend mit einem

geeigneten Volumen Trypsinlösung überschichtet, welche sofort wieder von den Zellen entfernt wurde. Nach einer Inkubationszeit von ca. 5 min bei 37°C in einem begasten Feuchtbrutschrank wurden die Zellen im entsprechenden Medium aufgenommen und in geeigneter Verdünnung in die Zellkulturflasche für die weitere Kultivierung überführt.

3.2.7.2 Zellzählung

3.2.7.2.1 Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauerkammer

Von den resuspendierten Zellen wurden 10µl in 190µl Trypanblaulösung aufgenommen und gemischt. Je nach Zelldichte, die zuvor mittels Mikroskopie abgeschätzt worden war, wurden von der Zellsuspension etwa 10µl zwischen Deckglas und Neubauerkammer gegeben.

Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe, welcher für Vitalfärbungen verwendet wird. Einige Farbstoffe, wie Trypanblau, haben die Eigenschaft, membranundurchlässig zu sein, sodass lebende Zellen farblos erscheinen während tote Zellen aufgrund des Eindringens des Farbstoffes blau angefärbt sind. Gezählt wurden nur die lebenden Zellen in den 2 x 4 Großquadranten der Kammer und die durchschnittliche Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert. Das Produkt entspricht der Zellzahl pro ml Zellsuspension.

Zellen/ml = Anzahl der gezählten Zellen $\times 10^4 \times$ Verdünnungsfaktor

3.2.7.2.2 Zellzahlbestimmung mit Hilfe des Nukleocounters (IUL Instruments)

Der Hauptbestandteil des Nukleocounters ist ein Fluoreszenzmikroskop. Das Fluoreszenzmikroskop ist für die Anregung des DNA-Farbstoffes Propidium Iodid optimiert, da intensives grünes Licht für die Anregung verwendet wird, um die nachfolgende Rotlichtemission zu detektieren. Detektierte Signale korrelieren direkt mit der Zellzahl. Zusätzlich zum Fluoreszenzmikroskop besteht das System des Nucleocounters aus Einweg-Probekammern (Kassetten), die intern mit OI beschichtet sind, einem Lysispuffer und einem Disaggregationspuffer. 50 µl der resuspendierten Zellen wurden zu gleichen Teilen mit beiden

Puffern gemischt. Es wurde ein Volumen von 50 µl in die Kassette gezogen. Durch die Probenflüssigkeit wurde der immobilisierte Fluoreszenzfarbstoff in der Kassette gelöst, und die Bestimmung der Zellzahl erfolgte anschließend, wie zuvor beschrieben, im Nucleocounter.

3.2.7.3 **Auftauen und Einfrieren von Zellen**

Für das Einfrieren von Zellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche wurden die abtrypsinierten Zellen in einem Gemisch aus 7 ml Medium, 2 ml FKS und 1 ml DMSO resuspendiert und in 10 Kryoröhrchen aliquotiert. Einer einstündigen Lagerung bei 4 °C folgte das Einfrieren bei -80 °C für 2 Tage und anschließend die Aufbewahrung der Zellen über flüssigem Stickstoff. Das Auftauen der Zellen aus dem Stickstofftank erfolgte in einem Behälter mit 37°C warmem Wasser. Die aufgetauten Zellen wurden in eine dem Zellwachstum entsprechende Kulturflasche pipettiert und mit Medium aufgefüllt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte, wie unter Abschnitt 3.2.7.1 beschrieben.

3.2.7.4 **Beschichtung von Zellkulturplatten mittels Poly-D-Lysine Hydrobromide**

Poly-D-lysine Hydrobromide ist ein positives geladenes Aminosäurepolymer, welches die elektrostatische Interaktion durch positiv geladene Seitenketten mit den negativ geladenen Ionen der Zellmembran und der Zelloberfläche verstärkt. Damit wird eine bessere Adhäsion der Zellen erreicht. Poly-D-lysine Hydrobromide (5 mg/ml), in PBS gelöst, wurde in die Vertiefung pipettiert, so dass der Boden der Kulturplatten bedeckt war. Es folgte eine Inkubationszeit von 10 min und anschließendes Absaugen der Lösung. Danach wurden die Kulturschalen mit dem doppelten Volumen PBS gewaschen.

3.2.8 Transfektion eukaryotischer Zellen

3.2.8.1 Transfektion mit dem „Effectene Transfection Reagent“ der Firma Qiagen

Diese Methode der Transfektion beruht auf dem Prinzip der der Ausbildung von Micellen, d.h. der spontanen Zusammenlagerung von Aggregaten aus amphiphilen Molekülen. Zunächst wird bei dieser Art der Transfektion die zu transfizierende DNA mittels eines stark positiv geladenen Verstärkers (Enhancer) kondensiert. Die Micellenbildung erfolgt dann durch die Komplexbildung der kondensierten DNA durch Zugabe einem kationischen, nicht-liposomalen Lipids (Effectene). Nach der anschließenden Endozytose der Mizellen wird die DNA in die Wirtszelle entlassen.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die eukaryotischen Zellen auf entsprechenden Kulturschalen (Lochplatten) ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert. Die Menge der einzusetzenden Transfektionskomponenten wurde entsprechend der Größe der verwendeten Kulturschalen bestimmt (siehe Tabelle 17). Die zu transfizierende DNA wurde in EC-Puffer verdünnt, mit dem Verstärker versetzt und kurz gemischt. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 - 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Zugabe des Effectene-Transfektionsreagenz zu den Reaktionsansätzen wurden diese 10 s gründlich gemischt und zur Komplexbildung für 5 - 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des geeigneten Wachstumsmediums zum Transfektionsansatz und zu den Zellen wurden die Transfektionsansätze tröpfchenweise auf die Zellen gegeben.

Die Inkubation der Zellen mit dem DNA-Lipid-Komplex erfolgte bei 37°C im begasten Brutschrank (5 % CO₂).

Tabelle 17: Transfektionsschema mit dem „Effectene Transfection Reagent“

Kulturschale	Zellzahl	DNA µg	Enhancer µl	EC-Puffer Endvolumen µl	Effectene µl	Medium Komplex µl	Medium Zellen µl
24-Lochplatte	2,0-8,0×10 ⁴	0,2	1,6	60	5	350	350
6-Lochplatte	0,9-4,0×10 ⁵	0,4	3,2	100	10	600	800

3.2.8.2 Transfektion mit “Lipofectamine 2000 Transfection Reagent” der Firma Invitrogen

Lipofectamine besteht aus kationischen und neutralen Lipiden. Es vermittelt die Einschleusung der DNA in die Zellen über liposomenartige Komplexe. Die folgenden Angaben beziehen sich auf eine Transfektion in 96-Lochplatten, die zuvor mit Poly-D-Lysine Hydrobromide beschichtet wurden (Abschnitt 1.5.4.1). Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in Kulturmedium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag sollten die Zellen konfluent gewachsen sein. Für die Transfektion wurde das Medium OptiMEM I ohne Zusatz des für die Zelllinie üblichen Anteils von Glutamin, Antibiotika und FKS verwendet. Die zu transfizierende DNA wurde in 50 μ l OptiMEM I Medium verdünnt und gut gemischt. Die entsprechende Menge des Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 wurde ebenfalls in 50 μ l OptiMEM I aufgenommen (12 μ l Lipofectamine 2000/ml Medium) und für 5 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die beiden Reaktionsansätze zu einem Gesamtvolumen von 100 μ l vereinigt. Es wurde vorsichtig gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und je Vertiefung 100 μ l OptiMEM I und 100 μ l des Transfektionsmixes zugegeben. Die Transfektion wurde nach 5 Stunden durch Entfernen des Mediums und Zugabe von neuem Medium (DMEM + 10 % FKS, ohne weitere Zusätze) abgestoppt.

3.2.9 CREB-Luziferase Versuch

Eine konstitutive Aktivität der zu untersuchenden Rezeptoren über die $G\alpha_i$ -Untereinheit resultiert in einer Inhibition der cAMP Konzentration in Zellen, welches zu keiner Expression des Luciferasegens führt. Um eine Signaltransduktion über $G\alpha_i$ messen zu können, wurde das chimäre $G\alpha$ Protein Gqi4myr eingesetzt. Dieses Fusionsprotein besteht aus den letzten vier Aminosäuren der C-terminalen *Receptor-Binding Domain* der $G\alpha_i$ -Untereinheit und der N-terminalen *Phospholipase C Aktivierungsdomain* der $G\alpha_q$ -Untereinheit. Dadurch wird das $G\alpha_i$ Signal in ein $G\alpha_q$ Signal umgewandelt. Der Transkriptionsfaktor CREB wird vorrangig durch $G\alpha_s$ aktiviert, wird aber außerdem stimuliert durch $G\alpha_q$. Die Signalweitergabe erfolgt mittels Raf/MAP Kinasen. Im CREB-Luziferase Assay wird ein CREB-Reporterplasmid verwendet und

als *trans*-Aktivator die Firefly (*Photinus pyralis*) - Luciferase als zugehöriges Reporterprotein. Das Fusionsprotein CREB besteht aus einer CREB-Aktivierungsdomäne, fusioniert mit einer Hefe GAL4 DNA-Bindedomäne. Eine hohe und konstitutive Expression dieses Proteins wird durch den CMV-Promotor des pFA2-CREB Plasmids erreicht. Das pFR-LUC Reporterplasmid enthält einen synthetischen Promotor mit repetitiven GAL4-Bindedomänen. Folglich wird die Expression der Luciferase vom *trans*-Aktivator kontrolliert, der nach Aktivierung an die zugehörige Erkennungssequenz (GAL4) bindet und anschließend die Expression der Luciferase initialisiert. Daraus folgend ist das Expressionslevel der Luciferase proportional zur Aktivierung des zu untersuchenden Rezeptors.

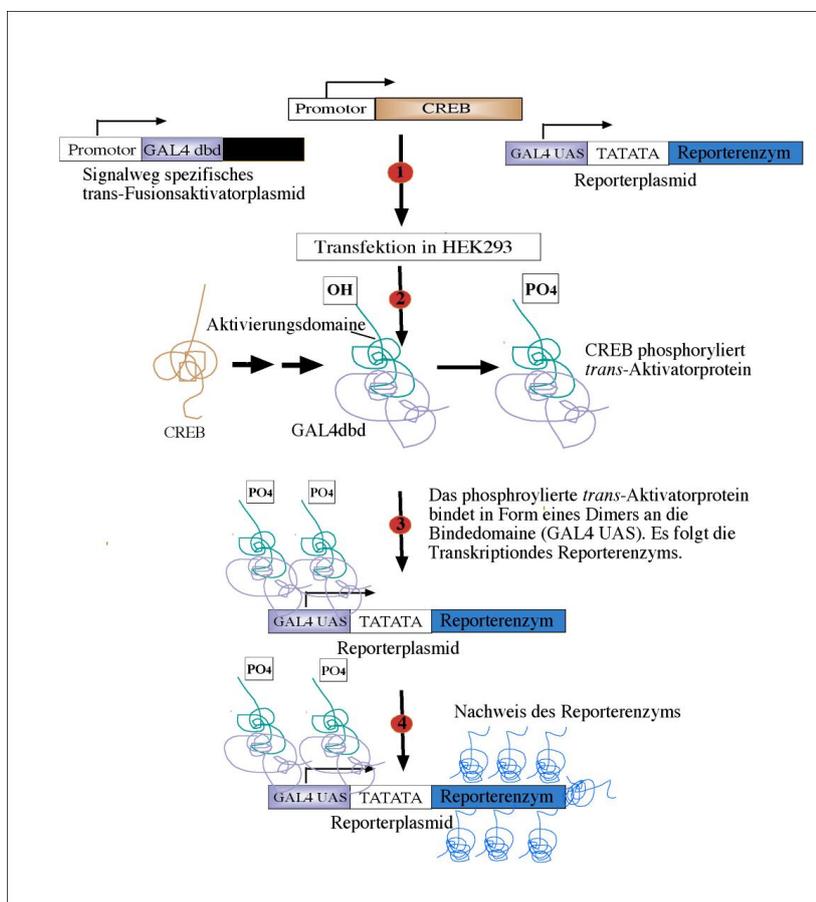


Abbildung 7: Prinzip des CREB-Luziferase Versuchs. Adaptiert von Invitrogen „Pathdetect® In Vivo Signal Transduction Pathway trans-reporting System“ (www.invitrogen.com).

Für den CREB-Luziferase Versuch wurden HEK293-Zellen (30000 Zellen/Kavität) in zuvor mit Poly-D-lysine beschichtete weiße 96-Lochplatten ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit Rezeptorkonstrukten mit einer Konzentration von 0 -20 ng/Kavität, mit dem trans-Aktivatorplasmid pFA2-CREB [6ng/well] und dem Reporterplasmid pFR-LUC [50ng/well]

transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit dem Lipofectamine 2000 Transfektionskit. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem chimären G-Protein Gqi4myr [30ng/well] transfiziert und anschließend für 5 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Transfektion wurde das Medium gewechselt (DMEM + 10 % FKS) und im Falle einer Zugabe von Inhibitoren (U73122/Pertussis Toxin (PT)) wurden diese mit einer Konzentration von 10 µM, zu diesem Zeitpunkt bzw. 12 Stunden später, auf die entsprechenden Zellen gegeben. Nach ca. 18 Stunden wurde das Medium verworfen und die Zellen einmal mit PBS + Mg²⁺ + Ca²⁺ gewaschen. Anschließend wurden 100 µl PBS + Mg²⁺ + Ca²⁺ und 100 µl des Substrats SteadyLite auf die Zellen pipettiert. Der Ansatz wurde für weitere 10 Minuten inkubiert und die Lumineszenz im Luminometer gemessen. Für jeden Rezeptor wurde 3 x eine vierfach-Bestimmung durchgeführt.

3.2.9.1 CREB-Luziferase Versuch nach Forskolin-Stimulation

Die Signalweitergabe über die G α_i -Untereinheit wirkt inhibierend auf die Adenylatcyclase und somit auf das intrazelläre Level von cAMP. Forskolin, ein zellpermeables Diterpenoid aus *Coleus forskohlii* (Harfenkraut), stimuliert die Adenylatcyclase und wirkt damit entgegengesetzt zur G α_i -Untereinheit. Mit steigender Rezeptorkonzentration inhibiert die G α_i -Untereinheit die Stimulation der Adenylatcyclase durch Forskolin. Setzt man hingegen PT als Inhibitor für die G α_i -Untereinheit ein, wird die Stimulation der Adenylatcyclase durch Forskolin nicht beeinträchtigt. HEK293-Zellen wurden in 96-Lochplatten (30000 Zellen/Kavität) ausgesät und am folgenden Tag mit dem trans-Aktivatorplasmid pFA2-CREB [6 ng], dem Reporterplasmid pFR-LUC [50 ng] und einer ansteigenden Konzentration an Rezeptorkonstrukten [0-20 ng] transfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt (siehe Abschnitt 3.2.9). Am folgenden Tag fand ein erneuter Mediumwechsel statt und es wurde Forskolin [15 µM] auf die entsprechenden Zellen gegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für fünf Stunden im Brutschrank bei 37°C. Die weitere Vorgehensweise entsprach der des oben angegebenen CREB-Assays.

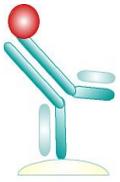
3.2.9.2 NFAT/NF κ B-Luziferase Versuch

Um eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF κ B zu ermitteln, wurde die gleiche Vorgehensweise wie für den CREB-Luziferase Assay angewendet. Es wurden im Gegensatz zum CREB-Luziferase Assay NFAT oder NF κ B als *trans*-Aktivatorproteine (siehe Abschnitt 3.2.9.1) verwendet. Es wurde bei diesem Versuch kein chimäres G-Protein eingesetzt. Stattdessen wurde die zelluläre Untereinheit des G-Proteins, welche an der Signalweitergabe beteiligt ist, im Falle einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren mit Hilfe von Inhibitoren ermittelt. HEK293-Zellen (30000 Zellen/Kavität) wurde am Tag vor der Transfektion in 96-Lochplatten ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen mit Rezeptorkonstrukten [0-20 ng], mit dem jeweiligen *trans*-Aktivatorplasmid pFA2-NFAT, pFA2-NF κ B [6 ng] und dem Reporterplasmid pFR-LUC transfiziert [50 ng]. Anschließend wurde wie unter Abschnitt 3.2.9.1 nach der Transfektion beschrieben, weiter verfahren.

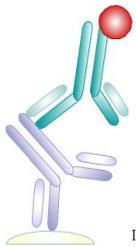
3.2.9.3 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Die Oberflächenexpression der zu untersuchenden Rezeptoren wurde im ELISA bestimmt. Dafür wurden HEK 293-Zellen parallel zum CREB-Luziferase Versuch ausgesät und am folgenden Tag mit 0-20 ng Rezeptorkonstrukt, gegebenenfalls mit Gqi4myr und den Transaktivatorprotein (CREB) und Reporterplasmiden (s.o.) wie unter Abschnitt 1.5.7.2.1. beschrieben, transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit 200 μ l TBS gewaschen und anschließend mit 100 μ l 4% Formaldehyd für 10 min fixiert. Nach drei folgenden Waschschritten mit 200 μ l TBS wurden die Zellen mit 100 μ l TBS + 2 % BSA für 30 min geblockt. Anschließend folgte die Inkubation mit einem gegen den HA-Tag (siehe Anhang 11.4) gerichteten und mit Peroxidase gekoppelten Antikörper gelöst in TBS für 1 Stunde. Nach drei folgenden Waschschritten wurde die Peroxidaseaktivität durch die Zugabe von 3,3'-5,5'-Tetramethyl Benzidine Substrat bestimmt. Die optische Dichte (OD) wurde bei 450 nm im SpectraFLUOR plus gemessen. Jedes Konstrukt wurde zumindest dreimal im Vierfach-Ansatz getestet. Alle Versuchsschritte wurden bei RT durchgeführt.

3.2.10 Immunfluoreszenz



Direkte Immunfluoreszenz



Indirekte Immunfluoreszenz

Proteine in Geweben und Zellen können mit spezifischen Antikörpern in der Immunfluoreszenz visualisiert und so die Lokalisation dieser Proteine bestimmt werden. Dabei unterscheidet man die direkte von der indirekten Immunfluoreszenz. Bei der direkten Immunfluoreszenz bindet ein Fluorochrom-markierter Antikörper an ein spezifisches Epitop, während bei der indirekten Immunfluoreszenz auf einen unmarkierten Primärantikörper ein Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper folgt. In dieser Arbeit wurden der direkte und der indirekte Immunfluoreszenztest gekoppelt durchgeführt.

3.2.10.1 Indirekter Immunfluoreszenztest mit kultivierten Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden 293-HEK-Zellen in 24-Lochplatten auf sterilen Deckgläschen ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Nach anschließender Inkubation im begasten CO₂-Brutschrank bei 37 °C für 48 h nach dem Aussäen wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Formaldehydlösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die anschließende Permeabilisierung erfolgte mit 0,1 % TritonX-100 in PBS für 10 min bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 60 min in Blockpuffer (PBS, 0,1 % Tween 20, 1 % BSA) bei Raumtemperatur inkubiert. Der primäre Antikörper wurde im Blockpuffer verdünnt und die Zellen für weitere 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit PBS/Tween 20 0,05% (PBS-T_{0,05} %) bevor 100 µl des sekundären Antiköper in Blockpuffer auf die Zellen pipettiert wurden und eine weitere Stunde schwenkend inkubiert wurde. Nach Entfernung nichtgebundener Sekundärantikörper durch dreifaches Waschen wurde im Falle von Mehrfachmarkierungen ein weiterer Primärantikörper in Blockpuffer sowie der Sekundärantiköper, wie unter Abschnitt 3.2.10 beschrieben, verwendet. Durch anschließende Waschschritte mit PBS-T_{0,05} wurde die Antikörpermarkierung abgeschlossen, und die Deckgläschen wurden mit Mowiol (8 µl) auf Objektträgern eingebettet. Für eine bessere Fixierung der Deckgläschen auf den Objektträgern wurden die Objektträger für mindestens 24 h im Kühlschrank gelagert und erst anschließend mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert.

3.2.10.2 Ko-Lokalisation von Proteinen

Für die Bestimmung der Kolokalisation zweier Proteine wurden beide Markierungsmethoden gekoppelt eingesetzt. Die Proteine waren jeweils am N-Terminus mit einem HA-Tag oder Myc-Tag markiert (siehe Anhang 11.3 und 11.4) und konnten somit nachgewiesen werden. Die Durchführung der indirekten Antikörpermarkierung erfolgte, wie unter Abschnitt 3.2.10.1 beschrieben. Nach der indirekten Antikörpermarkierung und den folgenden Wachschritten mit PBS-T_{0,05} wurden die Zellen mit 100 µl eines Fluorochrom-markierten Antikörpers (α -HA-FITC-Maus/ α -myc-FITC-Maus) für eine Stunde inkubiert. Nach abschließenden Wachschrritten wurden die Deckgläschen in 8 µl Moviol auf Objektträgern eingebettet und konnten nach 24 h analysiert werden.

3.2.10.3 pEGFP-F als Kotransfektionsmarker

Das grün fluoreszierende Protein (GFP, engl. Green fluorescent protein) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*. Das Protein emittiert nach Anregung ($\lambda = 480$ nm) grünes Licht.

Der Vektor pEGFP-F kodiert für ein farnyliertes EGFP (enhanced green fluorescent protein), welches im Vergleich zu dem bekannten GFP modifiziert ist. Durch ein Farnesylierungssignal wird das Protein zur inneren Plasmamembran der Zelle transportiert und bleibt dort fest verankert. Somit kann eine mögliche Kolokalisation von Proteinen, die zur Plasmamembran transportiert werden, analysiert werden.

Die Durchführung geschah, wie unter Abschnitten 3.2.10.1 und 3.2.10.2 beschrieben. Nur wurde zusätzlich zu den zu untersuchenden Proteinen pEGFP-F kotransfiziert, und es folgte die Immunfluoreszenzmarkierung für die zu detektierenden Proteine und die Auswertung am Laserscanmikroskop.

3.2.10.4 Protein-Disulfide-Isomerase-Immunfluoreszenztest

Die Protein-Disulfid-Isomerase (PDi) ist ein lösliches Protein im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Der Disulfide Isomerase Monoclonal Antibody ist gegen die PDi gerichtet und dient damit als Marker für das ER.

Die Versuchsdurchführung wurde wie unter Abschnitt 3.2.10.1 bis zur Fixierung der Zellen durchgeführt. Anschließend erfolgte die indirekte Immunfluoreszenz mit dem Disulfide Isomerase Monoclonal Antibody (100 μ l) als Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Es folgten drei Waschschrte mit PBS-T_{0,05} bevor 100 μ l des sekundären Antikörpers in Blockpuffer auf die Zellen pipettiert wurde und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach Entfernung nichtgebundener Sekundärantikörper durch dreifaches Waschen wurde eine Mehrfachmarkierung mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper durchgeführt. Abschließende Waschschrte und die Einbettung mit Moviol folgten wie zuvor beschrieben.

3.2.10.5 Nachweis der Internalisierung von 7TM-Rezeptoren

Für den Nachweis der Internalisierung der zu untersuchenden 7TM-Rezeptoren wurde ein „*antibody feeding experiment*“ durchgeführt. Alle Schritte, wenn nicht anders erwähnt, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. 293-HEK Zellen wurden am Tag vor der Transfektion auf sterilen Deckgläsern in 24-Lochplatten ausgesät und am folgenden Tag wie unter Abschnitt 3.2.8.1 transfiziert. Um die 7TM-Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu detekieren, wurden lebende Zellen mit einem primären Antikörper (200 μ l gelöst in kalten DMEM), der gegen den HA-Tag gerichtet ist, für eine Stunde bei 4 °C ($t = 0$) inkubiert. Die niedrige Temperatur verhindert die Internalisierung der 7TM-Rezeptoren. Anschließend wurden die Zellen sofort fixiert oder bei 37 °C ($t = 30$) inkubiert, um die Internalisierung zu starten. Es folgten für den einen Versuchansatz drei Waschschrte mit kaltem DMEM und die Fixierung mit 4% Formaldehyd für 15 min und für den anderen parallelen Ansatz die Inkubation bei 37 °C. Danach wurde auch der Ansatz der bei 37°C inkubiert worden war fixiert, wie zuvor beschrieben. Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche lokalisiert waren, wurden mit einem sekundären Fluorescein (FITC)-konjugierten Antikörper (grün) markiert, während internalisierte Rezeptoren mit einem Rhodamine RedTM-X-konjugierten sekundären Antikörper (rot) detektiert wurden. Dafür wurden die Zellen zunächst in Blockpuffer (TBS + 2 % BSA) für 20 min inkubiert und anschließend mit dem FITC-konjugierten Antikörper (Verdünnung 1 : 200 in TBS + 1 % BSA) für weitere 30 min inkubiert. Nach drei Waschschrten mit TBS wurden die Zellen permeabilisiert. Dafür wurden 200 μ l TBS +1 % BSA und 0,2 % Saponin auf die Zellen gegeben und für 20 min inkubiert. Es folgte die Markierung mit dem sekundären Rhodamine RedTM-X

konjugierten Antikörper (Verdünnung 1 : 200 in TBS + 1 % BSA + 0,2 % Saponin) mit einer Inkubationszeit von 20 min. Nach drei abschließenden Waschschritten mit TBS wurden die Deckgläser in 8 µl Moviol auf Objektträger eingebettet.

3.2.11 Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Die Bestimmung der zellulären Lokalisation der viralen 7TM-Rezeptoren erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laserscan-Mikroskopie (cLSM). Ein Laser tastet das Objekt punktweise ab, um auf diese Weise eine Abbildung mit sehr hohem Kontrast in der dritten Dimension zu erzeugen. Ein weiterer Vorteil dieser Mikroskopie besteht in der Möglichkeit, das von einer Probe emittierte Licht in einzelnen Ebenen zu sammeln. Eine Lochblende, die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnet ist, begrenzt die Tiefenschärfe und blockiert einen Großteil des Lichtes von außerhalb der Fokusebene. Der so erzeugte optische Schnitt ist ein hochaufgelöstes Abbild der Probe. Die zu untersuchenden Rezeptoren wurden unter Verwendung der direkten oder indirekten Immunfluoreszenz (Abschnitt 1.6.1 und 1.6.2) mit Antikörpern, welche mit den Fluorochromen FITC oder Rhodamine konjugiert waren, nachgewiesen. Durch die Bestrahlung der Fluorochrome mit Licht einer definierten Wellenlänge werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach kleinem Energieverlust fallen sie unter Aussendung von längerwelligem Emissionslicht auf das ursprüngliche Energieniveau zurück. Die Emission kann nachgewiesen und analysiert werden.

3.2.12 Phylogenetische Analysen

Die phylogenetische Analysen wurden mit der Software „Geneious ProTM 5.3“ durchgeführt. Die phylogenetischen Berechnungen erfolgten nach der „Maximal-Neighbor-Joining-Methode“ mit folgenden Einstellungen: „Best Tree“ Modus (zufällige Baumverzweigungen, ignorieren aller Sequenzlücken); sowie im „Bootstrap Modus“ (100 Wiederholungen der Berechnung). Die Knoten nicht auflösen, wenn die Signifikanz unter 50 % liegt. Die Stammbäume wurden in der Einstellung „midpoint rooting“ erstellt.

3.2.13 Nomenklatur der Primatenherpesviren

Die Einteilung und Bezeichnung der Primatenherpesviren in dieser Arbeit richtete sich nach den Vorschlägen von Ehlers *et al.* (2003). Dabei setzt sich der Name des Herpesvirus aus dem Anfangsbuchstaben des Wirtsgenus als Großbuchstabe und den ersten drei Buchstaben der Wirtspezies als Kleinbuchstaben zusammen. Die Virusspezies wird nach ihrer mutmaßlichen Zugehörigkeit zu einem Genus der Herpesviren benannt, welches sich aus den phylogenetischen Analysen ergibt. Zum Beispiel wurde LCV aus dem Schimpansen (*Pan troglodytes*) als PtroLCV1 (Pan troglodytes Lymphocryptovirus 1) bezeichnet (siehe Anhang 12.2). Die Namensgebung (LCV1, LCV2 etc) erfolgte in der Reihenfolge der erstmaligen Beschreibung der Viren.

Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von LCV nicht-humaner Primaten

Für eine bessere phylogenetische Einordnung von LCV in die Genogruppen I und II (siehe Abschnitt 1.3.2) war es erforderlich zusätzliche, über die bereits publizierten hinausgehende Sequenzinformationen einzelner LCV aus Blut- bzw. Gewebeproben von Alt- und Neuweltaffen zu erhalten. Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei auf der Generierung von Sequenzinformationen für LCV der Genogruppe II. Das gB-Gen, das stromaufwärts vom DPOL-Gen liegt, zeichnet sich im Vergleich zum Dpol-Gen durch geringer konservierte Sequenzbereiche aus und eignet sich deshalb gut für die phylogenetische Abgrenzung. Für eine vollständige Amplifikation des gB-Gens wurden zunächst degenerierte Primersets ausgewählt, die zur Amplifizierung kurzer Sequenzen im gB-Gen und im stromaufwärts liegenden Major-DNA-Binding-Protein-Gen (MDBP) geeignet waren. Im nächsten Schritt wurden die erhaltenen MDBP- und gB-Sequenzen mittels Long-Distance-PCR (LD-PCR) miteinander verbunden. In gleicher Weise wurden die bekannten DPOL-Sequenzen mit den gB-Sequenzen verbunden. Aus den resultierenden kontinuierlichen Sequenzabschnitten mit einer Länge von bis zu 8 kb wurden dann die kompletten Sequenzen des gB-Gens identifiziert und für die phylogenetische Analyse eingesetzt.

Des Weiteren wurden mit Hilfe dieser Sequenzdaten degenerierte Primer abgeleitet, die ausschließlich die Amplifikation von LCV der Genogruppe II in der PCR ermöglichen. Zunächst wurde die Amplifikationseffizienz dieses PCR-Systems anhand einiger LCV der Genogruppe II untersucht. Im Folgenden wurde versucht in DNA-Proben von Menschen und Schimpansen bisher unbekannte LCV der Genogruppe II mit diesem PCR-System zu detektieren.

4.1.1 Sequenzaufklärung eines konservierten Genblocks bei LCV der Genogruppe I

Für die Bestimmung von hoch konservierten Sequenzbereichen im gB- und MDBP-Gen wurden zunächst kurze Sequenzabschnitte von LCV der Genogruppe I aus Alt- und Neuweltaffen amplifiziert. Die Genabschnitte wurden dann mittels LD-PCR zu kontinuierlichen

Sequenzabschnitten verbunden. Die Amplifikation der gB-Sequenzen und MDBP-Sequenzen erfolgte schrittweise mit einem der degenerierten nested-Primersets gB1A, gB2A, MDBP1A und MDBP2A, welche in Sequenzabschnitten binden, die innerhalb der Unterfamilie der γ -Herpesvirinae konserviert sind. Die Position der konservierten Blöcke wurde anhand von Sequenzdaten in einem „Alignment“ von γ -Herpesviren verschiedener Wirtsspezies ermittelt. Für die selektive Amplifikation von LCV wurde der 5'-Bereich der Primer am gB-Gen von PtroLCV1 (gB1A und gB2A) und im MDBP-Gen an dem des CalHV3 (MDBP1A und MDBP2A) orientiert.

gB- und MDBP-Sequenzen verschiedener Herpesviren der Genogruppe I konnten in Altweltaffen und Neuweltaffen nachgewiesen werden. Diese sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18 Generierung von LCV-Sequenzen

Spezies	Virusname	Genogruppe	MDBP-Sequenz ^a	gB-Sequenz ^a	DPOL-Sequenz ^a	MDBP-DPOL ^b
<i>Altweltaffen</i>			4.1.1.1	5		
Schimpanse	PtroLCV1	I	+ ^c	◇	◇ ^e	*
Gorilla	GgorLCV1	I	+	+	◇	*
Orang-Utan	PpygLCV2	I	+	+	◇	*
Gibbon	HsynLCV2	I	+	+	◇	*
Makake	MfasLCV1	I	- ^d	+	◇	
Kolobus	CgueLCV1	I	-	+	◇	
Bonobo	PpanLCV1	I	+	+	◇	*
Mandrill	MsphLCV1	I	-	+	◇	
Gorilla	GgorLCV2	II	+	+	◇	*
Orang Utan	PpygLCV1	II	+	+	◇	*
Gibbon	HsynLCV1	II	+	+	◇	*
Gibbon	HlarLCV1	II	+	+	◇	*
<i>Neuweltaffen</i>						
Totenkopffaffe	SsciLCV1		+	+	◇	*
Saki	PpitLCV1		+	+	◇	*
Klammeraffe	ApanLCV1		-	+	◇	
Kapuzineraffe	CalbLCV1		-	+	◇	

^a partielle Gen-Sequenz erhalten nach Sequenzanalyse von PCR-Produkten mit degenerierten Primern

^b * = kontinuierliche Sequenz wurde erhalten. Beginn: im 3'-Ende des MDBP-Gens; Ende: im DPOL-Gen.

^c + = PCR positiv; ^d - = PCR-negativ; ^e ◇ = Sequenz in der Arbeitsgruppe (AG-E) bereits vorhanden

Eine Amplifikation von LCV der Genogruppe II (HsynLCV1, PpygLCV1 und GgorLCV2) und weiterer unbekannter LCV anderer Wirtsspezies gelang mit diesen Primersets nicht.

Die gB-Sequenzen der LCV aus Altweltaffen der Genogruppe I wurden in einem „Alignment“ im gB-Gen miteinander verglichen. Die prozentuale Identität der

Nukleinsäuresequenzen von LCV aus Altweltaffen lag bei 90 %, mit Ausnahme von MfasLCV1, PpygLCV2 und HsynLCV2. Hier lag die prozentuale Identität bei 99 % (Nukleinsäure) bzw. 100 % (Protein). Zwischen den Nukleinsäuresequenzen von LCV aus Alt- und Neuweltaffen gab es eine geringere durchschnittliche Sequenzähnlichkeit; sie lag bei 65 %.

Für die Generierung von kontinuierlichen Sequenzen zwischen dem MDBP-Gen und dem gB-Gen sowie dem gB- und dem DPOL-Gen wurden LD-PCRs durchgeführt. Die LD-PCR-Produkte wurden vollständig mit einer Mindestredundanz von 3 für jedes Nukleotid sequenziert. Abbildung 8 stellt die Vorgehensweise schematisch dar.

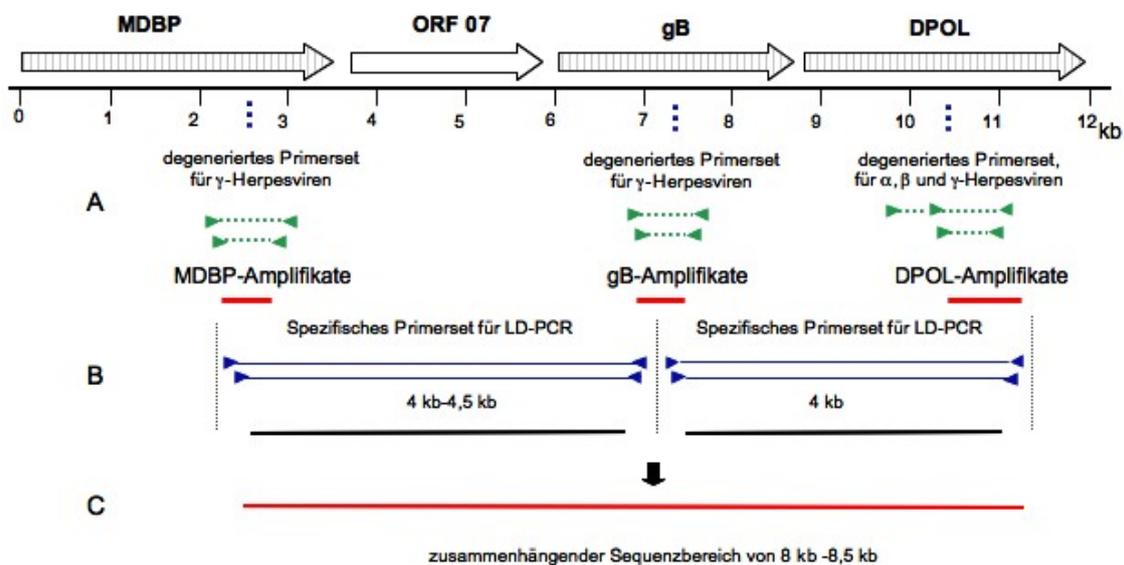


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Vorgehensweise für die Generierung eines kontinuierlichen Sequenzabschnittes vom MDBP-Gen bis zum DPOL-Gen. Die ORFs der untersuchten Gene (MDBP bis DPOL) wurden schematisch als Pfeile dargestellt. Die gestrichelten Pfeile zeigen die Genbereiche, in denen die degenerierten Primer binden. Die Skalierung gibt die Entfernung vom MDBP- bis DPOL-Gen in kb an. A: Es sind die Positionen der degenerierten Primersets im MDBP-, gB- und Dpol-Gen der LCV-Sequenz dargestellt (grüne Dreiecke, mit gestrichelten Linien verbunden). B: Die Fragmente der Gene (rote Linien) wurden mittels spezifischer Primersets (blaue Dreiecke verbunden mit einer blauen Linie) und LD-PCR (schwarze Linien), als nested-PCR-Ansatz, verbunden. C: Hieraus ergab sich für LCV von Alt- und Neuweltaffen ein 8 bis 8,5 kb langer, zusammenhängender Sequenzabschnitt (rote Linie). Die ORF-Positionen und ORF-Längen sind gemäß PpygLCV1 angegeben.

Es konnten durch die Untersuchungen in dieser Arbeit kontinuierliche Sequenzabschnitte von fünf Altwelt-LCV der Genogruppe I (PtroLCV1, PpanLCV1, GgorLCV1, PpygLCV2 und HsynLCV2) sowie von zwei LCV aus Neuweltaffen (SsciLCV1 und PpitLCV1) generiert werden (siehe Tabelle 18).

5.1.1 Sequenzaufklärung eines konservierten Genblocks im Genom von LCV der Genogruppe II

Es sollten MDBP- und gB-Sequenzen von vier LCV der Genogruppe II (HsynLCV1, HlarLCV1, PpygLCV1 und GgorLCV2) detektiert werden. Für die Auswahl geeigneter degenerierter Primer wurden die in dieser Arbeit erhaltenen neuen Sequenzinformationen von LCV der Genogruppe I (siehe Abschnitt 4.1.1) ins „LCV-Alignment“ mit eingeführt. Dadurch konnten hoch konservierte Genbereiche besser bestimmt werden. Viele HsynLCV1-, HlarLCV1-, PpygLCV1- und GgorLCV2-positive Proben waren aber mischinfiziert mit LCV der Genogruppe I (jeweils HsynLCV2, HlarLCV2, PpygLCV2 und GgorLCV1). In solchen mischinfizierten DNA-Proben kam es fast immer zu einer Amplifikation der LCV der Genogruppe I, die eine höhere Kopienzahl aufwies. Deshalb wurden für die Detektion von LCV der Genogruppe II Sequenzen von GHV im gB-Gen verwendet, die im gleichen Maße mit LCV der Genogruppe I und II verwandt waren. Es wurden Sequenzen vom Equinen Herpesvirus 2 (EHV2), eines Rhadinovirus, unter Ausschluss von Sequenzen von LCV der Genogruppe I, für die Auswahl des Primersets gB3A/ gB4A im GHV Alignment zu Grunde gelegt. Mit dem Primerset gB3A/ gB4A wurden Amplifikate von HsynLCV1, HlarLCV1 und PpygLCV1 im Bereich des gB-Gens erhalten. Für die Detektion von GgorLCV2 im gB-Gen wurde zunächst nach GgorLCV2-positiven Proben im Bereich des DPOL-Gens mit spezifischen DPOL-Primern gesucht. Mit einem neuen degenerierten Primerset (gB5A/ gB6A), die von der gB-Sequenz eines LCV der Genogruppe II (PpygLCV1) abgeleitet worden waren, wurden dann 15 zuvor getestete GgorLCV2-positive Proben (Amplifikat im DPOL-Gen) in der PCR im Bereich des gB-Gens getestet. Aus nur einer Gorilla-Probe (Gewebematerial Leber) konnte eine gB-Sequenz des GgorLCV2 amplifiziert werden.

Für die Amplifikation von LCV der Genogruppe II im MDBP-Gen wurde ähnlich verfahren wie im gB-Gen. Hier wurden Sequenzen von Gammaherpesviren mit naher Verwandtschaft zu LCV der Genogruppe II, unter Ausschluss von Sequenzen von LCV der Genogruppe I, für die Auswahl des Primersets MDBP1A/ MDBP2A im LCV-Alignment zu Grunde gelegt. Die Auswahl dieses Primersets erfolgte dann letztlich anhand der Sequenz von CalHV3, einem LCV eines Neuweltaffen. Nach erfolgreicher Amplifikation eines LCV der Genogruppe II mit diesem Primerset wurde die neue Sequenzen verwendet, um auf ein LCV der Genogruppe II (PpygLCV1) besser passendes Primersets (MDBP3A/ MDBP4A) zu entwickeln.

Diese Vorgehensweise wurde wiederholt, bis alle bisher bekannten LCV der Genogruppe II im MDBP-Gen amplifiziert waren. Die Sequenzabschnitte von MDBP bis gB, und gB bis DPOL wurden dann mittels LD-PCR verbunden und kontinuierliche Sequenzen von bis zu 8 kb erzeugt (siehe Tabelle 18).

5.1.2 Phylogenetische Analyse der LCV auf Basis der Sequenzen des kompletten gB-Gens

Die in der Arbeit bestimmten gB-Sequenzen von LCV (siehe Abschnitte 4.1.1 und 5.1.1) und die entsprechenden Sequenzen von EBV, CalHV3, CeHV-15 und HHV-8 wurden phylogenetischen Analysen unterzogen. Hierzu wurden die vollständigen gB-Gensequenzen in Geneious ProTM 5.3 in Aminosäure-Sequenzen übersetzt und miteinander abgeglichen. Anhand dieser sowie der Sequenzen verschiedener Altwelt- und Neuweltaffen-LCV (Sequenzsammlung AG-E, NCBI-Genbank) wurde aus dem resultierenden „Alignment“ ein Stammbaum erstellt (siehe Abbildung 9).

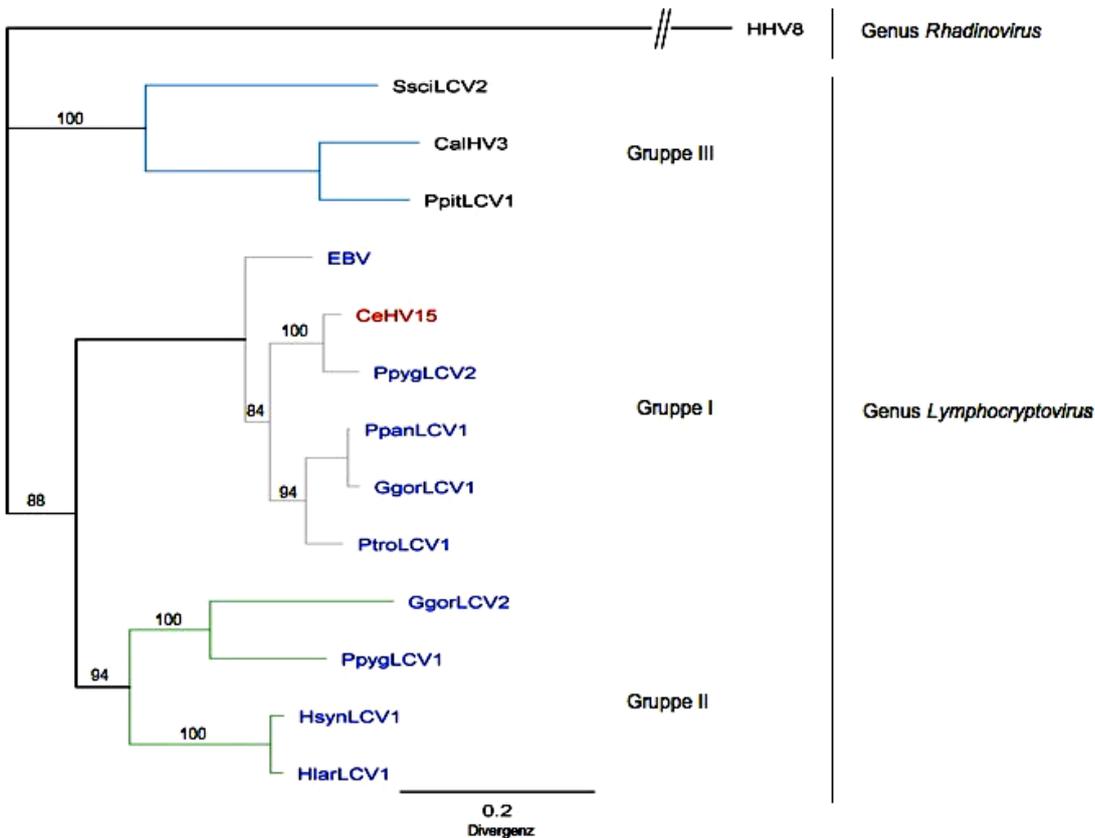


Abbildung 9 Stammbaum für den Genus LCV. Der Stammbaum wurde nach der „Neighbour-Joining-Distance“-Berechnung erstellt. Die Berechnung basierte auf ca. 340 Aminosäuren (LCV) des Glykoproteins B aus Altweltaffen und drei Neuweltaffen. HHV8 wurde als Vergleichssequenz „outlier“ in die Analyse mit einbezogen. Drei LCV Gruppen wurden farblich gegeneinander abgegrenzt: Gruppe I (graue Äste), Gruppe II (grüne Äste) und Gruppe III (blaue Äste). LCV von Neuweltaffen und von HHV-8 in schwarzer Schrift, LCV von Menschenaffen und vom Menschen in blauer Schrift und LCV von geschwänzten Altweltaffen in roter Schrift. Die Länge der Äste entspricht dem Verwandtschaftsgrad der LCV. Die Zahlen an den Knotenpunkten beschreiben die Häufigkeit, mit welcher die hinter dem Knoten stehenden Viren für diese Position berechnet wurden. Werte über 80 wurden als signifikant bewertet.

Der in dieser Arbeit ermittelte Stammbaum unter Verwendung der Sequenzen des kompletten gB-Gens reflektierte, wie zuvor in der phylogenetischen Analyse von Ehlers und Mitarbeitern vorgeschlagen (Ehlers et al., 2003), die Einteilung innerhalb der LCV in drei Genogruppen: Altweltaffen und Mensch Gruppe I und II und für Neuweltaffen Gruppe III. Die Gruppen I und II waren mit einer 88 % Wahrscheinlichkeit voneinander abgegrenzt. Die Gruppe III der Neuweltaffen-LCV war, entsprechend der größeren genetischen Distanz ihrer Mitglieder zu den Altweltaffen-LCV zu 100 % abgegrenzt (Abbildung 9). HHV-8 als Vertreter des Genus Rhadinovirus, welches in der phylogenetischen Analyse als Vergleichssequenz (outlier) eingesetzt wurde, war erwartungsgemäß deutlich von den LCV abgegrenzt.

Die phylogenetischen Analysen zeigten eine hohe Auflösung innerhalb der Genogruppe II, durch hohe „bootstrap“-Werte.

5.1.3 Phylogenetische Analyse der LCV auf Basis von gB- bis DPOL Sequenzen

Für eine bessere Auflösung (höhere „bootstrap“-Werte) des gesamten Stammbaums und insbesondere der Genogruppe I, wurden 28 Sequenzen von LCV vom gB-Gen bis DPOL-Gen in Aminosäure-Sequenzen übersetzt und miteinander abgeglichen. Anhand dieser Sequenzen wurde aus dem „Alignment“ ein Stammbaum erstellt (siehe Abbildung 10).

Die zusätzlichen Sequenzen, zu den in dieser Arbeit generierten, stammten aus der Arbeitsgruppe am RKI (AG-E). Phylogenetische Analysen des gesamten gB-Gens konnten nicht mit den Sequenzen aus der AG-E durchgeführt werden, da zum Teil nicht die vollständigen Sequenzen des gB-Gens vorlagen.

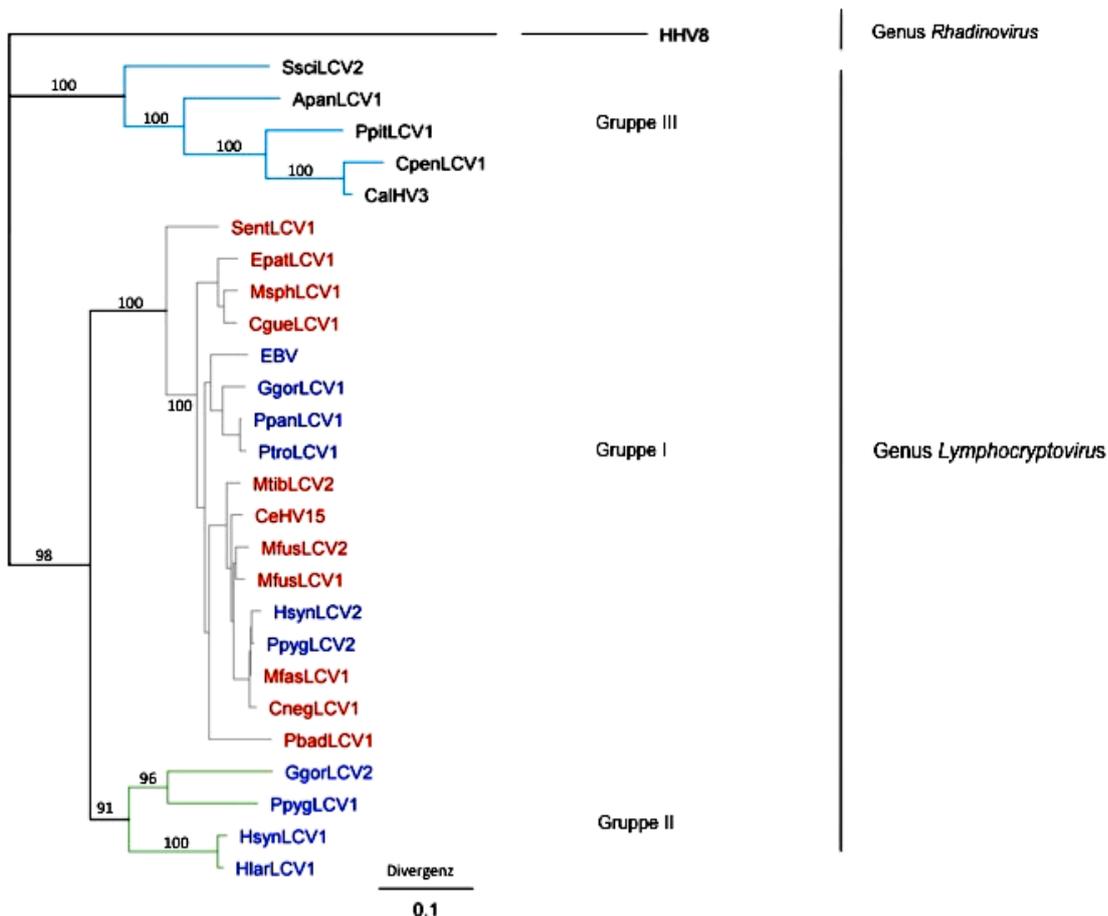


Abbildung 10 Phylogenetischer Stammbaum für den Genus LCV. Basierend auf 1042 AS von 28 LCV von gB- bis DPOL wurde ein Alignment erstellt und phylogenetische Analysen mit der „Neighbour-Joining-Distance“ Methode durchgeführt. Es gab eine Einteilung in die drei Gruppen: Gruppe I (graue Äste), Gruppe II (grüne Äste) und Gruppe III (blaue Äste). LCV von Neuweltaffen und HHV-8 in schwarzer Schrift, LCV von Menschenaffen und vom Menschen in blauer Schrift und LCV von geschwänzten Altweltaffen in roter Schrift. Die Länge der Äste entsprach der Entfernung des Verwandtschaftsgrades der LCV. Abkürzungen LCV siehe Anhang 12.2.

In diesem Stammbaum gab es erwartungsgemäß eine Einteilung der LCV in drei Genogruppen. Weiterhin konnten auf Grund der hohen Anzahl an LCV-Sequenzen eine verbesserte Auflösung des gesamten Stammbaums, insbesondere innerhalb der Genogruppe I erzielt werden.

5.1.4 Suche nach unbekanntem Lymphocryptoviren der Genogruppe II

5.1.4.1.1 Primerdesign für die Detektion von unbekanntem Lymphocryptoviren der Genogruppe II

Wie unter Abschnitt 4.1.1 beschrieben, konnten keine neuen LCV der Genogruppe II mit dem degeneriertem nested Primerset gB1A/ gB2A nachgewiesen werden. Für die weitere Suche nach LCV der Genogruppe II wurde deshalb ein neues degeneriertes nested-Primerset zur Amplifikation von gB-Sequenzen entwickelt. Für die Bindungsstellen dieses gB-Primersets gB1B/ gB2B wurden konservierte Sequenzbereiche innerhalb der Genogruppen I und II mit den in dieser Arbeit ermittelten LCV-Sequenzen (siehe Abschnitte 5.2.1 und 5.1.1), den LCV-Sequenzen aus der Datensammlung der AG-E und der öffentlich zugänglichen Genbank (NCBI) in einem „Alignment“ bestimmt. Die erste 3'-Base eines jeden Primers wurde so gewählt, dass sie an die komplementäre Base von GgorLCV2 (Genogruppe II), nicht aber an die positionsgleiche Base von GgorLCV1 (Genogruppe I) bindet. Die restliche Primersequenz entsprach der GgorLCV2-Sequenz. Dies ist beispielhaft für den Antisense-Primer der 1. Runde in Abbildung 11 dargestellt.

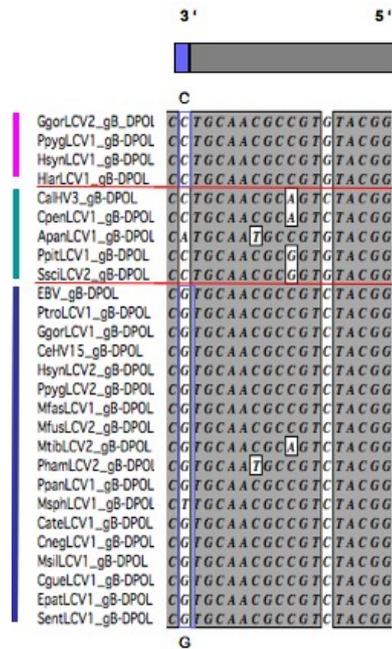


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Konstruktion eines degenerierten Primers im Bereich des gB-Gens für die selektive Amplifikation von Lymphocryptoviren der Genogruppe II. Senkrechter Strich (magenta): LCV der Genogruppe II; senkrechter Strich (grün): LCV aus Neuweltaffen; senkrechter Strich (blau): LCV der Genogruppe I. blauer Balkenabschnitt: differenzierende 3'-Base des as-Primers; grauer Balkenabschnitt: komplementäre Sequenz von GgorLCV2.

Es sollte nun überprüft werden, ob die Amplifikationseffizienz für LCV der Genogruppe II im Vergleich zu LCV der Genogruppe I mit dem Primerset gB1B/ gB2B erhöht ist. Dafür wurden DNA-Proben mit den vier LCV der Genogruppe II (HsynLCV1, HlarLCV1, GgorLCV2 und PpygLCV1) sowie drei LCV der Genogruppe I (GgorLCV1, EBV und PtroLCV1) in die PCR eingesetzt.

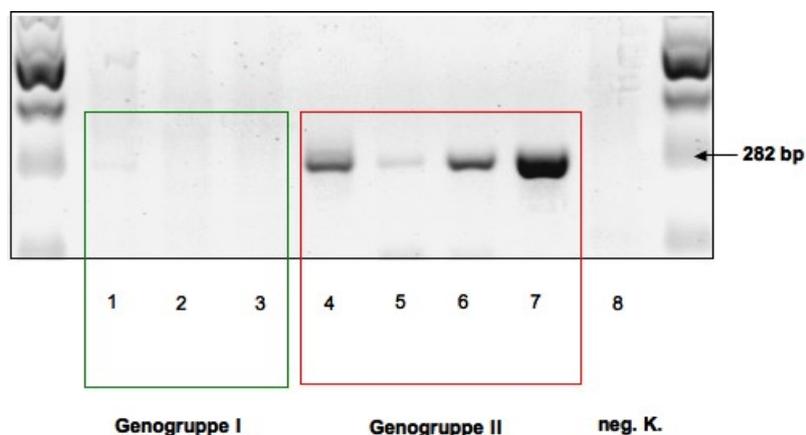


Abbildung 12: Vergleich der Amplifikationseffizienz für LCV der Genogruppe I und II. Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der LCV- PCR mit dem Primerset gB1B und gB2B. Grünes Quadrat: LCV der Genogruppe I 1) GgorLCV1; 2) PtroLCV1; 3) EBV; rotes Quadrat: LCV der Genogruppe II 4) GgorLCV2; 5) HsynLCV1; 6) HlarLCV1; 7) PpygLCV1; 8) neg. K.

Es wurden nur LCV der Genogruppe II (GgorLCV2, HsynLCV1, HlarLCV1 und PpygLCV1) in dieser PCR amplifiziert (siehe Abbildung 12).

5.1.4.2 Suche nach neuen Lymphocryptoviren der Genogruppe II in Schimpansen

Das Primerset gB1B/ gB2B wurde nun eingesetzt, um in Schimpansen-Proben bisher unbekannte LCV der Genogruppe II zu detektieren. In Tabelle 19 sind die bei diesen Proben untersuchten Gewebe und Anzahl der Proben aufgelistet (nähere Informationen über das Probenmaterial siehe Anhang 11.2). Insgesamt wurden n = 62 Individuen getestet.

Tabelle 19 Gewebematerial und Gesamtprobenzahl

Gewebematerial	Gesamtanzahl Proben ^a
Leber	5
Blut	33
Milz	8
Lunge	4
Herz	1
Thymus	1
Bindegewebe	1
Serum	1
Knochenmark	1
Magen	1
Niere	1
unbekannt	5

^a Die Proben jedes Gewebes stammte aus unterschiedlichen Individuen.

Wenn ein PCR-Produkt die erwartete Fragmentgröße nach der Gelelektrophorese aufwies, wurde es sequenziert. Die generierten Sequenzdaten wurden anhand von Referenzsequenzen aus der NCBI-Datenbank und der in der AG-E vorhandenen Sammlung noch nicht publizierter LCV-Sequenzen analysiert. Daraus ergab sich, dass in keiner der 62 untersuchten Schimpansen-Proben Sequenzen eines LCV der Genogruppe II detektiert werden konnte. Somit ist die Existenz von LCV der Genogruppe II in Schimpansen eher unwahrscheinlich.

5.2 Funktionelle Analysen von viralen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aus Lymphocryptoviren nicht humaner Primaten

EBV kodiert einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, BILF1. Das kodierende Gen liegt direkt stromabwärts vom DNA-Polymerase-Gen. Sequenzdaten von LCVs aus Altweltaffen und Neuweltaffen zeigten, dass diese an gleicher Position einen vergleichbaren ORF besitzen. Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollten mögliche funktionelle Unterschiede zwischen potentiellen vGPCRs von LCV der Genogruppe I und II auf molekularer Ebene untersucht werden. Hierzu mussten die entsprechenden Gene zunächst amplifiziert und kloniert werden.

5.2.1 Amplifikation und Klonierung von vGPCRs aus Lymphocryptoviren der Genogruppe II vom Gorilla, Gibbon und Orang-Utan

Es sollten vGPCR von LCV der Genogruppe II vom Gorilla, Orang-Utan und Gibbon (GgorLCV2, PpygLCV1 und HsynLCV1) identifiziert werden. Hierfür wurde die gleiche Genomorganisation wie bei EBV vorausgesetzt (siehe Abbildung 13). Vollständige Sequenzdaten der vGPCRs EBV, CalHV3, CeHV3 und HHV-8 waren in der NCBI Gendatenbank vorhanden (siehe Abschnitt 4.1.1). Die Sequenzen der BILF1-homologen vGPCRs von fünf Altweltaffen-LCV der Genogruppe I (PtroLCV1-GPCR, GgorLCV1-GPCR, PpitLCV1-GPCR, ApanLCV1-GPCR und EpatLCV1-GPCR) lagen in der Arbeitsgruppe AG-E bereits vor. Sie waren mittels PCR aus Blut- bzw Gewebeproben, Sequenzierung der Amplifikate und Sequenzvergleich mit Sequenzen aus der NCBI-Genbank identifiziert worden.

Um die vGPCR-kodierenden ORFs von LCV der Genogruppe II (HsynLCV1, GgorLCV2 und PpygLCV1) zu ermitteln, sollte ein definierter Genabschnitt (ca. 4 kb) von DPOL bis ORF11 in einer LD-Nested-PCR amplifiziert werden. Die hierfür notwendigen Primer wurden anhand von DPOL- und ORF11-Sequenzen ausgewählt. Die DPOL-Sequenzen lagen bereits vor (AG-E), die ORF11-Sequenzen mussten in dieser Arbeit generiert werden. Die Amplifikation von ORF11-Sequenzen wurde durch den Umstand erschwert, dass alle LCVII-haltigen Proben gleichzeitig auch LCV der Genogruppen I enthielten (siehe Abschnitt 1.3.2). Für die Amplifikation des ORF11 von HsynLCV1, GgorLCV2 und PpygLCV1 (bei Ausschluss der Amplifikation von LCV der Genogruppe I) wurde ein degeneriertes nested-Primerset (ORF11-1A und ORF11-2A),

wie unter Abschnitt 5.2.1 beschrieben, entwickelt. Der 5'-Bereich der Primer entsprach der Sequenz von CalHV3. In der Konsensus-PCR mit diesem Primerset konnte dann ein Amplifikat für HsynLCV1 im Bereich des ORF11 erhalten werden. Für GgorLCV2 und PpygLCV1 wurden keine Amplifikate erhalten, es wurde daher ein weiteres degeneriertes nested-Primerset (ORF11-3A und ORF11-4A) entwickelt. Die neu erhaltene ORF11-Sequenz von HsynLCV1 diene als Konstruktionshilfe, d.h. der nicht degenerierte 5'-Bereich der Primer entsprach der ORF11-Sequenz von HsynLCV1. In der mit den neu entwickelten Primern durchgeführten PCR konnten Amplifikate von GgorLCV2 und PpygLCV1 in der erwarteten Größe erhalten werden. Die Sequenzierung dieser Amplifikate und die vergleichende Auswertung der Sequenzen in einem „Alignment“ mit allen verfügbaren ORF11-Sequenzen aus der GenBank und der AG-E ergab eine potentielle ORF11-Sequenz von GgorLCV2 (Genogruppe II) aber nicht von PpygLCV1; hier wurde unerwartet nur die Sequenz des LCV der Genogruppe I, PpygLCV2, amplifiziert. Deshalb wurde bei Proben von Orang-Utans ergänzend ein antisense locked-nucleic-acid Oligonukleotide (LNA) (siehe Abschnitt 3.2.1.7) eingesetzt, um die Amplifikation des Gruppe I-Virus PpygLCV2 spezifisch zu unterdrücken. In der ORF11-Konsensus-PCR an mehreren Orang-Utan Proben mit den Primern ORF11-2A wurde durch Zugabe der LNA (siehe Abschnitt 3.2.1.7) die Amplifikation von PpygLCV2, zu Gunsten der Amplifikation des ORF11 des Gruppe II-Virus PpygLCV1 unterdrückt. Dies wurde durch Sequenzierung der Amplifikate bestätigt.

Weiterhin sollten für die Gruppe II-Viren HsynLCV1, GgorLCV2 und PpygLCV1 der Sequenzbereich zwischen dem DPOL-Gen und dem ORF11 mittels nested LD-PCR amplifiziert werden. Beide Gene flankieren den gesuchten vGPCR-ORF (siehe Abbildung 13). Die Bindungsstellen der hierfür genutzten Primer wurden in konservierte Sequenzabschnitte von LCV der Genogruppe II gelegt. Mit Hilfe der Sequenzdaten aus der GenBank, der erlangten Sequenzinformationen für den ORF11 und der DPOL- und ORF11-Sequenzsammlung der AG-E wurden nicht-degenerierte Primer entwickelt, die eine geringe Sequenzhomologie zu LCV der Genogruppe I, d.h. HsynLCV2, GgorLCV1 und PpygLCV2 aufwiesen, um eine Amplifikation dieser Viren in den mischinfizierten Proben auszuschließen.

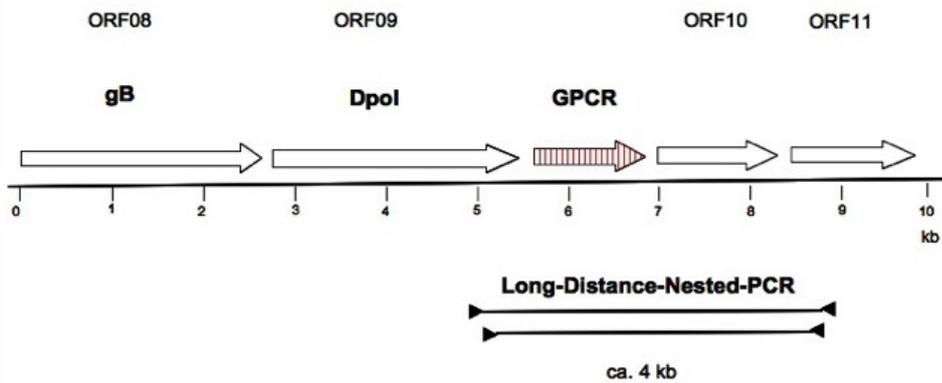


Abbildung 13: LD-PCR zur Amplifikation des BILF1-homologen vGPCR von LCV vGPCRs. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Genom von LCV vom ORF08 bis ORF11. Der ORF, der für den GPCR kodiert schematisch als rot gestreifter Pfeil dargestellt. Das eingesetzte Primerset in der nested LD-PCR ist schematisch mit schwarzen Dreiecken und einer verbindenden schwarzen Linie dargestellt.

Mit diesem Versuchsansatz konnten die erwarteten Amplifikate von HsynLCV1 und PpygLCV1 erzeugt werden. Für beide Viren wurde ein kontinuierlicher Sequenzabschnitt vom DPOL bis ORF11 mit der Primer-Walking-Methode erhalten und mit der Software MacVectorTM ausgewertet. Um mögliche PCR-Fehler in der Sequenz auszuschließen, wurde jede Sequenz mindestens mit dreifacher Redundanz von zwei verschiedenen PCR-Amplifikaten bestimmt. Für GgorLCV2 konnte kein kontinuierlicher Sequenzabschnitt vom DPOL bis ORF11 generiert werden. Aufgrund dessen konnte der vGPCR von GgorLCV2 nicht in die folgend beschriebenen funktionellen Analysen mit einbezogen werden.

HsynLCV1-GPCR und PpygLCV1-GPCR wurden für funktionelle Analysen jeweils in die Expressionsvektoren pCMV-HA, pCMV-myc und pGADT7-HA kloniert (siehe Anhang 12.3 und 12.4). Das entsprechende Plasmid lag für den PtroLCV1-GPCR in der AG-E bereits vor. Für BILF1 des EBV, der als Kontrolle eingesetzt wurde, erfolgte die Klonierung in die gleichen Vektoren. Hierfür wurde eine mittels einer konventionellen PCR EBV-positiv getestete DNA-Probe als Template in die LD-PCR eingesetzt. Anschließend erfolgte die Sequenzierung und Klonierung des BILF1-Bereichs. Die Fehlerfreiheit der klonierten vGPCR-Gene wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Sequenzen entsprachen den ORFs von BILF1, HsynLCV1-GPCR und PpygLCV1-GPCR.

Tabelle 21 zeigt eine Übersicht der rekombinanten Plasmide, deren Abkürzungen und gibt an in welchen Versuchen sie eingesetzt wurden (siehe auch Anhang 12.3).

5.2.2 Identifikation von Transmembranhelices und konservierten Sequenzabschnitten der vGPCRs

Die Software „Geneious“ wurde verwendet, um Transmembranhelices bei den BILF1-homologen vGPCRs zu ermitteln. Abbildung 14 zeigt die ermittelten Proteinsequenzen in einem „Alignment“.

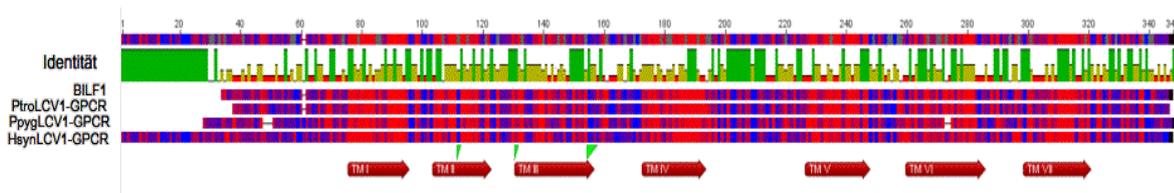


Abbildung 14 Proteinsequenzanalyse der BILF1-homologen ORFs. Schematisch sind die sieben Transmembrandomänen (TM I-VII; rote Pfeile), sowie die interzellulären und die extrazellulären Domänen (blaue Bereiche) dargestellt.

Es wurden sieben Transmembrandomänen identifiziert (TMI bis TMVII). Bei den putativen BILF1-Homologen handelte es sich somit um 7TM-Rezeptoren.

Das für die Funktionalität wichtige „DRY“-Motiv (Asparaginsäure, Arginin und Tyrosin) (Hawtin, 2005) wurde in der dritten Transmembranhelix lokalisiert (siehe Abbildung 14). Allerdings war das Motiv „DRY“ in funktionsähnliche Aminosäuren abgewandelt (siehe Abbildung 15).

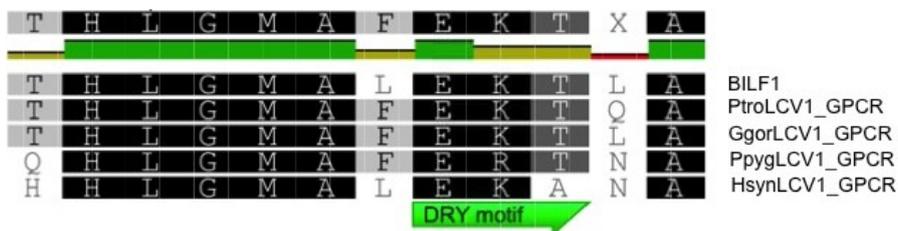


Abbildung 15 Bestimmung des „DRY“ Motivs. Das „DRY“-Motiv wurde in einem „Alignment“ mit Sequenzen von BILF1, PtroLCV1-GPCR, GgorLCV1-GPCR, PpygLCV1-GPCR und HsynLCV1-GPCR ermittelt und ist mit einem grünen Pfeil markiert.

An der ersten Position des „DRY“ Motivs wiesen alle untersuchten Rezeptoren einschließlich BILF1 Glutaminsäure anstelle von Asparaginsäure auf. Es handelt sich bei beiden um saure und

polare Aminosäuren. Auch bei der zweiten Position gab es einen Austausch und zwar von Arginin zu Lysin, wobei auch hier beide Aminosäuren ähnliche Eigenschaften aufweisen. Bei der dritten Aminosäure gab es einen Austausch von Tyrosin zu Threonin für BILF1, PtroLCV1-GPCR, GgorLCV1-GPCR und PpygLCV1-GPCR. Abweichend hiervon wies der HsynLCV1-GPCR an dieser Position Alanin auf. Tyrosin und Threonin sind polare Aminosäuren, im Gegensatz dazu ist Alanin unpolar.

5.2.3 Bestimmung des Molekulargewichtes und Untersuchungen des Glykosylierungsgrades der vGPCRs

Die am N-Terminus mit myc-markierten Proteine sollten im Westernblot (WB) detektiert werden. Dafür erfolgte die Transfektion von 293HEK-Zellen mit den Rezeptorkonstrukten (siehe Anhang 12.3 und 11.4). Am folgenden Tag wurden die Zellen lysiert und eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.6).

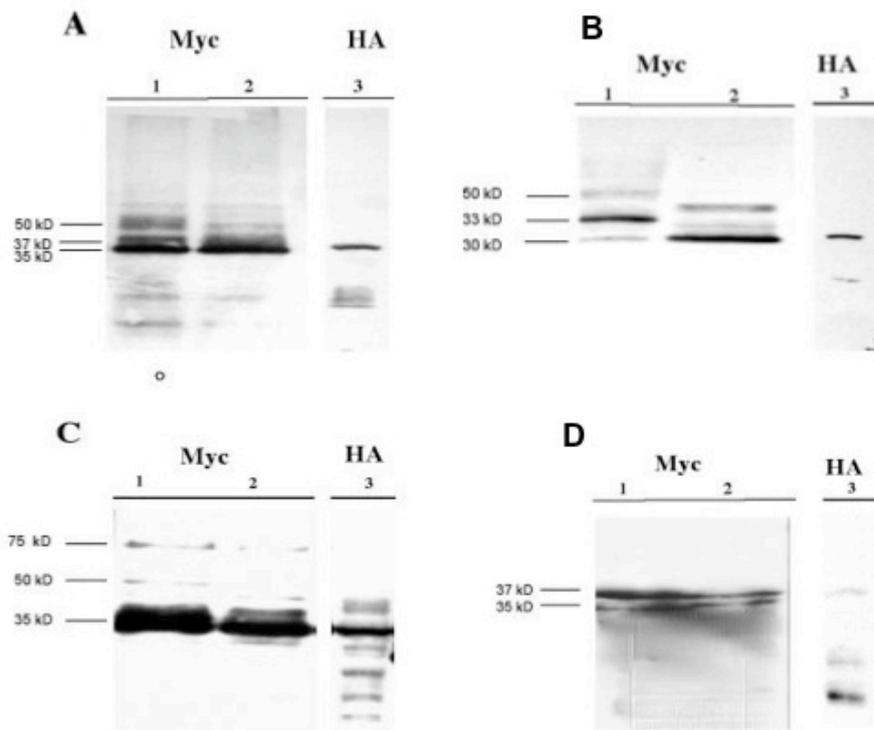


Abbildung 16 Molekulare Gewichtsbestimmung der BILF1-homologen vGPCRs. Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine in den Zellysaten erfolgte unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE und Detektion der Proteine über Antikörpermarkierung im Westernblot. A) HsynLCV1-GPCR, B) BILF1, C) PtroLCV1-GPCR und D) PpygLCV1-GPCR. Spur 1: Zellysate - deutliche Bande für das jeweilige Protein im Bereich von etwa 35kD nachweisbar; zusätzliche Nebenbanden sichtbar. Spur 2: Zellysate + Zugabe von PGNase F – deutliche Bande für das jeweilige Protein im Bereich von etwa 35 kD, aber eine Reduzierung der Nebenbanden nach der PGNase F Behandlung (deutet auf eine N-Glykosylierung der Proteine) und Spur 3: *In vitro* Expression (die Detektion der Proteine erfolgte im Gegensatz zur *in vitro* Expression (HA-Tag) durch Bindung des Antikörpers an den Myc-Tag) – eine deutliche Bande für die jeweiligen Proteine im Bereich von etwa 35 kD, wie in den Zellysaten sichtbar; weitere Reduzierung der Nebenbanden für den HsynLCV1-GPCR BILF1 und PtroLCV1-GPCR (weitere Modifizierung der Proteine (mögliche O-Glykosylierung)).

Sämtliche vGPCRs ließen sich im WB detektieren (siehe Abbildung 16 A-D, Spur 1). Das scheinbare MW der GPCRs im WB entsprach in etwa dem berechneten MW basierend auf der Aminosäuresequenz der einzelnen GPCRs (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20 Molekulargewicht der vGPCRs im Vergleich

vGPCRs	MW (berechnet)	MW (PGNase F Verdau)	MW (<i>in vitro</i>)
HsynLCV1	39,5 kD	~35 kD	~35 kD
PtroLCV1	35,7 kD	~35 kD	~35 kD
BILF1	34,5 kD	~31 kD	~31 kD
PpygLCV1	35,6 kD	~36 kD	~36 kD

* bestimmt mit MacVector™ 10.0

Da für vGPCRs außer für den PpygLCV1-GPCR Nebenbanden mit einem größeren MW detektierbar wurden, könnte dies auf eine starke Glykosylierung der GPCRs hindeuten, weil durch eine posttranslationale Glykosylierung eines Proteins sein Molekulargewicht vergrößert wird. Zusätzlich könnte auch eine Heterodimerisierung der GPCRs möglich sein, da Nebenbanden, die dem Doppelten des theoretisch ermittelten MW entsprachen, auftraten (siehe Abbildung 16 C 1, Spur 1).

PGNaseF ist eine Amidase, die fast alle Typen von N-Glykan-Ketten hydrolysieren kann. Die Zugabe von PGNaseF zu den Zelllysaten vor der SDS-Page ermöglichte daher eine genauere Aussage über den Grad der Glykolysierung und über das Molekulargewicht der einzelnen vGPCRs. Nach dem Verdau mit PGNase F war eine Reduzierung der Nebenbanden deutlich erkennbar (siehe Abbildung 16 A-C, Spur 2).

Da nach dem PGNase F Verdau weiterhin Nebenbanden, wenn auch schwächer sichtbar waren (siehe Abbildung 16, Spur 2), könnte dies auf weitere Modifikationen der vGPCRs zurückzuführen sein, die PGNase F resistent sind. Daher wurden die vGPCRs *in vitro* mittels des TNT[®] T7 Coupled Wheat Germ Extract System exprimiert, weil es hier zu keiner Modifizierung der exprimierten Proteine kommt. Von den rekombinanten Plasmiden (siehe Anhang 12.3) wurde jeweils 1 µg DNA eingesetzt. Die Größe der *in vitro*-Fusionsproteine wurde unter Verwendung eines geeigneten Größenstandards im WB kontrolliert. Wie in Abbildung 16, Spur 3 zu erkennen ist, entsprach die Bandengröße der einzelnen vGPCRs aber nach der *in vitro* Expression der Größe der Banden aus den Zelllysaten nach dem PGNase F Verdau (siehe auch Tabelle 18). Die Ergebnisse zeigten, dass man von einem hohen Anteil von N-Glykosylierungsstellen bei den Rezeptoren ausgehen kann und keine weitere messbare Modifikation der Rezeptoren vorlag. Damit untermauerten die Ergebnisse die zahlreichen, theoretisch ermittelten N-verknüpften Glykosylierungsstellen bei den untersuchten vGPCRs (siehe Anhang 12.5).

5.2.4 Lokalisation der vGPCRs in der transfizierten Zelle

Es sollten Zelllokalisationsstudien für HsynLCV1-GPCR, PpygLCV1-GPCR, PtroLCV1-GPCR und BILF1 durchgeführt werden. Dafür wurden HEK293-Zellen mit den Rezeptorkonstrukten (siehe Anhang 12.3) und dem Kontrollplasmid pEGFP-F transient transfiziert. 48h nach der

Transfektion wurden die Zellen permeabilisiert und die Rezeptoren mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie. Die ausgewählten Bilder sind repräsentativ für die jeweiligen GPCRs.

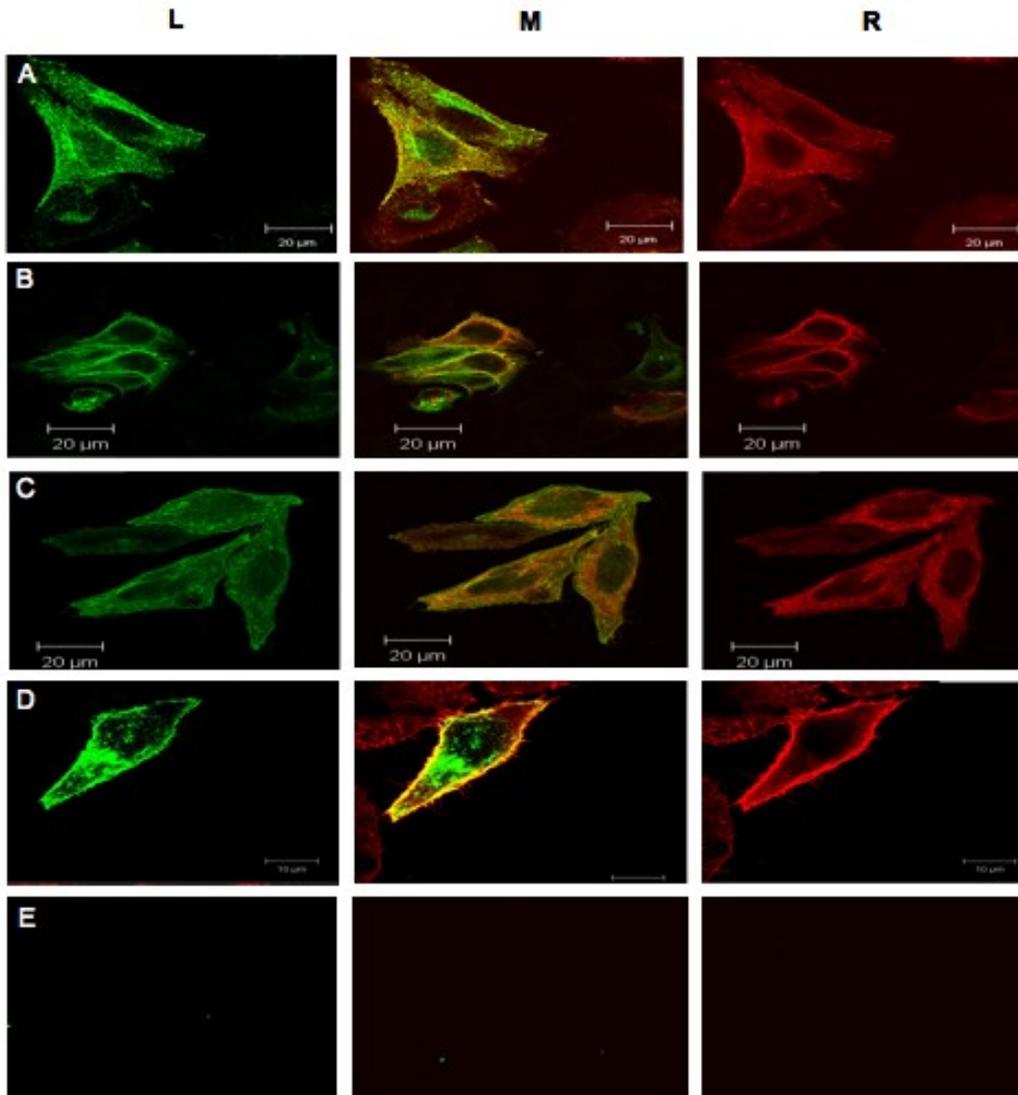


Abbildung 17 Zelluläre Lokalisation der vGPCR von Primaten-LCV. A: BILF1; B: PtroLCV1-GPCR; C: HsynLCV1-GPCR; D: PpygLCV1-GPCR; E: Negativ-Kontrolle (Leervektor). Die Bilder zeigen links (L) das Signal des grün fluoreszierenden Proteins (pEGFP-F), rechts (R) die Lokalisation des vGPCRs, welches mit einem Rhodamine Red-markierten Antikörper gegen den HA-Tag nachgewiesen wurde und in der Mitte (M) die überlagerten Signale des pEGFP-F Proteins und des Rhodamine Red-markierten Antikörpers (63 x Objektiv (H₂O)).

In den Bildern des rechten Abbildungsteils (Abbildung 17 A/R bis E/R) war jeweils ein spezifisches rotes Fluoreszenzsignal detektierbar, welches an zelluläre Strukturen gebunden war. Das Signal des pEGFP-F-Proteins, welches als Kontrolle eingesetzt wurde (siehe Abschnitt 3.2.10.3), ist in den linken Bildern sichtbar. Die Spezifität des Signals wurde im Vergleich zur

Negativ-Kontrolle bestätigt, bei der nur ein unspezifisches Hintergrundsignal sichtbar war (siehe Abbildung 17 E). Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die Signale auf die exprimierten Proteine zurückzuführen waren. Wie im mittleren Teil der Abbildung 17 (A/M und D/M) gezeigt, waren die vGPCRs von PpygLCV1 und PtroLCV1 mit eGFPF kolokalisiert und daher hauptsächlich an der äußeren Zellmembran lokalisiert. Abbildung 17 B/M zeigte eine Kolokalisation von eGFPF und BILF1. Allerdings wurde zusätzlich ein rotes Signal für BILF1 intrazellulär detektiert. Für den vGPCR von HsynLCV1 wurde keine Überlagerung des roten Fluoreszenzsignals mit dem grünen Signal des Kontrollplasmids an der äußeren Zellmembran sichtbar (siehe Abbildung 17 C/M). Dieser vGPCR war vorwiegend intrazellulär lokalisiert.

Die Untersuchung der Zelllokalisierung von HsynLCV1-GPCR und BILF1 zeigte ein ähnliches, zum Teil intrazelluläres Lokalisationsmuster, im Gegensatz zu den vorrangig an der Zelloberfläche lokalisierten vGPCRs (PtroLCV1- und PpygLCV1-GPCR) (siehe Abschnitt 5.2.4). Es sollte nun untersucht werden, ob dieses Lokalisationsmuster auch bei einer Kotransfektion der BILF1-homologen vGPCRs mit BILF1 sichtbar wird. Dafür wurde wie unter Abschnitt 5.2.4 verfahren. Die Kotransfektion erfolgte jedoch mit zwei vGPCRs, jeweils ein BILF1-homologer vGPCR zusammen mit BILF1. Die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung wurde mit zwei unterschiedlichen fluorochromemarkierten sekundären Antikörpern durchgeführt. Die Lokalisation von BILF1 wurde mit einem FITC-markierten Antikörper gegen den HA-Tag nachgewiesen und die BILF1-homologen vGPCRs mit einem Rhodamin- Red markierten Antikörper gegen den Myc-Tag.

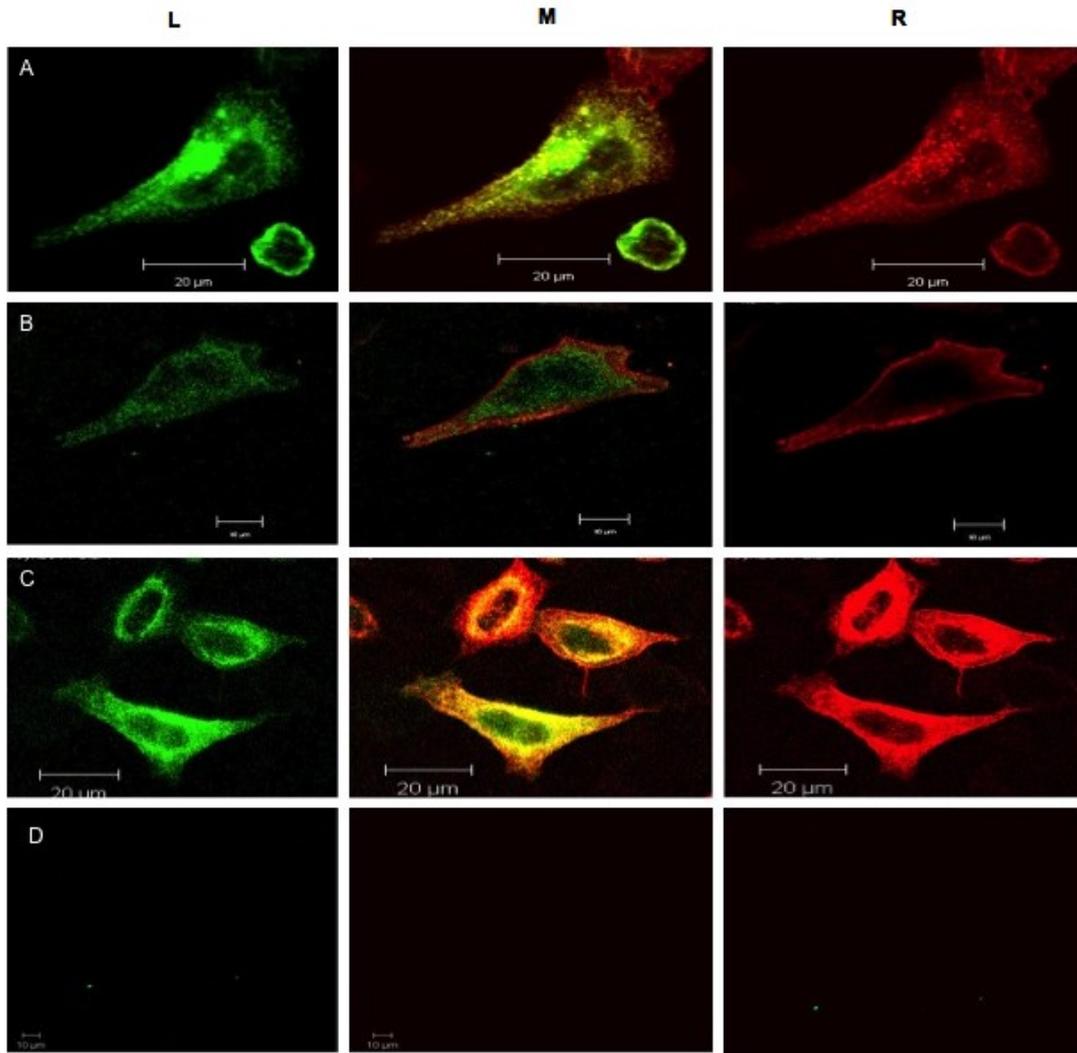


Abbildung 18 Kofloktation der Primaten-LCV-GPCRs mit BILF1. A: PtroLCV1-GPCR; B: PpygLCV1-GPCR; C: HsynLCV1-GPCR; D: Negativ-Kontrolle (Leervektor). Die Bilder in einer Spalte zeigen links die Lokalisation von BILF1, welcher mit einem FITC markierten-Antikörper gegen den myc-Tag nachgewiesen wurde, in der Mitte die überlagerten Signale von BILF1 (FITC-markiert gegen den Myc-Tag) und des jeweiligen vGPCRs (Rhodamine-Red markiert gegen den HA-Tag) und rechts die Lokalisation des jeweiligen vGPCRs, welcher mit einem Rhodamine-Red markierten-Antikörper gegen den HA-Tag nachgewiesen wurde (63 x Objektiv (H₂O)).

In der Abbildung 18 A/L bis C/L sind spezifische Fluoreszenzsignale für BILF1 und den jeweiligen BILF1-homologen GPCR (A/R bis C/R) sichtbar. Bei der Negativ-Kontrolle war nur ein unspezifisches Signal sichtbar (Abbildung 18 D). In Abbildung 18 A/M bis C/M waren die vGPCRs hauptsächlich an der äußeren Zellmembran lokalisiert und BILF1 intrazellulär. Zusätzlich konnte eine deutliche Kofloktation vom HsynLCV1-GPCR und BILF1 intrazellulär detektiert werden (Abbildung 18 C/M). Dies wurde im geringen Maß auch für PtroLCV1-GPCR beobachtet (Abbildung 18 A/M), hier waren vereinzelte überlagerte Signale des Rhodamine-Red markierten Antikörpers und des FITC-markierten Antikörpers sichtbar.

5.2.5 Lokalisation von BILF1 und HsynLCV1-GPCR im Endoplasmatischen Retikulum

Es sollte basierend auf den unter Abschnitt 5.2.4 beschriebenen Ergebnissen untersucht werden, ob BILF1 und HsynLCV1-GPCR verstärkt im ER lokalisiert sind. Eine überwiegende Lokalisation im ER könnte auf eine nicht korrekte Faltung der Rezeptoren schließen lassen. Die Rezeptoren würden in diesem Fall nicht weiter an die Zellmembran transportiert werden, sondern ins Zytosol geschleust und dort degradiert werden.

Für diesen Versuchsansatz wurden Zellen mit den entsprechenden Plasmiden BILF1 und HsynLCV1-GPCR, wie unter 5.2.4. beschrieben transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die vGPCRs und die Protein-Disulfid-Isomerase (PDi), die im Lumen des ERs lokalisiert ist, mittels indirekter Immunfluoreszenz markiert.

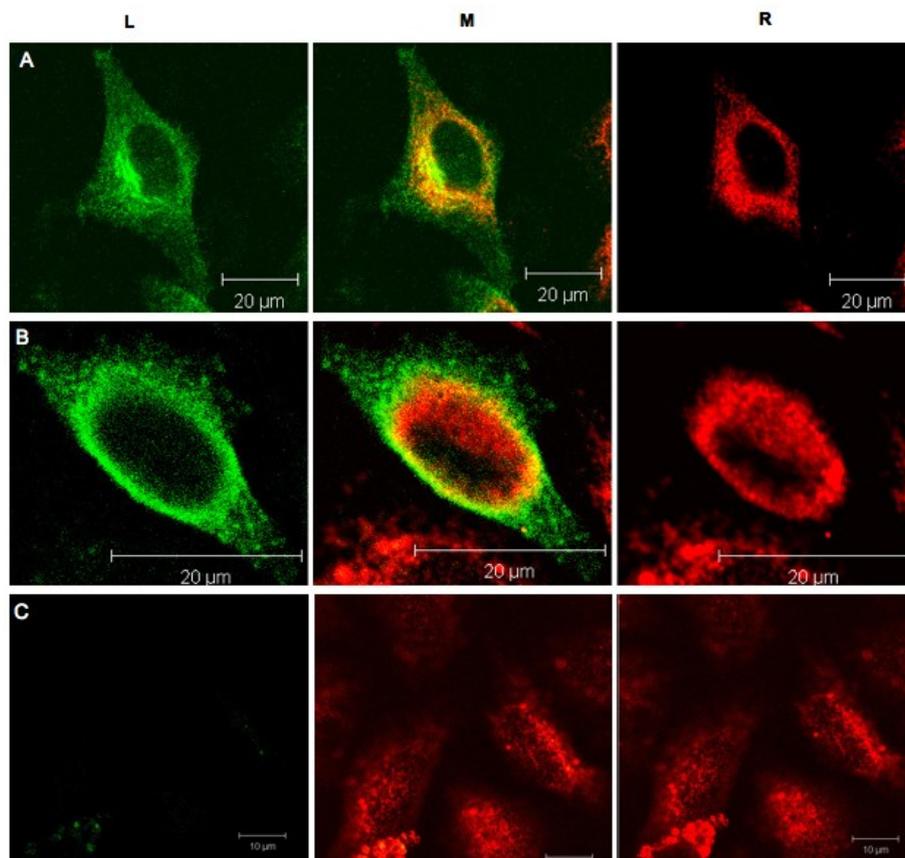


Abbildung 19: Überprüfung einer Kolo-kalisation von BILF1 und HsynLCV1-GPCR mit der PDi im ER. A: HsynLCV1-GPCR B: BILF1 C: Negativ-Kontrolle (Leervektor). Die Bilder in der linken Spalte zeigen die Lokalisation der vGPCRs, welche mit einem FITC-markierten Antikörper gegen den HA-Tag nachgewiesen wurden, in der rechten Spalte die Lokalisation der PDi markiert mit einem Rhodamine-Red spezifischen PDi-Antikörper und in der Mitte die überlagerten Signale des sekundären FITC markierten Antikörpers und des Rhodamine-Red spezifischen PDi-Antikörpers (63 x Objektiv (H₂O)).

In der Negativ-Kontrolle (siehe Abbildung 19 C) war das Signal der rot markierten PDi sichtbar. In Abbildung 19 A/M und B/M kam es zur keiner wesentlichen Überlagerung der Fluoreszenzsignale der FITC-markierten Antikörper, die mit dem jeweiligen HA-Tag des experimentierten Proteine (vGPCRs, BILF1 und HsynLCV1-vGPCRs) reagierten und des Rhodamine-Red spezifischen PDi-Antikörpers. Dies deutete darauf hin, dass die vGPCRs nicht vorrangig im ER lokalisiert waren und damit eine korrekte Faltung der GPCRs vorlag.

5.2.6 Internalisierung der konstitutiv aktiven GPCRs

Um zu überprüfen, ob die vGPCRs (HsynLCV1-GPCR, PpygLCV1-GPCR, PtroLCV1-GPCR und BILF1) in die Zelle internalisiert werden und um eine Aussage über die relative Internalisierungsrate zu treffen, wurde ein „Antibody-Feeding“ Versuch durchgeführt. Dafür wurden HEK293-Zellen mit den Rezeptorkonstrukten (siehe Anhang 12.3) transient transfiziert. Um die mit HA-markierten Rezeptoren an der Zelloberfläche zu detektieren und die Internalisierung der Rezeptoren zunächst zu vermeiden, erfolgte die Zugabe eines primären Antikörpers bei 4 °C, ohne die Zellen zu permeabilisieren. Anschließend wurden die Zellen in zwei Versuchsansätzen entweder fixiert oder bei 37 °C inkubiert, um die Internalisierung der Rezeptoren zu induzieren. Im ersten Versuchsansatz wurden die nicht-internalisierte Rezeptoren vor der Permeabilisierung der Zellen mit einem sekundären FITC-markierten Antikörper gerichtet gegen den primären Antikörper nachgewiesen. Im dem zweiten Versuchsansatz erfolgte der Nachweis der internalisierten Rezeptoren nach der Permeabilisierung der Zellen mit einem sekundären Rhodamin- Red markierten Antikörper gerichtet gegen primären Antikörper. Mock-transfizierte Zellen wurden in dem Experiment als Kontrolle für das spezifische Binden der Antikörper an die HA-markierten Rezeptoren eingesetzt.

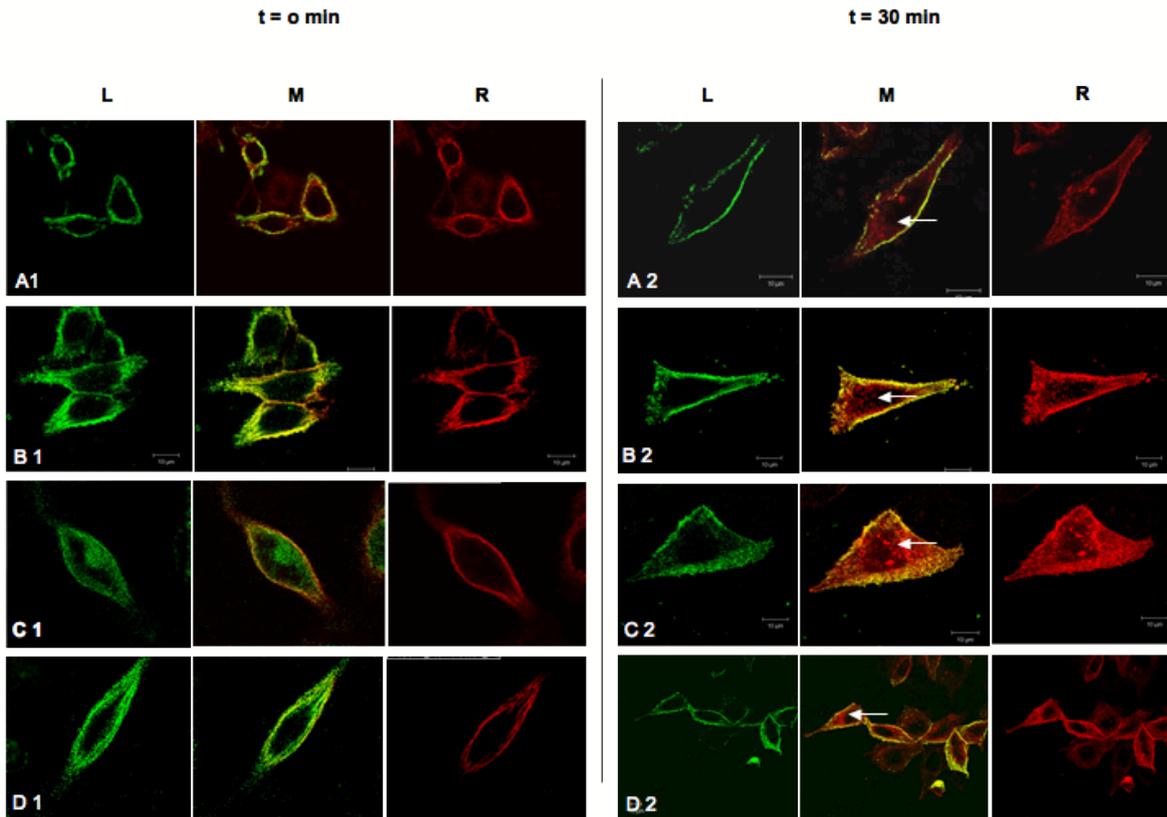


Abbildung 20 Internalisierungseigenschaften der vGPCRs („Antibody Feeding“ Versuch). HEK293-Zellen wurden transient mit BILF1 (Reihe A1 und A2), HsynLCV1-GPCR (Reihe B1 und B2), PpygLCV1-GPCR (Reihe C1 und C2) und PtroLCV1-GPCR (Reihe D1 und D2) transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Rezeptoren mit einem primären Antikörper gerichtet gegen den HA-Tag der exprimierten Proteine für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Folgend wurden die Zellen entweder sofort fixiert (t=0 min Reihe A1, B1, C1 und D1) oder bei 37°C für 30 min inkubiert, um die Internalisierung der Rezeptoren zu induzieren (t=30 min A2, B2, C2 und D2). In einem Versuchsansatz wurden die an der Zelloberfläche befindlichen Rezeptoren mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper (grün) gerichtet gegen den primären Antikörper vor der Permeabilisierung der Zellen nachgewiesen (linke Spalte), während im zweiten Versuchsansatz internalisierte Rezeptoren nach der Permeabilisierung mit einem sekundären Rhodamin-konjugierten Antikörper (rot) gerichtet gegen den primären Antikörper erfasst werden sollten (rechte Spalte). Die Pfeile auf den Bildern in der mittleren Spalte (rechte Blatthälfte) zeigen Transportversikel mit internalisierten Rezeptoren. (63 x Objektiv (H₂O)).

Abbildung 20 zeigt repräsentative Analysen der Internalisierung von PtroLCV1-GPCR, BILF1, HsynLCV1-GPCR und PpygLCV1-GPCR mittels CLSM. Alle untersuchten vGPCRs wurden in die Zelle internalisiert, mit einer möglichen hohen Internalisierungsrate (Spalten A2/M-D2/M), da viele Transportversikel mit den rot-markierten Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. Ein Fluoreszenzsignal konnte für Mock-transfizierte Zellen nicht ermittelt werden (Daten nicht dargestellt). Zusätzlich konnte zum Zeitpunkt 0 keine Internalisierung der vGPCRs ermittelt werden (Spalten A1/M-D1/M).

5.2.7 Zelloberflächenexpression der vGPCRs

In funktionellen Analysen sollte die Zelloberflächenexpression und die putative konstitutive Aktivität von vGPCRs aus LCV der Genogruppe I (PtroLCV1) und der Genogruppe II (HsynLCV1 und PpygLCV1) in transient transfizierten HEK293-Zellen ermittelt werden. Diese Experimente wurden im Vergleich zu BILF1 durchgeführt, da für diesen Rezeptor eine konstitutive Expression nachgewiesen worden war (Paulsen et al., 2005). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen wie unter Abschnitt 3.2.9.3 beschrieben fixiert und die Zelloberflächenexpression im ELISA bestimmt.

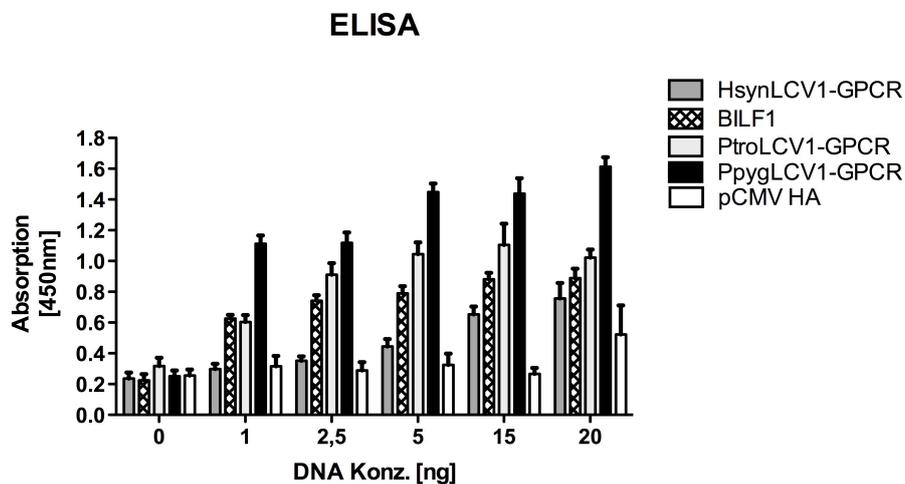


Abbildung 21 Quantifizierung der Expression der BILF1-homologen vGPCRs mittels ELISA. HEK-293 Zellen wurden jeweils mit den HA-markierten Rezeptorkonstrukten, dem rekombinanten Plasmids des chimären G-Protein (Gqi4myr) und dem Leervektor pCMV-HA als Negativ-Kontrolle (grau dargestellt) transfiziert. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler vom Mittelwert (SEM).

Wie in Abbildung 20 dargestellt, kam es unter diesen Versuchsbedingungen zu einer konzentrationsabhängigen Expression des BILF1 und der untersuchten LCV-GPCRs an der Zelloberfläche. Die gemessene Absorption der einzelnen vGPCRs überstieg die der Negativ-Kontrolle deutlich. Die Expression von PpygLCV1-GPCR und PtroLCV1-GPCR, und damit ihre Lokalisation an der äußeren Zellmembran waren stärker als die von HsynLCV1-GPCR und BILF1. Diese Werte bestätigten die in den Zelllokalisationsversuchen gemachte Beobachtung, dass grössere Mengen der PpygLCV1- und PtroLCV1-GPCRs an der Zellmembran lokalisiert waren, als der HsynLCV1-GPCR und BILF1.

5.2.8 Konstitutive Aktivität der vGPCRs und Bestimmung der vGPCRS Untereinheit, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB führt

Die konstitutive Aktivität der vGPCRs wurde in CREB-Luziferase-Versuchen (siehe Abschnitt 3.2.9) analysiert. Die Versuche wurden in Anwesenheit des chimären G-Proteins, Gqi4myr, durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.9). vGPCRs, welche ihr Signal über G α i weitergeben, wie im Fall von BILF1 lösen nur in Anwesenheit von Gqi4myr ein Signal aus. Hingegen können vGPCRs, die durch die G α s- und G α q-Untereinheit den Transkriptionsfaktor CREB aktivieren, dies ohne exogenes G α -Protein (siehe Abbildung 22).

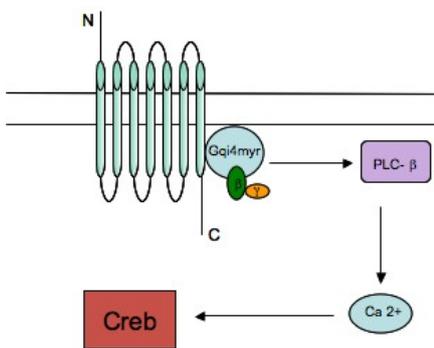


Abbildung 22 Veränderte Signalweitergabe durch die Bindung des chimären G-Proteins Gqi4myr an den G α i-gekoppelten vGPCR. Mit Hilfe des chimären G-Proteins kommt es zur Signalumwandlung von G α i zu G α q, einer Aktivierung der Signalkaskade, die folgend den Transkriptionsfaktor CREB aktiviert.

HEK293-Zellen wurden transient mit steigender Konzentration der jeweiligen Rezeptor-DNA (siehe Anhang 12.3) sowie einer konstanten Konzentration des chimären G-Proteins (Gqi4myr) und des CREB-Luc-cis-Reporterplasmids transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.9). BILF1 signalisiert konstitutiv über die G α i-Untereinheit und wurde deshalb in diesem Versuchsaufbau als Positiv-Kontrolle und der Leervektor pCMV-HA als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

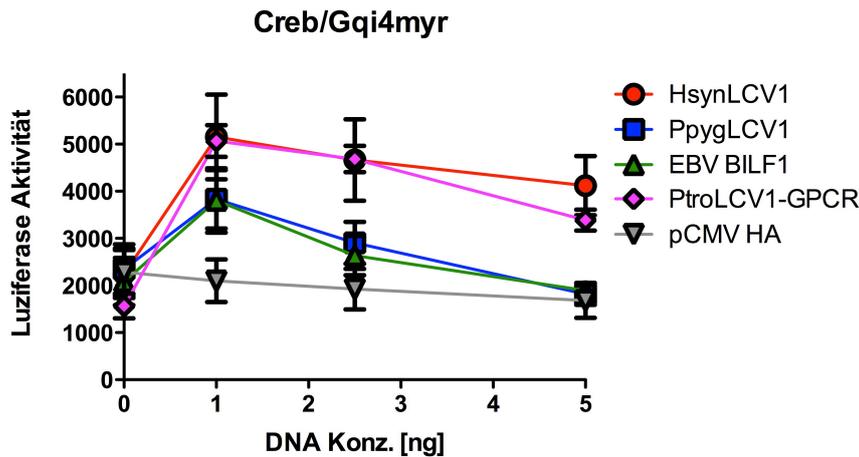


Abbildung 23 Putative konstitutive Aktivität von HsynLCV1-GPCR, PpygLCV1-GPCR und PtroLCV1-GPCR. HEK293-Zellen wurden jeweils mit einem der Rezeptorkonstrukten bzw. dem Leervektor, so wie jeweils dem rekombinanten Plasmids des G-Proteins (Gqi4myr) und dem Reporterplasmid CREB kotransfiziert. BILF1 wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt und gemittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler vom Mittelwert (SEM).

In gleicher Weise wie für BILF1 war mit Anstieg der DNA-Konzentration eine steigende CREB-Aktivität für den HsynLCV1-GPCR, den PpygLCV1-GPCR und den PtroLCV1-GPCR nachweisbar (siehe Abbildung 23). Es kam zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des Signals in Anwesenheit von Gqi4myr, im Gegensatz zum Aktivitätslevel des Leervektors. Dies lässt den Schluss zu, dass diese vGPCRs konstitutiv aktiv waren und ihr Signal über G α i weitergeben.

Zur Verifizierung der Aktivierung der endogenen G α i-Untereinheit durch PpygLCV1-GPCR, HsynLCV1-GPCR und PtroLCV1-GPCR wurde die Fähigkeit dieser Rezeptoren getestet, die durch Forskolin stimulierte CREB-Aktivität zu inhibieren. Da die zu untersuchenden Rezeptoren über die G α i-Untereinheit ihr Signal weiterleiten, muss mit steigenden Rezeptorkonzentrationen auch eine steigende Inhibierung der durch Forskolin stimulierten Adenylatcyclase zu beobachten sein (siehe Abbildung 24).

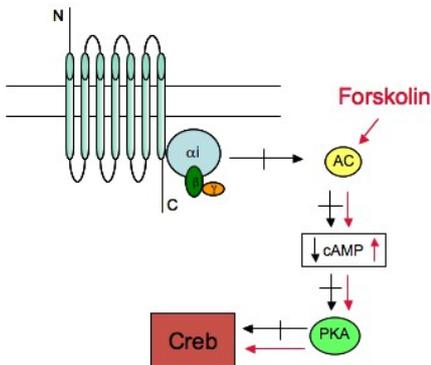


Abbildung 24 Inhibierung der Adenylatcyclase durch die G α i-Untereinheit des vGPCRs und gleichzeitige Stimulierung der Adenylatcyclase durch Forskolin. Durch die Stimulierung der Adenylatcyclase durch Forskolin kommt es zu einem erhöhten intrazellulären cAMP Spiegel, der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und der Transkription von CREB. Eine Signalweitergabe durch die G α i-Untereinheit wiederum inhibiert die Adenylatcyclase und die CREB Aktivität.

Es sollte eine Inhibierung der zuvor durch Forskolin stimulierten Adenylatcyclase durch die Signalweitergabe der G α i-Untereinheiten der jeweiligen vGPCRs überprüft werden. Dafür wurden HEK293-Zellen mit steigenden Konzentrationen der jeweiligen Rezeptorkonstrukte (siehe Anhang 12.3) sowie einer konstanten Konzentration des CREB-Luc-cis-Reporterplasmids transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion erfolgte die Stimulierung der Adenylatcyclase durch Zugabe von Forskolin (siehe Abschnitt 3.2.9.1).

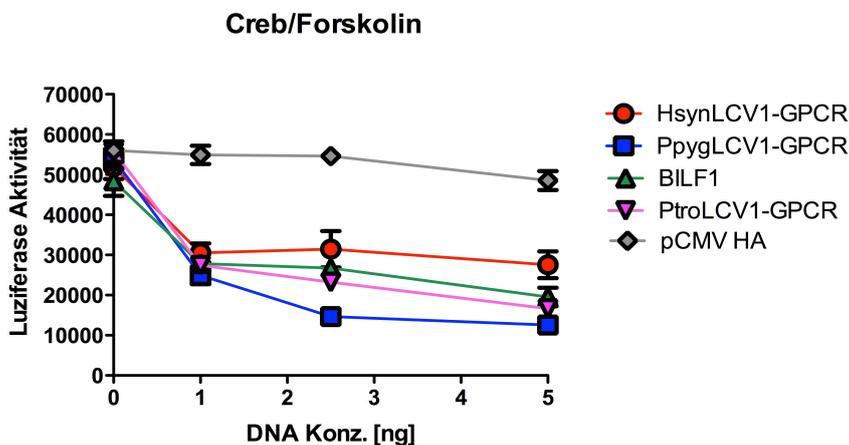


Abbildung 25 Inhibierung der zuvor stimulierten Adenylatcyclase durch die Signalweitergabe der G α i-Untereinheit. HEK293-Zellen wurden jeweils mit den Rezeptorkonstrukten HynLCV1-GPCR, PpygLCV1-GPCR, PtroLCV1-GPCR transfiziert. Als Positiv-Kontrolle wurde BILF1 und als Negativ-Kontrolle der Leervektor pMCV-HA eingesetzt. Nach 24 Stunden erfolgte die Stimulierung der Adenylatcyclase durch Forskolin. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt und gemittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Abbildung 26 zeigt, dass HsynLCV1-GPCR, PpygLCV1-GPCR und PtroLCV1-GPCR im Gegensatz zum Leervektor in der Lage waren, die durch Forskolin induzierte CREB-Aktivität in

einer konzentrationsabhängigen Weise durch Stimulierung des endogenen G α i-Proteins zu inhibieren.

5.2.9 Ausschluss der Signalweitergabe über die G α s- Untereinheit

vGPCRs, welche ihr Signal durch die G α s-Untereinheit weitergeben, können durch die Stimulierung der Adenylatcyclase den Transkriptionsfaktor CREB aktivieren. Hingegen kommt es zu einer Inhibierung der Adenylatcyclase, wenn vGPCRs ihr Signal über die G α i-Untereinheit triggern.

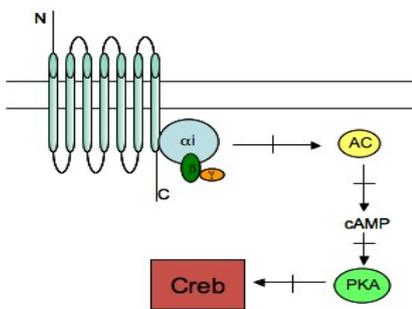


Abbildung 26 Inhibition der Adenylatcyclase durch die Signalweitergabe der G α i-Untereinheit. Bei einer Inhibition der Adenylatcyclase (AC) kommt es zu keinem erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel, keiner Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und auch keiner Transkription von CREB.

Zur Überprüfung einer potentiellen Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB über die G α s-Untereinheit wurden HEK293-Zellen mit den Rezeptorkonstrukten (siehe Anhang 12.3) ohne exogenes G α -Protein transient transfiziert. Als Kontrollen wurden BILF1 und der Leervektor pCMV-HA verwendet.

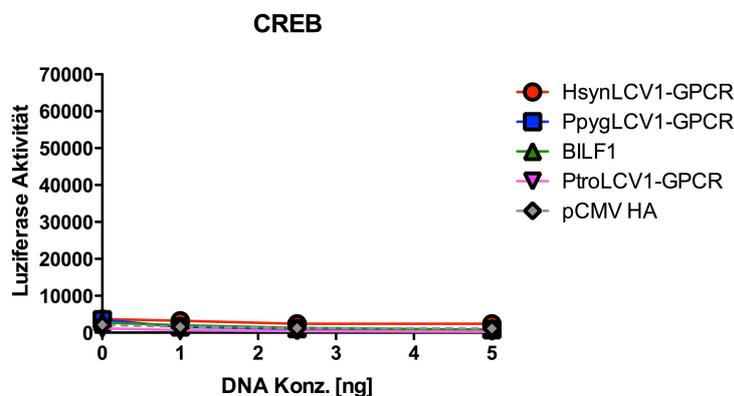


Abbildung 27 Putative Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB durch die G α s-Untereinheit. HEK293-Zellen wurden jeweils mit den Rezeptorkonstrukten HsynLCV1-GPCR, PpygLCV1-GPCR, PtroLCV1-GPCR, BILF1, dem Leervektor pCMV-HA und dem Reporterplasmid CREB kotransfiziert. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten keine Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB ohne eine Kotransfektion des exogenen chimären G-Proteins (siehe Abbildung 27). Es kam zu keinem konzentrationsabhängigen Anstieg des Signals. Damit kann eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB über die G α s-Untereinheit der untersuchten vGPCRs ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der Transkriptionsfaktor CREB über die G α i-Untereinheit aktiviert wird.

5.2.10 Aktivierung des nukleären Faktors kappaB (NF κ B)

Zusätzlich zu der zuvor beschriebenen Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB sollte eine potentielle Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B durch vGPCRs von LCV der Genogruppe I und II überprüft werden. Dafür wurden in NF κ B-Luciferase-Versuchen HEK293-Zellen jeweils mit dem NF κ B-Reporterplasmid und den Rezeptorkonstrukten von HsynLCV1-GPCR, PpygLCV1-GPCR und PtroLCV1-GPCR kotransfiziert (siehe Abschnitt 3.2.9.2). Die Rezeptoren BILF1 und ORF74 können laut Literatur den Transkriptionsfaktor NF κ B in COS-7 Zellen aktivieren (McLean et al., 2004; Paulsen et al., 2005). Deshalb wurden sie in dem Versuch als Positiv-Kontrollen eingesetzt.

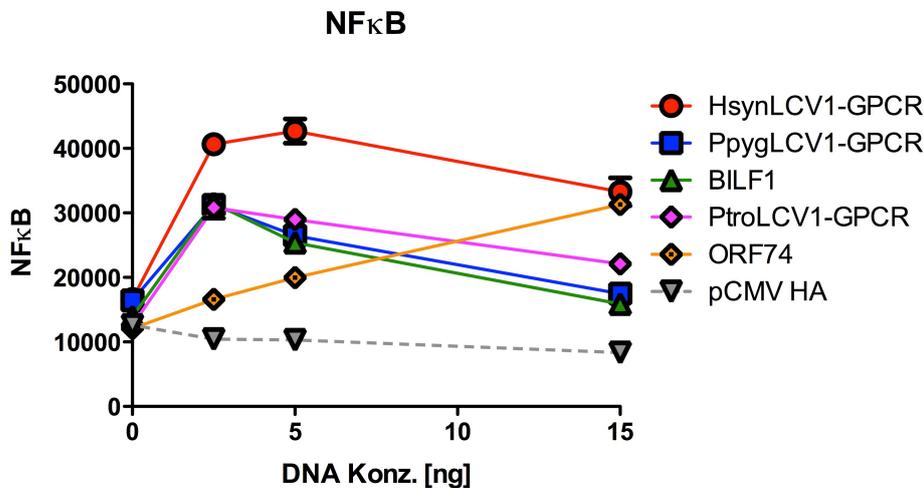


Abbildung 28 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB. HEK293-Zellen wurden transient mit steigender Konzentrationen der Rezeptor-DNA (0 ng, 1 ng, 2,5 ng, 5 ng und 15 ng) und dem Reporterplasmid kotransfiziert und die Luziferase-Aktivität bestimmt. Als Negativ-Kontrolle wurde der Leervektor pCMV-HA verwendet. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt und gemittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Es kam zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der NFκB-Aktivität bei allen untersuchten vGPCRs in transient transfizierten HEK293-Zellen. Das Aktivitätslevel lag für alle getesteten GPCRs über dem des Leervektors pCMV-HA. Die NFκB-Aktivität des HsynLCV1-GPCR war besonders stark. Das Aktivitätslevel lag über dem der Positiv-Kontrollen (Abbildung 28).

5.2.11 Stimulierung des nukleären Faktors aktivierter T-Zellen (NFAT)

In NFAT-Luziferase-Versuchen (siehe Abschnitt 3.2.9.2) sollte eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT durch vGPCRs aus LCV der Genogruppe II (HsynLCV1/PpygLCV1), und durch vGPCRs von LCV der Genogruppe I (PtroLCV1 und BILF1) untersucht werden. Daten über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT durch BILF1 waren laut Literatur nicht bekannt. Hingegen ist eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT durch den vGPCR ORF74, exprimiert vom humanen Herpesvirus 8, beschrieben worden (McLean et al., 2004). Dieser Rezeptor wurde in den Versuchen als Positiv-Kontrolle eingesetzt. HEK293-Zellen wurden jeweils mit steigenden Konzentrationen der Rezeptorkonstrukte (siehe Anhang 12.3) und einer konstanten Konzentration des NFAT-Reporterplasmids transient transfiziert (siehe Abbildung 29).

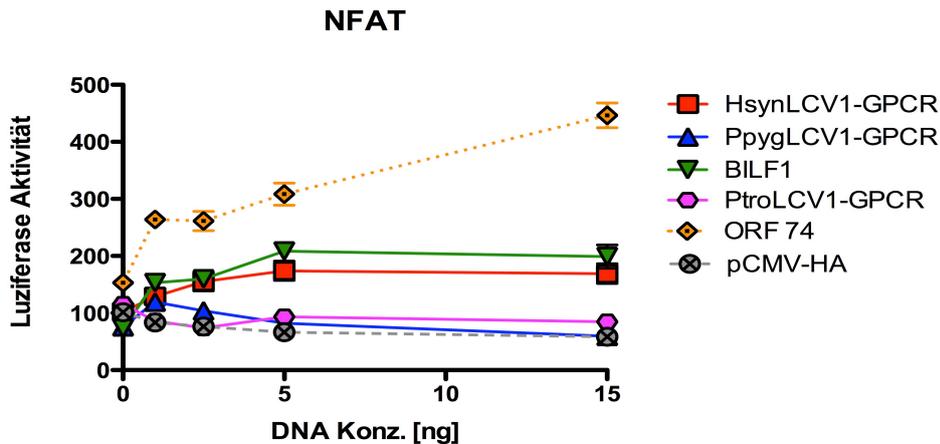


Abbildung 29 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT. HEK293-Zellen wurden transient kotransfiziert mit dem NFAT-Reporterplasmid und steigenden Konzentrationen der Rezeptor-DNA (0 ng, 1 ng, 2,5 ng, 5 ng und 15 ng) und die Luciferaseaktivität bestimmt. Als Negativ-Kontrolle wurde der Leervektor pCMV-HA und als Positiv-Kontrolle der ORF 74 verwendet. Die Versuche wurden dreifach durchgeführt und gemittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Ein konzentrationsabhängiger Anstieg der NFAT-Aktivität konnte für zwei der untersuchten vGPCRs detektiert werden: HsynLCV1-GPCR und BILF1. Ihre NFAT- Aktivität war zwar um die Hälfte geringer als die des ORF74, unterschied sich aber deutlich vom Aktivitätslevel des Leervektors pCMV HA. Für PpygLCV1-GPCR und PtroLCV1-GPCR konnte keine NFAT-Aktivität ermittelt werden, d.h. diese vGPCRs konnten den Transkriptionsfaktor NFAT nicht aktivieren (Abbildung 29).

5.2.12 Hemmung der vGPCRs induzierten Signalkaskadewege durch selektive Inhibitoren

Um die Signalkaskadewege zu identifizieren, die zur NFAT-Aktivität in HsynLCV1-GPCR- und BILF1-exprimierenden HEK293-Zellen führen wurden die Zellen mit Signalkaskadeinhibitoren behandelt. Bei den Inhibitoren handelte es sich um Pertussis Toxin (PT), das die Untereinheit $G\alpha_i$ inhibiert und den PLC-Inhibitor „U73122“, der zur Inaktivierung des $G\alpha_q$ -Signalkaskadewege führt (siehe Abschnitt 3.2.9.2).

HEK293-Zellen wurden mit einer Konzentration von 5 ng des jeweiligen Rezeptorplasmids (siehe Anhang 12.3) und 100 ng des NFAT-Reporterplasmids kotransfiziert. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde eine Hälfte der Zellen mit einem der entsprechenden Inhibitoren

behandelt, die andere Hälfte der Zellen blieb unbehandelt und diente zur Kontrolle des Inhibierungsgrades. Der ORF74 diente als Positiv-Kontrolle da die Signalkaskadewege die zur Aktivierung von NFAT durch ORF74 führen bekannt sind (McLean et al., 2004).

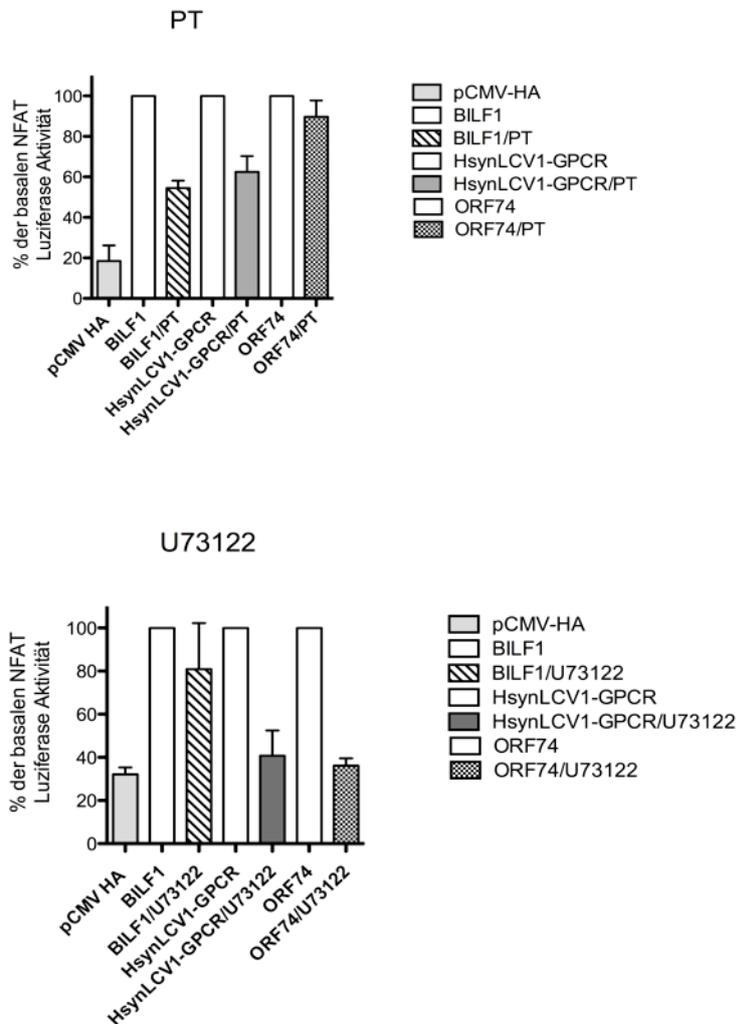


Abbildung 30 Hemmung der konstitutiven NFAT-Aktivierung von BILF1 und HsynLCV1-GPCR durch PT und U73122. HEK293-Zellen wurden mit dem NFAT-Reporterplasmid und einer Konzentration von 5ng der Rezeptorplasmide transfiziert. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit PT (100ng) oder U73122 (10µM) behandelt. Die Daten präsentieren die prozentuale Inhibierung der basalen Rezeptorexpression (farbig umrandete Balken) im Gegensatz zu den Kontrollen (Zellen transfiziert mit den Rezeptorkonstrukten, aber ohne Behandlung mit den Inhibitoren) und der unspezifischen zellulären Aktivität (grau umrandeter Balken). Die Versuche wurden dreifach durchgeführt und gemittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Der Einsatz von PT zeigte eine 50 % Inhibierung der basalen NFAT-Aktivierung für BILF1 und eine 40 % Inhibierung der NFAT-Aktivität für HsynLCV1-GPCR (Abbildung 30). Diese Ergebnisse zeigten, dass BILF1 und HsynLCV1-GPCR über die G α i-Untereinheit NFAT

aktivieren können. Der ORF74 aktiviert NFAT über die $G\alpha_q$ -Untereinheit. Eine Inhibierung der $G\alpha_i$ -Signalweitergabe durch PT war dementsprechend nicht zu erwarten und konnte, unter Berücksichtigung der Fehlerbalken, nicht detektiert werden.

Der Einsatz des Inhibitors U73122 zeigte eine Hemmung der Aktivität von bis zu 60 % der basalen NFAT-Aktivität vom HsynLCV1-GPCR und ORF74. Die Inhibierung der NFAT-Aktivität war hingegen für BILF1 nur geringfügig nachweisbar. Damit zeigten die Ergebnisse, dass der ORF74 NFAT über die $G\alpha_q$ -Untereinheit und BILF1 nur über die $G\alpha_i$ -Untereinheit aktivieren konnte. Im Gegensatz zu BILF1 und zum ORF74 konnte der HsynLCV1-GPCR über beide Untereinheiten ($G\alpha_i$ und $G\alpha_q$) NFAT aktivieren (Abbildung 30).

Diskussion

6.1 Sequenzaufklärung bei LCV von nicht-humanen Primaten

In früheren Studien von LCV wurden kurze Sequenzabschnitte im DPOL-Gen von 26 LCV amplifiziert und phylogenetisch analysiert. Der phylogenetische Stammbaum zeigte drei Genogruppen: eine Genogruppe bestand aus LCV von Neuweltaffen (Genogruppe III) und zwei weitere aus LCV von Altweltaffen (Genogruppe I und II). Zur Genogruppe I zählten zahlreiche LCV von hominoiden Primaten, inklusive EBV. Die Genogruppe II war kleiner und umfasste zwar auch LCV von hominoiden Primaten, aber nicht vom Schimpansen und vom Menschen. Gorilla-LCVs existierten in beiden Genogruppen, welches zu der Hypothese führte, dass zwei phylogenetische Linien bei LCV von Altweltaffen existieren und somit auch ein neues unbekanntes humanes LCV in der Genogruppe II (Ehlers et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden Sequenzinformationen von LCV der Genogruppen I und II generiert, die eine Spanne von vier Genen umfassten. Dadurch wurde die Qualität der phylogenetischen Analyse von LCV verbessert und eine weitergehende Interpretation der Evolution von LCV ermöglicht. Des Weiteren wurde zur Überprüfung der von Ehlers et al. aufgestellten Hypothese nach neuen unbekanntem LCV der Genogruppe II im Schimpansen (*Pan troglodytes*) gesucht.

6.1.1 Erzeugung kontinuierlicher Sequenzabschnitte vom MDBP- bis zum DPOL-Gen von LCV der Genogruppe I und deren Analyse

Zuerst wurden Sequenzen von neun LCV aus Altweltaffen und zwei Sequenzen von Neuweltaffen der Genogruppe I amplifiziert und sequenziert. Ein Vergleich dieser Sequenzen von gB bis DPOL zeigte, dass LCV aus Altweltaffen (Genogruppe I), im Gegensatz zu LCV aus Neuweltaffen (Genogruppe III), eine hohe Verwandtschaft zu EBV aufwiesen (siehe Abschnitt 4.1.1). Die Abgrenzung der Neuweltaffen-LCV von den Altweltaffen-LCV war vergleichbar mit der DPOL-basierten phylogenetischen Analyse von Ehlers et al., 2003. In dieser Analyse bilden Neuwelt-LCV eine eigenständige Genogruppe (Genogruppe III), die sich deutlich von Altwelt-

LCV abgrenzt. Auffallend und bis jetzt nicht publiziert war die hohe prozentuale Identität der Nukleinsäuresequenzen (99 %) bzw. der Aminosäuresequenzen (100 %) von drei LCV der Genogruppe I (MfasLCV1, PpygLCV2 und HsynLCV2) (siehe Abschnitt 4.1.1). Es handelt sich bei MfasLCV1, PpygLCV2 und HsynLCV2 offenbar um eine LCV-Spezies in drei verschiedenen Wirten. Dieses Ergebnis deutete auf einen Interspeziestransfer hin, da die Wirte dieser Viren, *Macaca fascicularis*, *Pongo pygmaeus* und *Hylobates syndactylus* zum Teil das gleiche Verbreitungsgebiet in Südostasien aufweisen. Weitere Hinweise für horizontale Transmissionen konnten im Laufe der Evolution von LCV erhalten werden. So gehört beispielsweise EBV zu einer phylogenetischen Linie, die möglicherweise durch einen Interspeziestransfer von einem Altweltaffen entstanden ist (Ehlers et al., 2009). Die evolutionäre Entstehung von EBV und der Interspeziestransfer innerhalb der LCV der Genogruppe I weisen darauf hin, dass es offenbar keine absolute Speziespezifität der einzelnen LCV gibt. Vielmehr ist die Möglichkeit einer zoonotischen Übertragung von LCV gegeben.

6.1.2 Erzeugung von kontinuierlichen Sequenzabschnitten vom MBDP-DPOL-Gen von LCV der Genogruppe II

PCR mit degenerierten Primern ist eine effiziente Methode für die Detektion von zuvor unbekanntem Viren (Lacoste et al., 2000). Jedoch ist diese Methode bei mehrfach infizierten Individuen limitiert, da in der Regel nur eine virale Sequenz amplifiziert wird (Prepens et al., 2007). Beispielsweise sind Schweine mit drei verschiedenen lymphotropen Herpesviren (PLHV-1, PLHV-2 und PLHV-3) infiziert (Chmielewicz et al., 2003). In PCR-Reaktionen mit degenerierten Primern konnten zunächst PLHV-1 und PLHV-2 detektiert werden (Ehlers et al., 1999), aber es dauerte zwei Jahre und bedurfte einer umfassenden Sammlung von Blut- und Gewebeproben aus Schweinen, um mit dieser Methode neben PLHV1 und PLHV2 auch PLHV-3 zu identifizieren (Chmielewicz et al., 2003).

Ähnlich limitiert war die Effizienz der Methode für die Detektion von LCV der Genogruppe II im Bereich des gB- bzw. MBDP-Gens, da die untersuchten Gibbons, Orang-Utans und Gorillas mit LCV der Genogruppen I und II infiziert waren. In den entsprechenden DNA-Proben kam es fast immer zu einer Amplifikation der höher prävalenten LCV der Genogruppe I. Deshalb wurden die degenerierten Primer stärker auf die Genogruppe II angepasst. In einem „Alignment“ wurden für die Entwicklung eines degenerierten Primersets

Sequenzen von Gammaherpesviren mit naher Verwandtschaft zu LCV der Genogruppe II, unter Ausschluss von Sequenzen von LCV der Genogruppe I, ermittelt. Erfolgte die Amplifikation eines LCV der Genogruppe II im Bereich des gB- oder des MDBP-Gens wurden die neuen Sequenzen verwendet, um ein auf das LCV der Genogruppe II besser passendes Primerset zu entwickeln. Diese Vorgehensweise wurde wiederholt bis alle LCV der Genogruppe II im gB- und MDBP-Gen amplifiziert waren. Die Amplifikation von GgorLCV2 gestaltete sich aber besonders schwierig, da eine Abstimmung der degenerierten Primer auf die Genogruppe II nicht ausreichend war. Hier bedurfte es zusätzlich einer umfassenden Sammlung von Blut- und Gewebeprobe aus Gorillas für die Detektion von GgorLCV2 im gB- und MDBP-Gen.

Die Effizienz der generischen PCR ist bei Wirtsspezies, die mit mehreren Herpesviren infiziert sind, wie für PLHV3 bei Schweinen und GgorLCV2 für Gorillas gezeigt werden konnte, stark limitiert. Ein erfolgreicher Nachweis ist abhängig vom untersuchten Probenmaterial und von der Positionierung auf dem Genom und Sequenz/Modifizierung der degenerierten Primer.

6.1.3 Suche nach unbekanntem LCV der Genogruppe II

In dieser Arbeit wurde die Hypothese von Ehlers und Mitarbeitern (Ehlers et al., 2003), dass ein humanes LCV der Genogruppe II existieren könnte, mit zwei experimentellen Ansätzen überprüft.

Zum einen wurden für phylogenetische Analysen zusätzliche Sequenzinformationen von LCV der Genogruppe I und II vom MDBP- bis DPOL-Gen generiert. Es folgte die Identifizierung des gB-Gens und darauf basierend die phylogenetische Analyse. Durch die zusätzlichen Sequenzinformationen konnte die Qualität der phylogenetischen Analyse, insbesondere die Auflösung innerhalb der Genogruppe II im Vergleich zu vorherigen Analysen verbessert werden. Der Stammbaum zeigte die statistisch gut belegte Einteilung der hominoiden LCV in die Genogruppen I und II und die ausschließliche Zuordnung von LCV aus Schimpansen oder vom Menschen in die Genogruppe I.

Zusätzlich zu den phylogenetischen Analysen wurde nach einem unbekanntem LCV der Genogruppe II gesucht. In einem „Alignment“ wurden die neu generierten Sequenzinformationen von LCV der Genogruppen I und II vom MDBP- bis DPOL-Gen zu Grunde gelegt, um konservierte Sequenzbereiche innerhalb der jeweiligen Genogruppen zu

bestimmen. Basierend darauf wurde für die Suche nach LCV der Genogruppe II ein auf diese Genogruppe abgestimmtes Primerset zur Amplifikation von gB-Sequenzen entwickelt. In PCR-Reaktionen mit Material vom Gorilla-, Orang-Utan-, Gibbon und vom Menschen wurde die Selektivität dieses Primersets überprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass keine LCV der Genogruppe I aber mit einer hohen Effizienz alle bekannten LCV der Genogruppe II detektiert werden konnten. Untersuchungen von Schimpansen-Proben zeigten dann, dass bei den untersuchten Schimpansen kein LCV der Genogruppe II nachgewiesen werden konnten. Somit war die Existenz von LCV der Genogruppe II in Schimpansen, dem nächsten Verwandten des Menschen, unwahrscheinlich.

Zusätzlich zu den Untersuchungen in dieser Arbeit wurde nach einem LCV der Genogruppe II im Mensch gesucht. Auch diese Versuche waren nicht erfolgreich (Ehlers et al., 2009). Die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse mit einer Zuordnung des Schimpansen-LCVs und von EBV in die Genogruppe I sowie die erfolglose Suche nach LCV der Genogruppe II in Schimpansen und Menschen bestärken eher die These, dass neben EBV kein weiteres humanes LCV existiert. Dagegen sprach nur die unter Abschnitt 6.1.2 diskutierte eingeschränkte Effizienz der generischen PCR Materialien, die mit mehreren Viren infiziert waren. Außerdem wurde möglicherweise bei der Suche nach unbekanntem LCV der Genogruppe II bis jetzt nicht das geeignete Probenmaterial untersucht oder die Prävalenz einer Infektion ist mit diesen Viren sehr niedrig. Da aber von einer Vielzahl von Individuen unterschiedliches Organmaterial untersucht wurde, ist dies eher unwahrscheinlich.

6.1.4 Neuinterpretation des LCV-Stammbaums

Eine bessere Auflösung des gesamten LCV-Stammbaums wurde in phylogenetischen Analysen mit einem größeren Datensatz von LCV-Sequenzen im Bereich des gB- bis DPOL Gens erlangt (siehe Abbildung 10). Dieser Stammbaum war die Basis für eine neue Interpretation der LCV-Phylogenie (Ehlers et al., 2009). Im Gegensatz zu vorherigen Analysen wurde der LCV-Stammbaum auch der Wirtsphylogenie gegenübergestellt. Wie bereits die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse von LCV im gB-Gen zeigten (Abbildung 9), gab es eine stimmige Einteilung der LCV in drei Genogruppen: Gruppe I, Altweltaffen-LCV und hominoide LCV einschliesslich EBV; Gruppe II, hominoide LCV (aber nicht Schimpanse und Mensch); Gruppe III; Neuweltaffen-LCV. Ein Vergleich des LCV-Stammbaums mit dem Primatenstammbaum

zeigte, dass zwar wesentliche Elemente der LCV-Evolution durch eine Virus-Wirt-Koevolution entstanden sind, aber zusätzlich die Entstehung einiger phylogenetischen Linien durch einen Interspezies-Transfer zustande kamen. Wie unter Abschnitt 6.1.1 diskutiert, betrifft letzteres PpygLCV2 (Orang-Utan), HsynLCV2 (Gibbon), die fast identisch mit MfasLCV1 (Makake) sind und daher offenbar vor 1.2 Millionen Jahren durch Übertragung eines Makaken-LCV auf Orang-Utans und Gibbons entstanden sind. Darüber hinaus geht aus der Publikation hervor, dass EBV und drei weitere LCV der Genogruppe I (PtroLCV1, PpanLCV1 und GgorLCV1) aus der Übertragung eines Altweltaffen-LCV der Genogruppe II auf Hominoide vor ca. 12 Millionen Jahren entstanden sind.

Die Schwäche dieser neuen Interpretation des LCV-Stammbaums ist allerdings ebenfalls, dass sie (wie bereits die Zwei-Genogruppen-Hypothese von Ehlers und Mitarbeitern (Ehlers et al., 2003) die Existenz eines koevolutionär entstanden humanen LCV und eines Schimpansen-LCV verlangt (Ehlers et al., 2009). Wie unter Abschnitt 6.1.1 bereits erwähnt, wurde ein solches Schimpansen-LCV nicht gefunden und ein entsprechendes humanes LCV ist ebenfalls nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es solche Viren gab, diese aber bereits ausgestorben sind oder die Prävalenz dieser Erreger sehr niedrig oder regional beschränkt ist.

6.2 Funktionelle Analysen von viralen G-Protein gekoppelten Rezeptoren aus Lymphocryptoviren

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit wurden BILF1-homologe vGPCRs von LCV nicht-humaner Primaten untersucht. Sie wurden mit molekularbiologischen Methoden identifiziert, in Bakterien kloniert und funktionell im Vergleich zu BILF1 charakterisiert. Es sollte untersucht werden, ob bei den LCV-GPCRs Genogruppen-spezifische Unterschiede bestehen. Die Ergebnisse zeigten, dass die LCV-vGPCRs sich funktionell nicht einheitlich verhalten, sondern spezifische Unterschiede aufweisen, die aber nicht mit phylogenetischen Gruppierungen korrelieren.

6.2.1 Identifikation von vGPCR-kodierenden Genen mit Homologie zu BILF1 bei LCV der Genogruppe II

BILF1-homologe ORFs der Genogruppe I waren bereits in der Arbeitsgruppe AG-E identifiziert worden. In dieser Arbeit erfolgte der Nachweis von BILF1-homologen ORF von LCV der Genogruppe II (HsynLCV1, PpygLCV1). Eine Nachweis eines BILF-homologen ORF in GgorLCV2 (Genogruppe II) war nicht möglich. Es konnten zwar Sequenzinformationen in den flankierenden Genbereichen (DPOL und ORF11) generiert werden (siehe Abbildung 13), aber nicht die dazwischen liegende vGPCR-Sequenz. Dies war wahrscheinlich durch die geringe Zahl GgorLCV2-positiver Proben und deren geringe GgorLCV2-Kopienzahl begründet. Für die funktionelle Charakterisierung wurden daher der HsynLCV1-vGPCR und der PpygLCV1-vGPCR aus der Genogruppe II eingesetzt. Aus der Genogruppe I wurden BILF1 und der PtroLCV1-vGPCR aus Schimpansen (*Pan troglodytes*), dem nächsten Verwandten des Menschen, gewählt.

6.2.2 Proteinstrukturanalyse der BILF1 –homologen ORFs

Ein Charakteristikum von GPCRs sind sieben hydrophobe Helices. GPCRS werden deshalb auch als 7TM-Rezeptoren bezeichnet. Transmembrane-Helices-Analysen belegten, dass der vGPCR BILF1 dieses Charakteristikum aufweist (Paulsen et al., 2005). In dieser Arbeit durchgeführte Proteinsequenzanalysen zeigten, dass die durch den BILF1-homologen ORF kodierte vGPCR HsynLCV1, PpygLCV1 und PtroLCV1 sieben hydrophoben Helices aufweisen (siehe Abschnitt 5.2.2) und damit den Anforderungen an einen GPCR entsprechen.

N-terminale Glykosylierungsstellen sind ein weiteres Charakteristikum von GPCRs. Sie sind wichtig für die GPCR-Liganden-Interaktion, die Expression der Rezeptoren und die zelluläre Lokalisation (Ludwig et al., 2000). Für BILF1 wurden sieben N-terminale Glykosylierungsstellen vorausgesagt (Paulsen et al., 2005). Durch Berechnungen mit den Programmen NetGlyc und NetOGlyc konnten für den HsynLCV1-GPCR, den PtroLCV1-GPCR und den PpygLCV1-GPCR mehrere Glykosylierungsstellen ermittelt werden, welche überwiegend am N-Terminus lokalisiert waren (siehe Anhang 12.5). Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass es sich bei den untersuchten Rezeptoren tatsächlich um vGPCRs handelte.

6.2.3 DRY-Motiv und konstitutive Aktivität

GPCRs können ihre Konformation ändern und dadurch G-Proteine aktivieren (Schwartz et al., 2006). Das „DRY“-Motiv spielt eine ausschlaggebende Rolle bei der Regulation des Konformationsstatus von GPCRs (Rovati et al., 2007). Es ist ein hochgradig konserviertes Aminosäuremotiv und besteht aus dem Triplet – Asparaginsäure/Glutaminsäure – Arginin und Tyrosin und wird deshalb als „DRY“-Motiv oder erweitert auch „E/DRY“-Motiv bezeichnet. Bei der Rhodopsin-Rezeptor-Familie, zu der auch BILF1 zählt, ist das DRY-Motiv am zytosolischen Ende des dritten membrandurchspannenden Segments lokalisiert (Mirzadegan et al., 2003).

Arginin ist die am höchsten konservierte Aminosäure in diesem Triplet und ist wahrscheinlich essentiell für die Bindung von G-Proteinen (Lyngaa et al., 2010). 96% aller Rhodopsin-Rezeptoren weisen an dieser Position des „DRY“-Motivs Arginin auf (Mirzadegan et al., 2003). Arginin spielt eine bedeutende Rolle bei der stabilisierenden intramolekularen Interaktion, durch die Ausbildung von Salzbrücken mit der Asparaginsäure/Glutaminsäure. In

dieser Konformation ist der Rezeptor in einem inaktiven Zustand (R) (Zhang et al., 2005). Mutationen der Asparaginsäure oder der Glutaminsäure können eine Konformationsveränderung auslösen. Dies kann bei einigen GPCRs zu einem aktiven Konformationszustand führen (R*) (Cotecchia et al., 2002). Im „DRY“-Motiv ist die Aminosäure Tyrosin diejenige, die am wenigsten konserviert ist. Eine Mutation dieser Aminosäure hat keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf die Funktion des Rezeptors (Hawtin, 2005).

Einige vGPCRs haben ein abgewandeltes „DRY“-Motiv, wie zum Beispiel BILF1 oder der ORF74 des KSHV. Beim ORF74 ist die Sequenz des Motivs „VRY“ (Val, Arg, Tyr) und bei BILF1 „EKT“ (Glu, Lys, Thr) (Paulsen et al., 2005). Die in dieser Arbeit untersuchten vGPCRs des PtroLCV1 und des PpygLCV1 zeigten das gleiche abgewandelte „DRY“-Motiv „EKT“ wie BILF1. Das Motiv des HsynLCV1-vGPCRs hatte eine weiter abgewandelte „DRY“-Sequenz „EKA“, durch die Mutation der dritten Aminosäure von Tyrosin zu Alanin. Es konnte kürzlich für abgewandelte „DRY“-Sequenzen von vGPCRs gezeigt werden, dass diese in einem Zusammenhang mit der konstitutiven Aktivierung von G-Proteinen stehen (Maussang et al., 2006). In Mutationsstudien wurden BILF1-Mutanten mit einem veränderten „DRY“-Motiv und daraus resultierende Auswirkungen auf die konstitutive Aktivität der Rezeptoren untersucht (Lyngaa et al., 2010). Mutanten mit einer Rückmutation von Lysin zu der ursprünglichen Aminosäure Arginin verhielten sich im Bezug auf die konstitutive Aktivität wie Wildtyp BILF1. Eine Rekonstruktion des konservierten „DRY“-Motivs führte hingegen zu einem intermediären Phänotyp in Bezug auf Signalweitergabe (Lyngaa et al., 2010).

Die abgewandelten „DRY“-Sequenzen der untersuchten vGPCRs von LCV der Genogruppe I und II könnten wie bei BILF1 zu einer konstitutiven Aktivierung von G-Proteinen führen. Laut Literatur wurden bis jetzt keine Mutationsstudien der dritten Aminosäure (Tyrosin) der EKT-Sequenz des BILF1 durchgeführt, da angenommen wurde, dass dies nur zu einer geringen Veränderung der Rezeptorfunktion führt (Hawtin, 2005). Da es sich aber bei der abgewandelten „DRY“-Sequenz vom HsynLCV1-GPCR „EKA“ um zwei Mutationen (der zweiten und dritten Aminosäure des „DRY“-Motivs) handelt, könnte dies nicht nur zu einer konstitutiven Aktivität dieses Rezeptors, sondern auch zu einer erhöhten Bindungsvariabilität von verschiedenen G-Protein-Untereinheiten führen. Für genaue Aussagen über die konstitutive Aktivität und die Bindungsvariabilität von G-Proteinen der BILF1-homologen vGPCRs müssten Mutationsexperimente im Bereich des „DRY“-Motivs durchgeführt werden.

6.2.4 Expression und Glykosylierungsgrad der untersuchten vGPCRs

BILF1 wurde in Tetracyclin-induzierten Zelllinien als ein 50 kDa Protein exprimiert. Es handelt sich bei BILF1 um ein stark glykosyliertes Protein, da nach dem Verdau der Zellysate mit dem Enzym Glykopeptidase F (PNGase F) das MW von BILF1 33 kDa entspricht (Paulsen et al., 2005). Nach der Expression von BILF1, HsynLCV1-GPCR, PtroLCV1-GPCR und PpygLCV1-GPCR in HEK-293 Zellen ließ sich im Westernblot das entsprechende Protein nachweisen. Das scheinbare MW der untersuchten vGPCRs nach dem PNGaseF Verdau stimmte mit dem vorher berechneten MW recht gut überein. Es lag bei ca. 35 kDa und unterschied sich damit nur geringfügig von dem in der Literatur beschriebenen MW für BILF1.

Für eine starke Glykosylierung der einzelnen vGPCRs sprach die Detektion von Nebenbanden vor dem Verdau mit PNGaseF und das geringer bestimmte MW der vGPCRs nach *in vitro* Expression im Vergleich zum experimentell ermittelten MW der vGPCRs aus den HEK293-Zellysaten. Theoretische Abschätzungen des Glykosylierungsgrades der vGPCRs deuteten auf eine starke N-Glykosylierung und eine geringere O-Glykosylierung der vGPCRs hin und ergänzen damit die Ergebnisse des PNGase F Verdau und der *in vitro* Expression.

6.2.5 Zelllokalisierung und Internalisierung der vGPCRs

Mit Hilfe von indirekter Fluoreszenzmarkierung und konfokaler Laserscanmikroskopie konnte die Lokalisation von vier vGPCRs (HsynLCV1-GPCR, PpygLCV1-GPCR, PtroLCV1-GPCR und BILF1) in transfizierten Säugerzellen bestimmt werden. Es bestand kein einheitliches Lokalisationsmuster für die vGPCRs von LCVs der Genogruppen I bzw. II. Eine deutlich überwiegende Kolokalisation in der Zellmembran mit dem Kontrollprotein eGFPF konnte jeweils nur für den PpygLCV1-GPCR (Genogruppe II) und den PtroLCV1-GPCR (Genogruppe I) gezeigt werden. Für BILF1 (Genogruppe I) wurde ein intermediärer Phenotyp, d.h. eine vorwiegende Lokalisation an der Zellmembran und eine zusätzliche intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen. Der HsynLCV1-GPCR (Genogruppe II) war überwiegend intrazellulär lokalisiert (Abschnitt 5.2.4).

BILF1 ist laut Literatur vorrangig in der Plasmamembran lokalisiert (Beisser et al., 2005; Paulsen et al., 2005). Dies entspricht einerseits dem Lokalisationsmuster von vielen GPCRs, steht aber im Gegensatz zu vielen vGPCRs, die intrazellulär lokalisiert sind (Rosenkilde et al.,

2005). Viele vGPCRs der β -Herpesviren (z.B. UL33, US27, US28 des HCMVs und M78 des MCMVs) zeichnen sich durch für diese Proteinfamilie ungewöhnliche Lokalisationsmuster aus (Fraile-Ramos et al., 2001). Detaillierte Analysen zeigten, dass US28 eine konstitutive Internalisierung und Regenerierung zurück zur Plasmamembran durchläuft. Auf diese Weise werden inflammatorische Cytokine durch Bindung an den viralen Rezeptor aus dem Umfeld infizierter Zellen entfernt und somit stellt dies einen HCMV-induzierten Mechanismus zur Abwehr der wirtseigenen Immunantwort dar (Fraile-Ramos et al., 2001). Dabei wirkt er der Rekrutierung von Zellen entgegen, die an der Immunantwort gegen HCMV beteiligt sind. Der ORF74 des KSHV (HHV-8) ist im Gegensatz zu US28 sowie zu BILF1 in der Plasmamembran lokalisiert (Schwarz et al., 2001). Es wurde vermutet, dass aufgrund dieser Parallele BILF1 und der ORF74 eine ähnliche Funktion bei der viralen Replikation haben (Paulsen et al., 2005). Die in dieser Arbeit nachgewiesene zusätzliche intrazelluläre Lokalisation von BILF1 und die vorrangige intrazelluläre Lokalisation vom HsynLCV1-GPCR könnte allerdings auf eine komplexere Funktionalität dieser vGPCRs schließen lassen, als von Paulsen et al. beschrieben wurde.

In dieser Arbeit konnte eine mögliche Heterodimerisierung durch die intrazelluläre Lokalisation von HsynLCV1 und BILF1 nach einer Kotransfektion der beiden Rezeptoren gezeigt werden (siehe Abschnitt 5.2.4). Eine Interaktion der vGPCR wäre in ihrem Wirt aufgrund der Spezifität der Viren nicht möglich, lässt aber auf die Funktion der Rezeptoren schließen. Es wurde lange Zeit angenommen, dass GPCRs als monomere Einheiten existieren und funktionieren. Es konnte aber gezeigt werden, dass eine Heterodimerisierung von GPCRs eine Auswirkung auf funktionelle Eigenschaften des interagierenden GPCRs hat, welches die Ligandenbindung und die Signalweitergabe beinhaltet (Springael et al., 2007). Nicht wirtseigene sondern viral exprimierte Chemokine oder orphan vGPCRs in oder auf der Oberfläche von humanen infizierten Zellen können bei einer Heteromerisierung mit humanen GPCRs zu einer funktionalen Veränderung dieser führen. Diese „Rezeptorpiraterie“ könnte einen Mechanismus darstellen bei dem die zelluläre Homeostase zum Vorteil des Virus verändert wird. Kürzlich konnten Heterodimere zwischen BILF1 und verschiedenen humanen Chemokin-Rezeptoren, die an der Migration von B-Lymphozyten beteiligt sind, nachgewiesen werden (Vischer et al., 2008). Die funktionellen Konsequenzen dieser Heterodimerisierung wurden bis jetzt nicht identifiziert. Es wird aber angenommen, dass durch die Bindung von BILF1 an die Chemokinrezeptoren die Reaktivität von B-Lymphozyten auf Chemokine verändert wird. Dies würde die Homeostase von infizierten B-Lymphozyten verändern und

könnte somit essentiell für die Dissemination von EBV sein (Vischer et al., 2008). Die mögliche Heterodimerisierung vom HsynLCV1-GPCR mit BILF1 könnten darauf deuten, dass auch diese vGPCRs mit zellulären Wirts-GPCRs interagieren und sie zum Vorteil des Lebenszyklus des Virus verändern.

Ein weiterer Grund für eine komplexere Funktionalität von HsynLCV1-vGPCR und BILF1 könnte mit einer immun invasiven Strategie, wie sie für US28 beschrieben wurde, zusammenhängen. US28 ist hauptsächlich intrazellulär lokalisiert, kann aber auch an der Zelloberfläche von transfizierten Zellen (Ohagen et al., 2000) sowie HCMV-infizierten Zellen (Vieira et al., 1998) nachgewiesen werden. In transient transfizierten HEK293-Zellen zeigten BILF1 und der HsynLCV1-GPCR ein zu US28 ähnliches Lokalisationsmuster auf. Zusätzlich konnte erstmalig in dieser Arbeit eine Internalisierung von allen untersuchten vGPCRs gezeigt werden (siehe Abschnitt 5.2.6), wie sie bereits für US28 beschrieben wurde (Fraile-Ramos et al., 2001). Das Lokalisationsmuster und die Internalisierung der untersuchten vGPCRs könnten mit einer Internalisierung von extrazellulären Chemokinen zusammenhängen und damit die immun invasive Strategie dieser Viren belegen. Bei HsynLCV1-GPCR und BILF1 handelt es sich um sogenannte „orphan receptors“. So konnte z. B. in Untersuchungen kein Nachweis für die Interaktion von Chemokinen der CC- und CXC-Familie mit BILF1 nachgewiesen werden (Beisser et al., 2005). Untersuchungen mit weiteren potenziellen Chemokinen und Liganden stehen aber noch aus, um eine weitere immun invasive Strategie von HsynLCV1 und EBV zu belegen. Damit steht ein Nachweis für eine direkte Interaktion mit dem Immunsystem des Wirtes, wie sie für US28 gezeigt wurde aus (Fraile-Ramos et al., 2001).

6.2.6 Zelloberflächenexpression und konstitutive Aktivität der vGPCRs

In ELISA-Versuchen wurde die konzentrationsabhängige Expression der vGPCRs an der Zelloberfläche bestimmt. Diese Ergebnisse korrelierten mit den Ergebnissen der konfokalen Laserscanmikroskopie. In beiden Versuchsansätzen konnte für den PtroLCV1-GPCR und den PpygLCV1-GPCR eine höhere Expression an der Zelloberfläche als für BILF1 und den HsynLCV1-GPCR bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde die Vermittlung der konstitutiven Aktivität durch die Rezeptoruntereinheit $G\alpha_i$ für alle untersuchten vGPCRs (BILF1, HsynLCV1-GPCR, PpygLCV1-GPCR und PtroLCV1-GPCR) belegt. Die Signalweitergabe wurde auf der Ebene

der G-Protein-Aktivierung und der Transkriptionsaktivität untersucht. In CREB-Luziferase Versuchen konnte in Abhängigkeit von der Gendosis eine konstitutive Aktivierung der Phospholipase C (PLC) nach einer Kointransfektion mit dem rekombinanten Plasmid und der folgenden Expression des G-Protein (Gqi4myr) ermittelt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit des chimären G-Proteins eine Forskolin-induzierte Aktivierung von CREB durch die vGPCRs inhibiert werden konnte. Beide Versuchsansätze belegten eine konstitutive Signalweitergabe der vGPCRs über die $G\alpha_i$ -Untereinheit. Versuche ohne die Kontransfektion mit dem chimären G-Protein führten hingegen nicht zu einer Aktivierung der PLC und damit zur Aktivierung von CREB, das heißt, es kam nicht zu einer konstitutiven Signalweitergabe durch die Untereinheiten $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vier untersuchten vGPCRs (HsynLCV1-GPCR, PpygLCV1-GPCR, PtroLCV1-GPCR und BILF1) den Transkriptionsfaktor CREB durch eine konstitutive Signalweitergabe über die $G\alpha_i$ -Untereinheit aktivierten.

Konstitutive Aktivierung ist eine verbreitete Eigenschaft von viral kodierten 7TM-Rezeptoren (Rosenkilde et al., 2004). Hochgradige konstitutive Aktivität wurde für BILF1 bereits publiziert. Dieser vGPCR signalisiert im Gegensatz zu US28 und ORF74 selektiv über $G\alpha_i$ in COS-7 und in HEK293-Zellen (Beisser et al., 2005; Paulsen et al., 2005). BILF1 ist in $G\alpha_i$ -abhängiger Weise in EBV-positiven Zelllinien und EBV-positiven lymphoblastoiden B-Zelllinien aktiv (Beisser et al., 2005). Desweiteren führt BILF1 zur Transformationen von NIH/3T3-Zellen und die Aktivierung von $G\alpha_i$ scheint dafür eine ausschlaggebende Rolle zu spielen (Lyngaa et al., 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Grad der Signalweitergabe über $G\alpha_i$ mit der Fähigkeit korreliert, die Sekretion des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) zu induzieren (Lyngaa et al., 2010). Kürzlich wurde beschrieben, dass die Sekretion von VEGF mit der Pathogenese von Nasopharyngeal-Karzinomen (O'Neil et al., 2008) und non-Hodgkinlymphomen (Paydas et al., 2008) assoziiert ist. Weiterhin bestätigt die Fähigkeit von BILF1, in Nacktmäusen Tumore zu erzeugen (Lyngaa et al., 2010), das onkogene Potential von BILF1. Damit könnte BILF1 in die Pathogenese von EBV-assoziierten Krankheiten involviert sein. Die hier beobachtete konstitutive Aktivität der vGPCRs HsynLCV1, PtroLCV1 und PpygLCV1 aus nicht-humanen Primaten könnte somit ebenfalls mit viraler Pathogenität in ihren Wirten im Zusammenhang stehen. Kenntnisse über die Pathogenität dieser Viren liegen allerdings bisher nicht vor.

6.2.7 Stimulierung des nukleären Faktors kappaB (NFκB)

In NFκB-Luziferase Versuchen konnte in Abhängigkeit der Gendosis eine konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB durch alle vGPCRs (HsynLCV1, PpygLCV1, PtroLCV1 und BILF1) ermittelt werden. Die Aktivierung von NFκB durch die vGPCRs scheint, im Gegensatz zur NFAT-Aktivierung, eine sehr konservierte molekulare Eigenschaft der LCV-GPCRs der Genogruppe I und II zu sein.

Diverse Viren nutzen NFκB, um die Apoptose zu inhibieren und um damit ihre Replikation und Pathogenität zu stärken (Santoro et al., 2003). Es besteht zudem ein Zusammenhang zwischen einer abweichenden NFκB-Aktivität und Tumorgenese, zuerst angenommen aufgrund der akuten Onkogenität des viralen Onkoproteins v-Rel, welches zu einer aggressiven Form von Lymphomen in Tierversuchen führte (Gilmore, 1999). Seit dem dient die Bestimmung eines erhöhten Transkriptionslevels von NFκB als Kennzeichen für viele humane Leukämien, Lymphome und solide Tumoren. Dazu gehören zum Beispiel das Hodgkin's Lymphom, das diffuse große B-Zell-Lymphom, die akute lymphoblastische Leukämie und das Mammakarzinom (Hinz et al., 2001). In Burkitt Lymphomen gibt es eine Assoziation von EBV und der Aktivierung von NFκB, was zu einer Transformation der Zellen führt (Hiscott, 2001).

Für US28, kodiert vom HCMV, konnte gezeigt werden, dass auch dieser vGPCR NFκB konstitutiv über die $G\alpha_q$ -Untereinheit aktiviert (Bakker et al., 2004). Basierend auf der Aktivierung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NFκB wurde angenommen, dass US28 Inflammationsprozesse begünstigt und damit als potenzielles virales Onkogen agiert (Maussang et al., 2006). In mit US28 stabil transfizierten NIH-3T3 Zellen konnte eine erhöhte Zellproliferation ohne Ligandenstimulierung nachgewiesen werden (Maussang et al., 2006). Weiterhin konnte in „microarray“ Studien das onkogene Potential von US28 auf Effektormoleküle bestimmt werden. Es wurde gezeigt, dass die Expression von verschiedenen krebssassoziierten Genen und aktivierter Zielmoleküle durch die NFκB-Transkription moduliert ist. Somit konnte ermittelt werden, dass die konstitutive Aktivierung von US28 zu einer erhöhten Expression des pro-inflammatorischen Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2) führt. Die Inhibierung des NFκB-Signalkaskadeweges durch den Inhibitor Bay-11-70082 führte zu einer beinahe vollständigen Inhibierung der COX-2 Promotoraktivierung durch den US28-Rezeptor

(Maussang et al., 2009). Durch die erhöhte Expression von COX-2 in einer Vielzahl von Krebszellen ist damit COX-2 ein interessantes Target für die Medikamentenentwicklung (Maussang et al., 2009).

Die konstitutive Aktivierung von NF κ B durch alle LCV-GPCRs ohne Ligandenbindung könnte auch hier, wie für US28 beschrieben, im Zusammenhang mit der LCV-Tumorgenese stehen. So könnte beispielsweise die Aktivierung von NF κ B durch BILF1 mit der Pathogenese des Burkitt Lymphoms assoziiert sein. Damit könnte die NF κ B-Aktivierung durch die vGPCRs als Target für die Medikamentenentwicklung zur Verhinderung von LCV-vermittelter Tumorgenese eine interessante Rolle spielen, wie für US28 bereits gezeigt werden konnte (Maussang et al., 2009).

6.2.7.1 Stimulierung des nukleären Faktors aktivierter T-Zellen (NFAT) und Inaktivierung der durch vGPCR induzierten Signal-Kaskadewege durch selektive Inhibitoren

Um die zellulären Signaleigenschaften der vGPCRs aus beiden Genogruppen besser eingrenzen zu können, wurde zusätzlich zur NF κ B-Aktivierung die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT untersucht. In den durchgeführten NFAT-Luziferase-Versuchen konnte in Abhängigkeit der Gendosis eine konstitutive Aktivierung von NFAT durch BILF1 und den HsynLCV1-GPCR jedoch nicht durch den PtroLCV1-GPCR und den PpygLCV1-GPCR ermittelt werden. Diese Ergebnisse zeigten somit kein einheitliches Verhaltensmuster der vGPCRs innerhalb der Genogruppen I und II. Das unter Abschnitt 6.2.5 diskutierte Lokalisationsmuster, der Expressionsgrad der vGPCRs an der Zelloberfläche (siehe Abschnitt 6.2.6) und die NFAT-Aktivierung wiesen jeweils ähnliche molekulare Eigenschaften von BILF1 und dem HsynLCV1-GPCR, sowie andererseits dem PtroLCV1-GPCR und dem PpygLCV1-GPCR auf (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21 Unterschiede in den molekularen Eigenschaften der vGPCRs

vGPCRs	Genogruppe	Dry-Motif	Zellokalisierung	CREB	NFAT
BILF1	I	EKT	äußere Zellmembran + intrazellulär	+	+
HsynLCV1	II	EKA	intrazellulär	+	+
PtroLCV1	I	EKT	äußere Zellmembran	+	-
PpygLCV1	II	EKT	äußere Zellmembran	+	-

Die gemeinsamen molekularen Eigenschaften könnten auf eine ähnliche Funktionalität dieser Viren in ihrem jeweiligen Wirt deuten. Überraschend ist, dass BILF1 in seinen Eigenschaften dem HsynLCV1-GPCR näher ist als dem PtroLCV1-GPCR, da der Wirt des HsynLCV1 (*Hylobatus syndactylus*) entfernter mit dem Menschen verwandt ist, als der des PtroLCV1 (*Pan troglodytes*).

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass nicht alle vGPCRs der BILF1-Familie den Transkriptionsfaktor NFAT konstitutiv aktivieren. Durch den Transkriptionsfaktor können zum einen verschiedene Gene, die in Entzündungsprozessen involviert sind, wie z.B. IL-2, IL-4, induziert werden und zum anderen ist NFAT essentiell für die lytische Virusreplikation. Die als Positiv-Kontrollen eingesetzten ORF74 und US28 können beide in Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Menge die Transkription von NFAT induzieren (McLean et al., 2004). Bei der HHV-8 Infektion steht dies im Zusammenhang mit der Entwicklung von Kaposi-Sarkomen (Zoetewij et al., 2001). Eine konstitutive Aktivierung von NFAT durch den ORF74 wurde auch in primären Lymphomzellen beobachtet (Cannon et al., 2004).

Basierend auf der Einstufung des BILF1-Gens sowie des OFR74 als Onkogen (Cannon et al., 2004; Lyngaa et al., 2010) könnte die konstitutive Aktivierung von NFAT durch den HsynLCV1-GPCR ebenfalls auf einen Zusammenhang mit Tumorgenese in Gibbons, dem natürlichen Wirt des HsynLCV1 (*Hylobates syndactylus*) hindeuten. Kenntnisse über LCV-assoziierte Tumorgenese in Gibbons gibt es jedoch bisher nicht.

Um die Signalkaskadewege vom BILF1 und dem HsynLCV1-GPCR, die zu einer NFAT Aktivierung in HEK293-Zellen geführt, zu charakterisieren, wurden die Inhibitoren Ptx (G α i Inhibitor) und U73122 (PLC Inhibitor) eingesetzt. Die Versuche mit Ptx zeigten eine fast identische Inhibierung der NFAT-Aktivität für BILF1 und HsynLCV1-GPCR. Damit wurde bestätigt, dass beide vGPCRs NFAT über G α i aktivierten (siehe Abschnitt 6.2.6).

Zusätzlich konnte für den HsynLCV1-GPCR in NFAT-Luciferase Versuchen, in denen U73122 als Inhibitor eingesetzt wurde, eine Inhibierung der NFAT-Aktivität gezeigt werden. Damit

wurde der Transkriptionsfaktor NFAT konstitutiv über die $G\alpha_i$ - sowie $G\alpha_q$ -Untereinheit durch den HsynLCV1-GPCR und den als Positiv-Kontrolle ORF74 aktiviert. HsynLCV1-GPCR unterschied sich hiermit von allen untersuchten vGPCRs der BILF1-Familie, die nur über $G\alpha_i$ konstitutiv den Transkriptionsfaktor NFAT aktivierten, und zeigte in seiner Signalweitergabe zusätzlich zu den gemeinsamen molekularen Eigenschaften mit BILF1 starke Parallelen zum US28 und ORF74, die über verschiedene G-Proteinuntereinheiten signalisieren können.

Zusammenfassung

Die Entdeckung bisher unbekannter LCV bei Primaten hatte vor ca. zehn Jahren zu der Hypothese geführt, dass sich LCV von Primaten in drei Genogruppen gliedern: eine Genogruppe bestand aus LCV von Neuweltaffen (Genogruppe III) und zwei weitere aus LCV von Altweltaffen (Genogruppen I und II). Zur Genogruppe I zählten zahlreiche LCV aus hominoiden Primaten, inklusive EBV. Die Genogruppe II war kleiner und umfasste LCV aus einigen hominoiden Primaten, aber nicht aus Schimpansen oder Menschen. Gorilla LCV existierten in beiden Genogruppen, was zu der Hypothese führte, dass neben EBV ein weiteres humanes LCV existieren könnte. In dieser Arbeit wurde diese Hypothese durch zwei experimentelle Aufgabenstellungen überprüft. Zum einen wurde nach unbekanntem LCV der zweiten Genogruppe in Menschenaffen gesucht. Zum anderen wurden von LCVs Sequenzinformationen gewonnen, die mindestens eine Spanne von vier Genen umfassen, um die Qualität der phylogenetischen Analyse von LCVs zu verbessern.

Für die Suche nach unbekanntem LCV der Genogruppe II wurde eine Optimierung des Genomnachweises durch die Entwicklung von degenerierten Primern, abgestimmt auf die Erfassung von LCV der Genogruppe II, erlangt. Dadurch konnten in PCR-Reaktionen mit einer hohen Effizienz alle bekannten LCV der Genogruppe II detektiert werden. Untersuchungen von Schimpansen-Proben zeigten aber, dass offenbar kein Schimpansen-LCV der Genogruppe II existiert. Für phylogenetische Analysen wurden zunächst zusätzliche LCV-Sequenzinformationen vom MDBP- bis DPOL-Gen generiert. Es folgte die Identifizierung des gB-Gens und darauf basierend die phylogenetische Analyse. Der Stammbaum zeigte die Einteilung von LCV aus hominoiden Primaten in zwei Genogruppen und die Eingruppierung von LCV aus Schimpansen oder vom Menschen in die Genogruppe I. Die Ergebnisse aus beiden Aufgabenstellungen belegten, dass die aufgestellte Hypothese eher unwahrscheinlich ist und dass neben EBV kein weiteres humanes LCV existiert.

Der vGPCR von EBV, kodiert vom BILF1-Leserahmen, signalisiert Liganden unabhängig und ist konstitutiv aktiv. Diese funktionellen Merkmale waren mit der EBV-assoziierten Tumorgenese in Zusammenhang gebracht worden. Hier wurden vGPCRs von LCV aus Menschenaffen identifiziert und ihre Eigenschaften im Vergleich zu BILF1 charakterisiert. Es wurden gleiche konservierte Eigenschaften der vGPCRs auf molekularer Ebene aufgezeigt, wie

die konstitutive Aktivität, die Signalweitergabe über die $G\alpha_i$ -Untereinheit, die konstitutive Internalisierung in die Zelle und eine erhöhte Aktivierung von CREB und NF κ B bei einer zellulären Expression der vGPCRs. Weiterhin konnte für BILF1 und den HsynLCV1-GPCR ein zum Teil intrazelluläres Lokalisationsmuster und eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT bestimmt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der HsynLCV1-GPCR die Aktivität von NFAT über zwei Untereinheiten, $G\alpha_i$ und $G\alpha_q$, induziert.

Durch die Beobachtung, dass vGPCR-Eigenschaften, für die eine Verbindung zu Tumorgenese angenommen wird innerhalb der untersuchten vGPCRs konserviert sind, wurde das Potential dieser vGPCRs bestätigt. Des Weiteren konnte durch die Charakterisierung des HsynLCV1-GPCR und die bessere Charakterisierung des BILF1 nicht nur ein besseres Verständnis von LCV-GPCRs erlangt werden, sondern es konnten auch Parallelen zu vGPCRs, kodiert von β - bzw. γ -Herpesviren, aufgezeigt werden, die mit Tumorgenese in ihrem Wirt assoziiert sind.

8 Summary

Ten years ago the discovery of so far unknown lymphocryptoviruses (LCVs) of primates led to a new theory on LCV evolution. The new LCVs from primates were divided into three genogroups: one genogroup consisted of LCVs from new world monkeys (genogroup III) and the other two genogroups included LCVs from old world monkeys (genogroup I and II). The first genogroup consisted of numerous LCVs from hominoid primates, including Epstein-Barr virus (EBV). The second genogroup was smaller and also contained LCVs from hominoid primates, but no human or chimpanzee LCV. Gorilla LCVs existed in both genogroups, which led to the hypothesis that another human LCV besides EBV might exist. In this thesis the hypothesis was tested using two experimental approaches: (I) a screening for hitherto unknown LCVs of the second genogroup in great apes and (II) an improvement of the quality of the phylogenetic studies by sequence generation using a four-gene block.

In the search of unknown LCVs an optimisation of the detection of LCV was achieved by developing degenerate primers, which were highly efficient in detecting known LCVs of the second genogroup. However no chimpanzee LCV of the second genogroup was detected. Therefore, the existence of such a LCV in chimpanzees, the closest relative of the human, is rather unlikely. LCV sequence information from the MDBP-DPOL genes were generated followed by the identification of the gB gene and subsequent phylogenetic analysis. The phylogenetic tree showed a statistically well-supported location of LCVs in two genogroups, but no so far unknown of chimpanzee or human LCVs in the second genogroup. The results from both approaches suggest that the initial hypothesis of a second human LCV is rather unlikely.

The viral G protein-coupled receptor (vGPCR) BILF1, encoded by EBV, signals in a ligand independent manner and is constitutively active. These functional features had been linked with the EBV-associated tumorigenesis. vGPCRs of LCV from great apes were identified here and their characteristics in comparison to those of BILF1 were investigated. Uniform functional characteristics of the vGPCRs were found such as the constitutive activity, the signal transduction via $G\alpha_i$, the constitutive internalisation of the vGPCRs and a higher level of transcriptional activity of CREB and NF κ B following vGPCR expression. Furthermore the results showed that BILF1 and HsynLCV1-GPCR differ in their intracellular localisation patterns and that only these receptors of those investigated can activate the transcription factor

NFAT. In addition it was shown that HsynLCV1-GPCR can induce the NFAT activity via two $G\alpha$ subunits, $G\alpha_i$ and $G\alpha_q$. The determination of the conserved characteristics within the LCV-GPCR family, which are correlated with tumorigenesis, confirmed the high oncogenic potential of these vGPCRs. The further characterisation of BILF1 and the HsynLCV1-GPCR led not only to a better understanding of BILF1, but also to a better common understanding of vGPCRs encoded by β and γ -herpesviruses, which are associated with tumorigenesis in their hosts.

9 Ausblick

Um das Verständnis von Virus-assoziierten Krankheiten erweitern zu können, ist auch weiterhin die Suche nach neuartigen humanen Herpesviren von Bedeutung. Eine erfolgreiche Detektion von bisher unbekanntem humanen LCV könnte mit der Wahl des Methodenspektrums zusammenhängen. Deshalb wäre es wichtig neben der generischen PCR, Methoden wie „ultra deep sequencing“ und „microarrays“ anzuwenden (Saliou et al., 2011). Beide Methoden sind sehr sensitiv. Somit wäre die Detektion von LCV mit einer geringen Kopienzahl möglich, die mit der generischen PCR bis jetzt nicht detektiert werden konnten.

Die hohe konstitutive Aktivität des vGPCRs BILF1 und seine Rolle in der Tumorgenese im Tiermodell hebt das Potential dieses vGPCRs als mögliches Medikamententarget hervor (Vischer et al., 2008). Durch die nähere Charakterisierung von vGPCRs der BILF1-Familie aus Menschenaffen und der Bestimmung der konservierten Signalweitergabe könnte nicht nur der vGPCR selber sondern auch die Inhibierung von Signalkaskadewegen, welche durch den Rezeptor konstitutiv aktiviert werden, von therapeutischem Interesse sein. Darüber hinaus könnten weitere Studien des HsynLCV1-GPCRs für ein besseres Verständnis von vGPCR aus Herpesviren beitragen. Sein abgeändertes „DRY“-Motiv welches sich von allen bisher untersuchten vGPCRs aus Herpesviren unterscheidet, könnte mit der Aktivierung der verschiedenen G α -Untereinheiten im Zusammenhang stehen. Mutationsstudien im Bereich des „DRY“-Motivs des HsynLCV1-GPCRs und von BILF1 würden nicht nur zu einem besseren Verständnis der Signaleigenschaften von BILF1 sondern auch allgemein von herpesviralen GPCRs führen. Darüber hinaus würde die Generierung von transgenen Mäusen, die den HsynLCV1-GPCR exprimieren das Verständnis über das Transformationspotenzial dieses Rezeptors im Vergleich zu BILF1 verbessern. Dies ist wichtig, um gezielt therapeutische Ansätze zur Verhinderung von LCV-Tumorgenese zu entwickeln.

10 Literaturverzeichnis

Abdel Massih, R. C. and R. R. Razonable (2009). "Human herpesvirus 6 infections after liver transplantation." World J Gastroenterol **15**(21): 2561-9.

Arvanitakis, L., E. Geras-Raaka, et al. (1997). "Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation." Nature **385**(6614): 347-50.

Bais, C., B. Santomaso, et al. (1998). "G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator." Nature **391**(6662): 86-9.

Bakker, R. A., P. Casarosa, et al. (2004). "Constitutively active Gq/11-coupled receptors enable signaling by co-expressed G(i/o)-coupled receptors." J Biol Chem **279**(7): 5152-61.

Beisser, P. S., D. Verzijl, et al. (2005). "The Epstein-Barr virus BILF1 gene encodes a G protein-coupled receptor that inhibits phosphorylation of RNA-dependent protein kinase." J Virol **79**(1): 441-9.

Calebiro, D., V. O. Nikolaev, et al. "Signaling by internalized G-protein-coupled receptors." Trends Pharmacol Sci **31**(5): 221-8.

Cannon, M. L. and E. Cesarman (2004). "The KSHV G protein-coupled receptor signals via multiple pathways to induce transcription factor activation in primary effusion lymphoma cells." Oncogene **23**(2): 514-23.

Cathomas, G. (2003). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)/human herpesvirus 8 (HHV-8) as a tumour virus." Herpes **10**(3): 72-7.

Chmielewicz, B., M. Goltz, et al. (2001). "Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats." Virus Res **75**(1): 87-94.

Chmielewicz, B., M. Goltz, et al. (2003). "A novel porcine gammaherpesvirus." Virology **308**(2): 317-29.

Cotecchia, S., K. Bjorklof, et al. (2002). "The alpha1b-adrenergic receptor subtype: molecular properties and physiological implications." J Recept Signal Transduct Res **22**(1-4): 1-16.

Deyrup, A. T. (2008). "Epstein-Barr virus-associated epithelial and mesenchymal neoplasms." Hum Pathol **39**(4): 473-83.

Ehlers, B., A. Ochs, et al. (2003). "Novel simian homologues of Epstein-Barr virus." J Virol **77**(19): 10695-9.

Ehlers, B., K. Spiess, et al. (2009). "Lymphocryptovirus phylogeny and the origins of Epstein-Barr virus." J Gen Virol.

- Ehlers, B., S. Ulrich, et al. (1999). "Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses." J Gen Virol **80 (Pt 4)**: 971-8.
- Fang, W., X. Li, et al. (2008). "Transcriptional patterns, biomarkers and pathways characterizing nasopharyngeal carcinoma of Southern China." J Transl Med **6**: 32.
- Fraile-Ramos, A., T. N. Kledal, et al. (2001). "The human cytomegalovirus US28 protein is located in endocytic vesicles and undergoes constitutive endocytosis and recycling." Mol Biol Cell **12(6)**: 1737-49.
- Gilmore, T. D. (1999). "Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel." Oncogene **18(49)**: 6925-37.
- Greulich, H., T. H. Chen, et al. (2005). "Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants." PLoS Med **2(11)**: e313.
- Hawtin, S. R. (2005). "Charged residues of the conserved DRY triplet of the vasopressin V1a receptor provide molecular determinants for cell surface delivery and internalization." Mol Pharmacol **68(4)**: 1172-82.
- Hinz, M., P. Loser, et al. (2001). "Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells." Blood **97(9)**: 2798-807.
- Hiscott, J. (2001). "Introduction--cytokine receptors, signaling pathways and viruses." Cytokine Growth Factor Rev **12(2-3)**: 129-31.
- Johnston, C. A. and D. P. Siderovski (2007). "Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights." Mol Pharmacol **72(2)**: 219-30.
- Katlama, C. (1993). "Cytomegalovirus infection in acquired immune-deficiency syndrome." J Med Virol Suppl **1**: 128-33.
- Kledal, T. N., M. M. Rosenkilde, et al. (1998). "Selective recognition of the membrane-bound CX3C chemokine, fractalkine, by the human cytomegalovirus-encoded broad-spectrum receptor US28." FEBS Lett **441(2)**: 209-14.
- Kristiansen, K. (2004). "Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function." Pharmacol Ther **103(1)**: 21-80.
- Kutok, J. L. and F. Wang (2006). "Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases." Annu Rev Pathol **1**: 375-404.
- Lacoste, V., P. Mauclore, et al. (2000). "KSHV-like herpesviruses in chimps and gorillas." Nature **407(6801)**: 151-2.

- Laemmli, U. K., F. Beguin, et al. (1970). "A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation." J Mol Biol **47**(1): 69-85.
- Levoye, A. and R. Jockers (2008). "Alternative drug discovery approaches for orphan GPCRs." Drug Discov Today **13**(1-2): 52-8.
- Ludwig, A., J. E. Ehlert, et al. (2000). "Identification of distinct surface-expressed and intracellular CXC-chemokine receptor 2 glycoforms in neutrophils: N-glycosylation is essential for maintenance of receptor surface expression." J Immunol **165**(2): 1044-52.
- Lyngaa, R., K. Norregaard, et al. (2010). "Cell transformation mediated by the Epstein-Barr virus G protein-coupled receptor BILF1 is dependent on constitutive signaling." Oncogene **29**(31): 4388-98.
- Marchuk, D., M. Drumm, et al. (1991). "Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products." Nucleic Acids Res **19**(5): 1154.
- Marinissen, M. J. and J. S. Gutkind (2001). "G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms." Trends Pharmacol Sci **22**(7): 368-76.
- Maussang, D., E. Langemeijer, et al. (2009). "The human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes angiogenesis and tumor formation via cyclooxygenase-2." Cancer Res **69**(7): 2861-9.
- Maussang, D., D. Verzijl, et al. (2006). "Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13068-73.
- McGeoch, D. J., F. J. Rixon, et al. (2006). "Topics in herpesvirus genomics and evolution." Virus Res **117**(1): 90-104.
- McLean, K. A., P. J. Holst, et al. (2004). "Similar activation of signal transduction pathways by the herpesvirus-encoded chemokine receptors US28 and ORF74." Virology **325**(2): 241-51.
- Milligan, G. (2003). "Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective." Mol Pharmacol **64**(6): 1271-6.
- Mirshahi, T., V. Mittal, et al. (2002). "Distinct sites on G protein beta gamma subunits regulate different effector functions." J Biol Chem **277**(39): 36345-50.
- Mirzadegan, T., G. Benko, et al. (2003). "Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin." Biochemistry **42**(10): 2759-67.
- Montaner, S., A. Sodhi, et al. (2003). "Endothelial infection with KSHV genes in vivo reveals that vGPCR initiates Kaposi's sarcomagenesis and can promote the tumorigenic potential of viral latent genes." Cancer Cell **3**(1): 23-36.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.

- O'Neil, J. D., T. J. Owen, et al. (2008). "Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 modulates the AP-1 transcription factor pathway in nasopharyngeal carcinoma cells and enhances angiogenesis in vitro." J Gen Virol **89**(Pt 11): 2833-42.
- Ohagen, A., L. Li, et al. (2000). "Cell-dependent mechanisms restrict the HIV type 1 coreceptor activity of US28, a chemokine receptor homolog encoded by human cytomegalovirus." AIDS Res Hum Retroviruses **16**(1): 27-35.
- Paulsen, S. J., M. M. Rosenkilde, et al. (2005). "Epstein-Barr virus-encoded BILF1 is a constitutively active G protein-coupled receptor." J Virol **79**(1): 536-46.
- Paydas, S., M. Ergin, et al. (2008). "Prognostic significance of EBV-LMP1 and VEGF-A expressions in non-Hodgkin's lymphomas." Leuk Res **32**(9): 1424-30.
- Prepens, S., K. A. Kreuzer, et al. (2007). "Discovery of herpesviruses in multi-infected primates using locked nucleic acids (LNA) and a bigenic PCR approach." Virology **4**: 84.
- Roizman, B. (1996). "The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11307-12.
- Rosenkilde, M. M., T. Benned-Jensen, et al. (2006a). "Molecular pharmacological phenotyping of EBI2. An orphan seven-transmembrane receptor with constitutive activity." J Biol Chem **281**(19): 13199-208.
- Rosenkilde, M. M. and T. N. Kledal (2006b). "Targeting herpesvirus reliance of the chemokine system." Curr Drug Targets **7**(1): 103-18.
- Rosenkilde, M. M., T. N. Kledal, et al. (2005). "High constitutive activity of a virus-encoded seven transmembrane receptor in the absence of the conserved DRY motif (Asp-Arg-Tyr) in transmembrane helix 3." Mol Pharmacol **68**(1): 11-9.
- Rosenkilde, M. M., K. A. McLean, et al. (2004). "The CXC chemokine receptor encoded by herpesvirus saimiri, ECRF3, shows ligand-regulated signaling through Gi, Gq, and G12/13 proteins but constitutive signaling only through Gi and G12/13 proteins." J Biol Chem **279**(31): 32524-33.
- Rovati, G. E., V. Capra, et al. (2007). "The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state." Mol Pharmacol **71**(4): 959-64.
- Saliou, A., P. Delobel, et al. (2011). "Concordance between two phenotypic assays and ultradeep pyrosequencing for determining HIV-1 tropism." Antimicrob Agents Chemother **55**(6):2831-6.
- Sanger, F., J. E. Donelson, et al. (1974). "Determination of a nucleotide sequence in bacteriophage phi DNA by primed synthesis with DNA polymerase." J Mol Biol **90**(2): 315-33.
- Santoro, A., L. Castagna, et al. (2003). "Lymphomas." Cancer Chemother Biol Response Modif **21**: 399-428.

- Schuster, V. and H. W. Kreth (2000). "X-linked lymphoproliferative disease is caused by deficiency of a novel SH2 domain-containing signal transduction adaptor protein." Immunol Rev **178**: 21-8.
- Schwartz, T. W., T. M. Frimurer, et al. (2006). "Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model." Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 481-519.
- Schwarz, M. and P. M. Murphy (2001). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor constitutively activates NF-kappa B and induces proinflammatory cytokine and chemokine production via a C-terminal signaling determinant." J Immunol **167**(1): 505-13.
- Siakallis, G., D. A. Spandidos, et al. (2009). "Herpesviridae and novel inhibitors." Antivir Ther **14**(8): 1051-64.
- Springael, J. Y., E. Urizar, et al. (2007). "Allosteric properties of G protein-coupled receptor oligomers." Pharmacol Ther **115**(3): 410-8.
- Streblow, D. N., C. Soderberg-Naucler, et al. (1999). "The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration." Cell **99**(5): 511-20.
- Vieira, J., T. J. Schall, et al. (1998). "Functional analysis of the human cytomegalovirus US28 gene by insertion mutagenesis with the green fluorescent protein gene." J Virol **72**(10): 8158-65.
- Vischer, H. F., S. Nijmeijer, et al. (2008). "Viral hijacking of human receptors through heterodimerization." Biochem Biophys Res Commun **377**(1): 93-7.
- Waldhoer, M., T. N. Kledal, et al. (2002). "Murine cytomegalovirus (CMV) M33 and human CMV US28 receptors exhibit similar constitutive signaling activities." J Virol **76**(16): 8161-8.
- Wang, F., P. Rivailler, et al. (2001). "Simian homologues of Epstein-Barr virus." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1408): 489-97.
- Yasmum, N. (2005). Weiterentwicklung einer PCR-Methode zum universalen Nachweis von Herpesviren bei Primaten. Diplomarbeit; Fachbereich Molekularbiologie; Humbolt-Universität zu Berlin.
- Young, L. S. and P. G. Murray (2003). "Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours." Oncogene **22**(33): 5108-21.
- Young, L. S. and A. B. Rickinson (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." Nat Rev Cancer **4**(10): 757-68.
- Zhang, M., D. Mizrachi, et al. (2005). "The formation of a salt bridge between helices 3 and 6 is responsible for the constitutive activity and lack of hormone responsiveness of the naturally occurring L457R mutation of the human lutropin receptor." J Biol Chem **280**(28): 26169-76.
- Zoetewij, J. P., A. V. Moses, et al. (2001). "Targeted inhibition of calcineurin signaling blocks calcium-dependent reactivation of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus." Blood **97**(8): 2374-80.

Zuo, J., A. Currin, et al. (2009). "The Epstein-Barr virus G-protein-coupled receptor contributes to immune evasion by targeting MHC class I molecules for degradation." PLoS Pathog **5**(1): e1000255.

11 Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AG-E	Arbeitsgruppe Ehlers
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
Cam	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
D	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPOL	DNA Polymerase
ds	double strand (Doppelstrang)
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“
ER	endoplasmatisches Reticulum
et al.	und andere
FKS	fötales Kälberserum
gB	Glykoprotein B
GFP	„green fluorescent protein“
gp	Glykoprotein
GDP	Guanosindiphosphat
GHV	Gammaherpesvirus
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden („hours“)
H₂O_{bid}	zweifach destilliertes Wasser
k	kilo (10 ³)

kb	Kilobasen
LCV	Lymphocryptoviren
LD-PCR	Longdistance-PCR
l	Liter
M	molar (Mol pro Liter)
μ	mikro (10^{-6})
m	Meter oder milli (10^{-3})
MDBP	Major DNA Binding Protein
MCS	„multiple cloning site“
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano (10^{-9})
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Log. der Konzentration der H^+ -Ionen in einer Lösung
PR	Protease
PTLD	Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
Ptx	Pertussis Toxin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunden
siehe	siehe
ss	Einzelstrang („single strand“)
Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TM	„Trademark“
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

U	Einheit für die Enzymaktivität (Unit)
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
U-73122	1-[6-(((17 β)-3-Methoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione
wt	Wildtyp
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

12 Anhang

12.1 Oligonukleotide

Primerset Abkürzung	Name des Primers	Sequenz	Amplifikat- größe
gB1A	3055-s	ACAACTACCACAAAGT(n/i)CT(n/i)TTyCC	551 bp
	3058-as	GACCTGCAGCAGGTTyCTrTC(n/i)AC	
gB2A	3056-s	TCTGTGGCATAATTTyC(n/i)AGG	481 bp
	3057-as	CACCCCGGCCCArTAArTA(n/i)CC	
gB3A	2753-s	CCATCCAGATCCArTwyGC(n/i)TAyGA	641 bp
	2756-as	GATGTTCTGCGCCTRRWARTTRTA	
gB4A	2754-s	TGGCTGCCAAGCG(n/i)(n/i)T(n/i)GG(n/i)GA	446 bp
	2755-as	GATGTTCTGCGCCTGRWARTTRTAYTC	
gB6A	3033-s	ATCGCCAG(S)GC(S)TGGTGC	395 bp
	3036-as	TCGGCCGAAAC(R)GTCTT(R)A(M)GTG	
gB7A	3034-s	GGAGCAGCGCAG(N/I)CA(R)AA(Y)ATGGT	365 bp
	3035-as	CTTCCCGACAG(R)AAGTAGT(R)CTG	
gB1B	4103-s	5'-TCGCCGGGTGyTrGAyGAC-3'	486 bp
	4103-as	5'-CCACGCCCGTrAA(n/i)CCGTAC-3'	
gB2B	4104-s	5'-CCCGAGCATCATACAGGCyCAC-3'	282 bp
	4104-as	5'-AGCCGTACACGGCrTTGCAG-3'	
MDBP1A	2944-s	CCTCCCAGGTTcARTWYGcMTAYGA	730 bp
	2944-as	GTGTAGTAGTTGTACTCCcTRAACAT(N/I)GTYTC	
MDBP2A	2945-s	CCGTTGAGGTTCTGAGTGTARTTRTAYTC	500 bp
	2945-as	AAGATCAACCCcAC(N/I)AG(N/I)GT(N/I)ATG	
MDBP3A	3055-s	ACAACTACCACAAAGT(n/i)CT(n/i)TTyCC	551 bp
	3058-as	GACCTGCAGCAGGTTyCTrTC(n/i)AC	
MDBP4A	3056-s	TCTGTGGCATAATTTyC(n/i)AGG	481 bp
	3057-as	CACCCCGGCCCArTAArTA(n/i)CC	
ORF11-1A	3216-s	GTGATCCTAGCTTTCAAGTACAAyCCCTA	
	3219-as	AATTGTTTGGCC(n/i)GGCTTCCA	
ORF11-2A	3217-s	GCTGGCC(n/i)GGCTTCCAYTC	
	3218-as	GCTGGCC(n/i)GGCTTCCAYTC	

Primerset Abkürzung	Name des Primers	Sequenz	Amplifikat- größe
ORF11-3A	3798-s	ACAACTACCACAAAGT(n/i)CT(n/i)TTyCC	416 bp
	3798-as	GACCTGCAGCAGGTTyCTrTC(n/i)AC	
ORF11-4A	3799-s	TCTGTGGCATAATTTyC(n/i)AGG	263 bp
	3799-as	CACCCCGGCCCArTA(n/i)CC	

12.2 Lymphcryptoviren, Abkürzungen, Nomenklatur sowie Informationen über das Probenmaterial

Gruppe	Proben-Nr.	Spezies	Material	Herkunft Primate/Material	vorläufiger Virusname	Akronym	NCBI Accession Nr.
Altweltaffe		Mensch	infizierte Zelllinie	allgemeine Pathologie, Campus Benjamin Franklin	Epstein Barr Virus	EBV	AY037758
		Mensch	infizierte Zelllinie	-	Humanes Herpesvirus 8	HHV-8	U75698
	1577	Schimpanse	Blut	Zoo Berlin/-	Pan troglodytes Lymphocryptovirus 1	PtroLCV1	AF534226
	1596		Milz	-/ILAT*			
	1599		Lunge	-/ILAT*			
	1875		Blut	Zoo Stuttgart/ Ludwig-Maximilians Universität München			
	1876		Blut	Zoo Stuttgart/ Ludwig-Maximilians Universität München			
	1877		Blut	Tierpark Hellabrun/ Ludwig-Maximilians Universität München			
	1878		Blut	Tierpark Hellabrun/ Ludwig-Maximilians Universität München			
	1879		Blut	Tierpark Hellabrun/ Ludwig-Maximilians Universität München			
	2224		Leber	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ Robert Koch-Institut			
	2284		Leber	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ Robert Koch-Institut			

Gruppe	Proben-Nr.	Spezies	Material	Herkunft Primate/Material	vorläufiger Virusname	Akronym	NCBI Accession Nr.
Altweltaffe	2285	Schimpanse	Lymphknoten	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ Robert Koch-Institut	Pan troglodytes Lymphocryptovirus 1	PtroLCV1	AF534226
	2286		Lymphknoten	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ Robert Koch-Institut			
	2293		Lymphknoten	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ Robert Koch-Institut			
	2305		infizierte Zelllinie	-/University of Birmingham, England			
	2406		infizierte Zelllinie	-/ECACC**			
	2517		Leber	Zoo Bremerhaven/DPZ *** Göttingen			
	2518		Lunge	Zoo Bremerhaven/DPZ Göttingen			
	2521		Milz	Zoo Bremerhaven/DPZ Göttingen			
	2751		Lymphknoten	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ Robert Koch-Institut			
	2759		Milz	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ Robert Koch-Institut			
	2761		Lymphknoten	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ Robert Koch-Institut			
	2823		-	-			

Gruppe	Proben-Nr.	Spezies	Material	Herkunft Primate/Material	vorläufiger Virusname	Akronym	NCBI Accession Nr.
Altweltaffe	2940	Schimpanse	Blut	Parco Natura Viva, Italien/Robert Koch-Institut	Pan troglodytes Lymphocryptovirus 1	PtroLCV1	AF534226
	2941		Blut	Parco Natura Viva, Italien/Robert Koch-Institut			
	3141		Bindegewebe	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ Robert Koch-Institut			
	3142		Milz	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ MPI**** Leizig			
	3144		Lunge	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ MPI Leizig			
	3146		Blut	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ MPI Leizig			
	4074		Herz	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ MPI Leizig			
	4485		Thymus	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste MPI Leizig			
	4522		Knochenmark	Zoo Krefeld/ Zoo Berlin			
	4523		Blut	MPI Leizig			
	4575		Milz	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ MPI Leizig			
	4576		Leber	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ MPI Leizig			
	4577		Lunge	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ MPI Leizig			
	4578		Leber	MPI Leizig			
	4579		Milz	MPI Leizig			
	4582		Milz	MPI Leizig			

Gruppe	Proben-Nr.	Spezies	Material	Herkunft Primate/Material	vorläufiger Virusname	Akronym	NCBI Accession Nr.
Altweltaffe	4593	Schimpanse	Magen	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ MPI Leipzig	Pan troglodytes Lymphocryptovirus 1	PtroLCV1	AF534226
	4596		Blut	-/ Robert Koch-Institut			
	4675		-	-			
	4676		-	-			
	4677		-	-/ Robert Koch-Institut			
	4678		-	-/ Robert Koch-Institut			
	4696		Leber	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ Robert Koch-Institut			
	4698		Lunge	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste			
	4697		Niere	-/ Robert Koch-Institut			
	4698		Milz	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste/ Robert Koch-Institut			
	4699		Milz	Altwelt Tai National Park, Elfenbeinküste			
	4754		Serum	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4755		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4759		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4760		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4761		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4762		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4764		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4765		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4766		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			

Gruppe	Proben-Nr.	Spezies	Material	Herkunft Primate/Material	vorläufiger Virusname	Akronym	NCBI Accession Nr.
Altweltaffe	4768	Schimpanse	Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut	Pan troglodytes Lymphocryptovirus 1	PtroLCV1	AF534226
	4769		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4770		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4771		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4772		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4773		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4774		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4778		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4780		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	4787		Blut	Uganda/ Robert Koch-Institut			
	1873		Gorilla	Blut			
	1874	Blut		Zoo Zürich			
	2073	Darm		Zoo Berlin			
	2364	Blut		Zoo Stuttgart			
	2365	Blut		Zoo Stuttgart			
	2366	Blut		Zoo Stuttgart			
	2407	infizierte Zelllinie		ECACC			
	2523	Lymphoblasten		-			
	3566	Tonsillen		Zoo Berlin			
	4256	Blut		-/Freiburg			
	4257	Blut		-/Freiburg			
	4258	Blut		-/Freiburg			
	4260	Blut		-/Freiburg			
	4263	Blut		-/Freiburg			
	4264	Blut		-/Freiburg			
	4266	Blut		-/Freiburg			

Gruppe	Proben-Nr.	Spezies	Material	Herkunft Primate/Material	vorläufiger Virusname	Akronym	NCBI Accession Nr.
Altweltaffe	4268	Gorilla	Blut	-/Freiburg	Gorilla gorilla Lymphocryptovirus 1	GgorLCV1	AF534225
	4270		Blut	-/Freiburg			
	4272		Blut	-/Freiburg			
	4273		Blut	-/Freiburg			
	4275		Blut	-/Freiburg			
	4276		Blut	-/Freiburg			
	4569		Milz	Kamerun/MPI Leipzig			
	4721		Blut	-/Freiburg			
	4724		Blut	-/Freiburg			
	4725		Blut	-/Freiburg			
	4727		Blut	-/Freiburg			
	2366		Gorilla	Blut			
	2370	Blut		Tiergarten Nürnberg			
	2371	Blut		Zoo Leipzig			
	3565	Lymphknoten		Zoo Berlin			
	3566	Tonsille		Zoo Berlin			
	4256	Blut		-			
	4588	Milz		Kongo/MPI Leipzig			
	4589	Leber		Kongo/MPI Leipzig			
	4590	Lunge		Kongo/MPI Leipzig			
	1941	Orang Utan		Leber	Zoo Duisburg	Pongo pygmaeus Lymphocryptovirus 1	PpygLCV1
	1942		Milz	Zoo Duisburg			
	1943		Lunge	Zoo Duisburg			
	1948		Magen	Zoo Duisburg			
	2029		Niere	Zoo Münster			
	2093		Zunge	Zoo Duisburg			

Gruppe	Proben-Nr.	Spezies	Material	Herkunft Primate/Material	vorläufiger Virusname	Akronym	NCBI Accession Nr.
Altweltaffe	2116	Orang Utan	Blut	-	Pongo pygmaeus Lymphocryptovirus 1	PpygLCV1	AY129398
	2122		Lunge	Zoo Berlin			
	2123		Dünndarm	-			
	2119	Orang Utan	Niere	Zoo Berlin	Pongo pygmaeus Lymphocryptovirus 2	PpygLCV2	GQ921926
	2120		Milz	Zoo Berlin			
	2121		Lymphknoten	Zoo Berlin			
	2557	Gibbon	Lymphknoten	-	Hylobates syndactylus Lymphocryptovirus 1	HsynLCV1	AY608703
	2559		Lunge	-			
	2560		Leber	-			
	2557	Gibbon	Lymphknoten	-	Hylobates syndactylus Lymphocryptovirus 2	HsynLCV2	GQ921924
	2559		Lunge	-			
	2560		Leber	-			
	2383	Gibbon	Blut	Zoo Stuttgart	Hylobates lar Lymphocryptovirus 1	HlarLCV1	AY196147
	2385		Blut	Zoo Ulm			
	1809	Makake	Blut	-/DPZ Göttingen	Macaca fuscata Lymphocryptovirus 1	MfusLCV1	AF534224
	0978	Kolobus	-	-	Colobus guereza Lymphocryptovirus 1	CgueLCV1	AF534219
	2036	Mandrill	Milz	Zoo Münster/ DPZ Göttingen	Mandrillus sphinx Lymphocryptovirus 1	MsphLCV1	AF534227
	3354	Bonobo	Blut	-/MPI Leipzig	Pan paniscus Lymphocryptovirus 1	PpanLCV1	AF5344220
	1841	Langur	Blut	-/ DPZ Göttingen	Semnopithecus entellus lymphocryptovirus 1	SentLCV1	AF534223
	2094	Baboon	-	-	Papio hamadryas lymphocryptovirus 1	PhamLCV1	AY174069
	Makake	-	-	Ceropithecine Herpesvirus 15	CeHV-15	AY037858	
1668	Makake	Blut	-/ DPZ Göttingen	Macaca fascicularis lymphocryptovirus 1	MfasLCV1	AF534221	
1669		Blut	-/ DPZ Göttingen				

Gruppe	Proben-Nr.	Spezies	Material	Herkunft Primate/Material	vorläufiger Virusname	Akronym	NCBI Accession Nr.
Altwelt-affe	1688	Makake	Blut	-/ DPZ Göttingen	Macaca silenus lymphocryptovirus 1	MsilLCV1	AF534222
	1681	Makake	Blut	-/ DPZ Göttingen	Macaca tibetana lymphocryptovirus 1	MtibLCV1	AY174065
Neuweltaffe	2471	Meerkatze	Niere	Zoo Rostock/ DPZ Göttingen	Erythrocebus patas lymphocryptovirus 1	EpatLCV1	AY196148
		Meerkatze			Cercopithecus neglectus lymphocryptovirus 1	CnegLCV1	AY728176
	3278	Marmorset	Milz	-/ DPZ Göttingen	Callitrichine herpesvirus 3	CalHV3	AF091061
	2033	Totenkopffaffe	Darm	Zoo Münster/ DPZ Göttingen	Saimiri sciureus lymphocryptovirus 1	SsciLCV1	AY172953
	2209	Klammeraffe	Milz	Zoo Berlin/ ILAT	Atelis paniscus lymphocryptovirus 1	ApanLCV1	AY139028
	1925	Saki	Milz	Zoo Dortmund/ DPZ Göttingen	Pithecia pithecia lymphocryptovirus 1	PpitLCV1	AY139025
		Marmorset	-	-	Callithrix penicillata lymphocryptovirus 1	CpenLCV1	AY139028
	2141	Kapuziner	Lunge	Zoo Münster/ DPZ Göttingen	Celebus albifrons Lymphocryptovirus 1	CalbLCV1	AF338385

* Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT), Berlin

** European Collection of Cell Cultures (ECACC)

*** Deutsches Primaten Zentrum

****Max Planck Institut

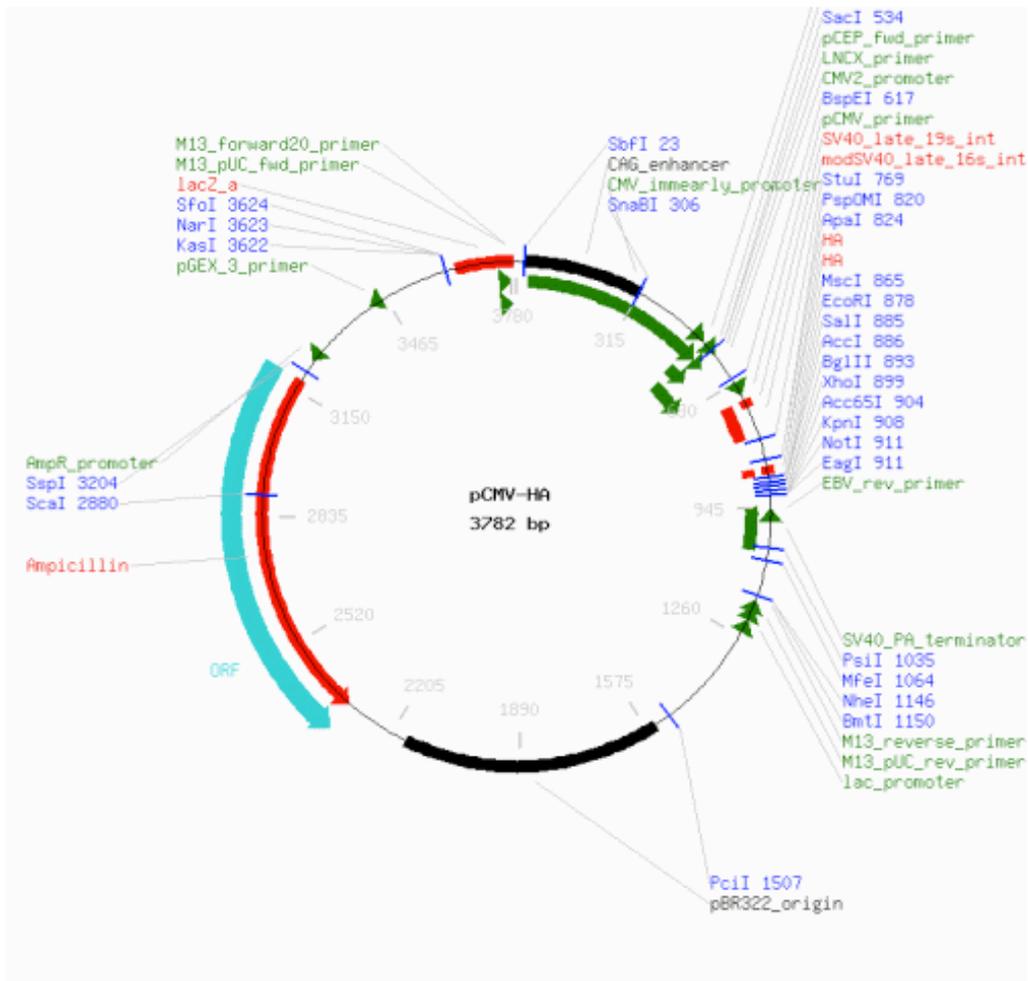
12.3 Rekombinante Plasmide

Tabelle 21 Übersicht über die rekombinanten Plasmide und in welchen Versuchen sie eingesetzt wurden

Vektor	Insert	Rekombinantes Plasmid	Akronym	Versuch
pCMV-myc	HsynLCV1-GPCR	pCMV-myc HsynLCV1-GPCR	CMV-M 1	Protein-Expression
	PtroLCV1-GPCR	pCMV-myc PtroLCV1-GPCR	CMV-M 2	
	PpygLCV1-GPCR	pCMV-myc PpygLCV1-GPCR	CMV-M 3	
	BILF1	pCMV-myc BILF1	CMV-M 4	
pGADT7-HA	HsynLCV1-GPCR	pGADT7-HA HsynLCV1-GPCR	GADT7-HA 1	<i>In vitro</i> -Expression
	PtroLCV1-GPCR	pGADT7-HA PtroLCV1-GPCR	GADT7-HA 2	
	PpygLCV1-GPCR	pGADT7-HA PpygLCV1-GPCR	GADT7-HA 3	
	BILF1	pGADT7-HA BILF1	GADT7-HA 4	
pCMV-HA	HsynLCV1-GPCR	pCMV-HA HsynLCV1-GPCR	CMV-HA 1	Zelllokalisierung/ ELISA/ Creb-, NFAT- und NFκB Luciferase Versuche
	PtroLCV1-GPCR	pCMV-HA PtroLCV1-GPCR	CMV-HA 2	
	PpygLCV1-GPCR	pCMV-HA PpygLCV1-GPCR	CMV-HA 3	
	BILF1	pCMV-HA BILF1	CMV-HA 4	
pcDNA3+	US28	pcDNA US28	pcDNA-US28	NFAT- und NFκB Luciferase
	HHV8	pcDNA HHV8	pcDNA-HHV8	Versuche

12.4 Vektorkarten und N-terminale Markierung

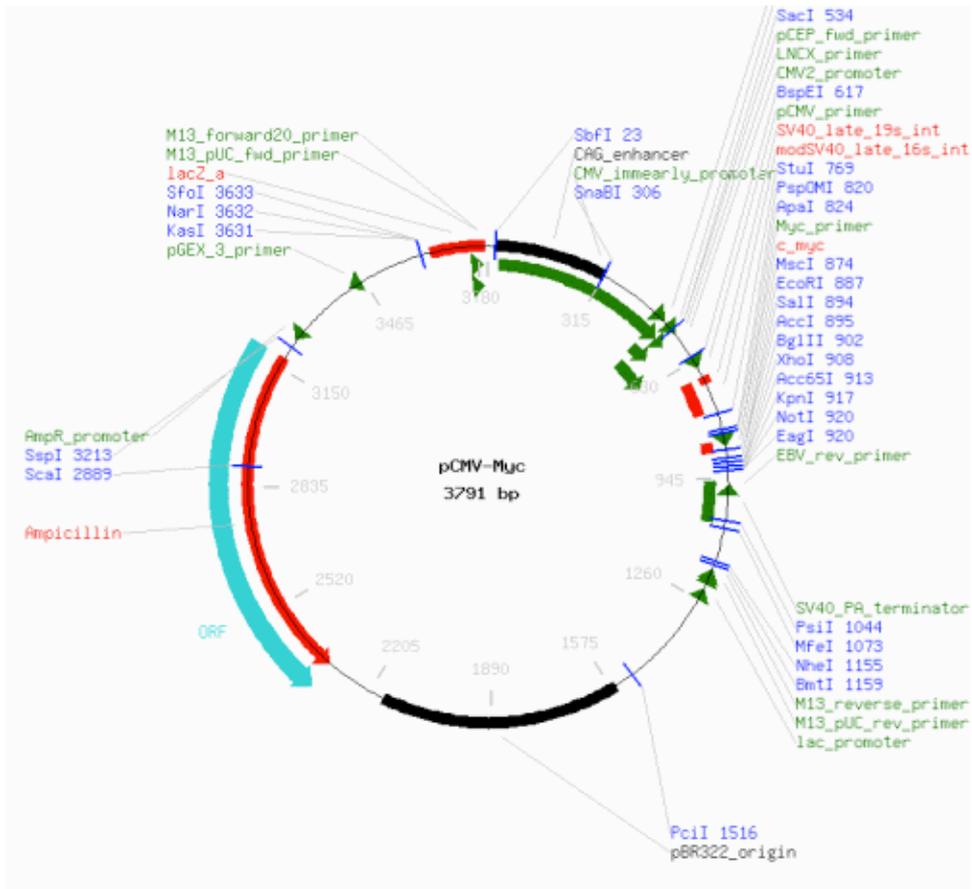
pCMV-HA



HA Tag Sequenz (N-Terminus):

ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT

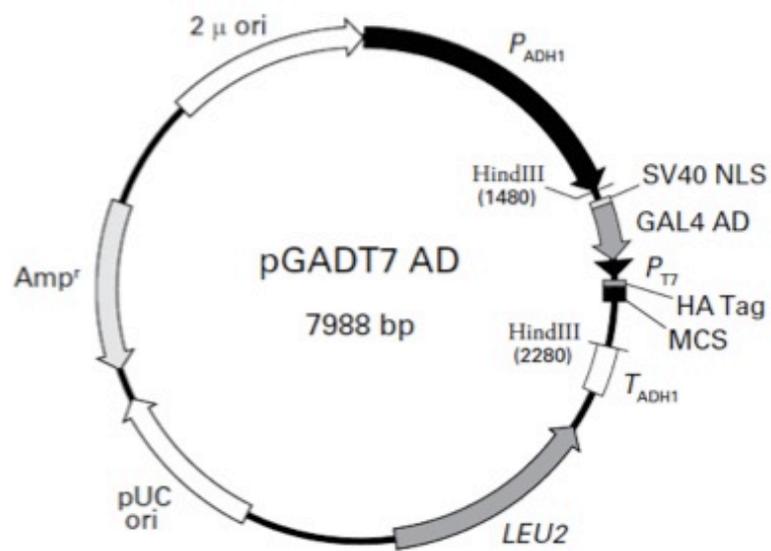
pCMV-myc



Myc Tag Sequenz (N-terminus):

ATG GCA TCA ATG CAG AAG CTG ATC TCA GAG GAG GAC CTG

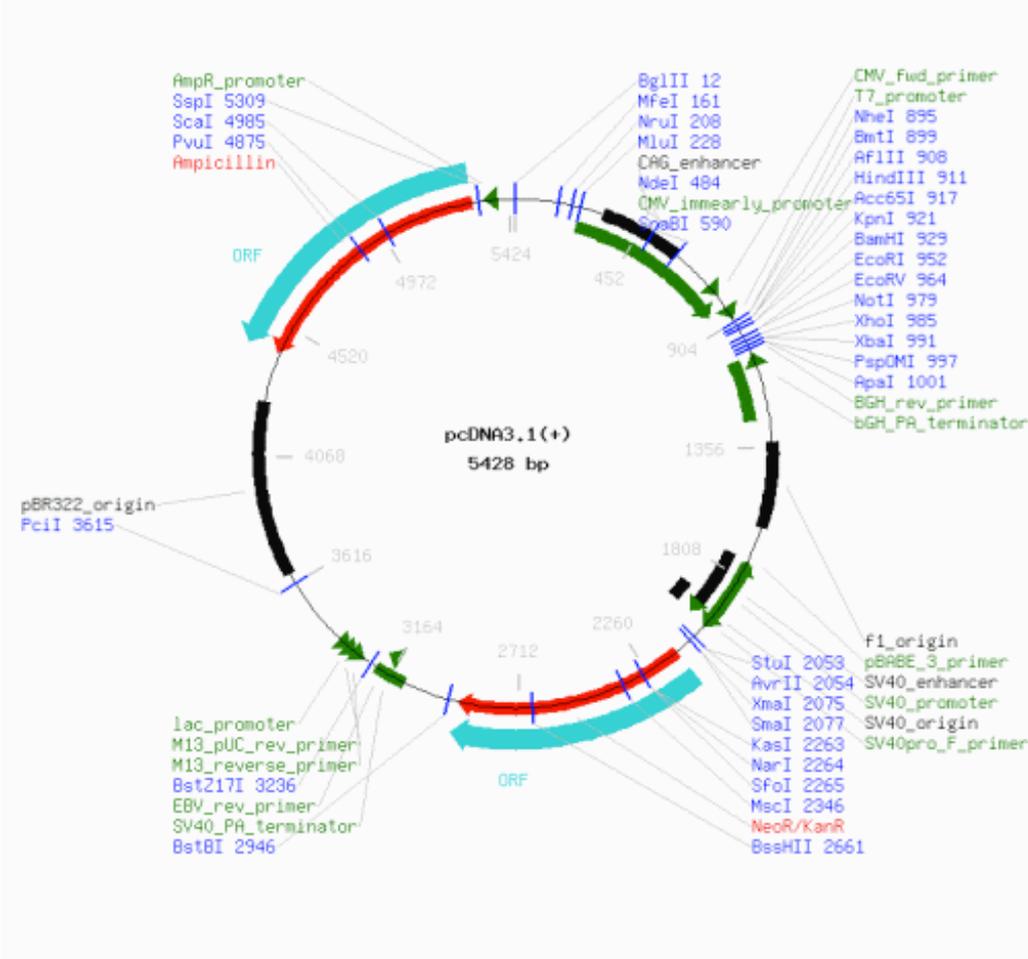
Vektorkarte: pGADT7 AD



HA Tag Sequenz (N-Terminus):

TAC GAC GTA CCA GAT TAC GCT

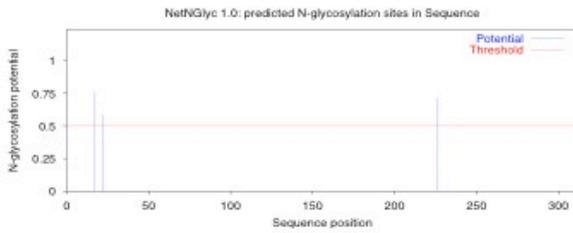
pcDNA3.1 (+)



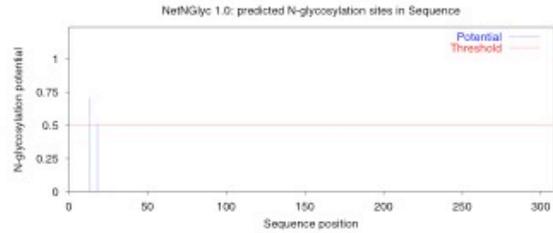
12.5 Theoretisch bestimmte Modifikationen der vGPCRs

Theoretisch bestimmte N-Glykosylierungsstellen der vGPCRs

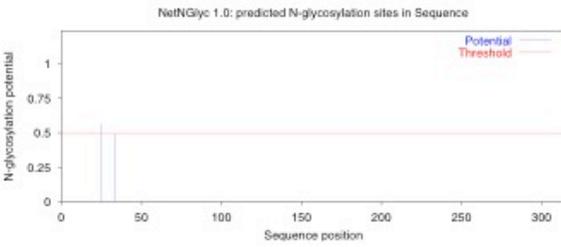
BILF1



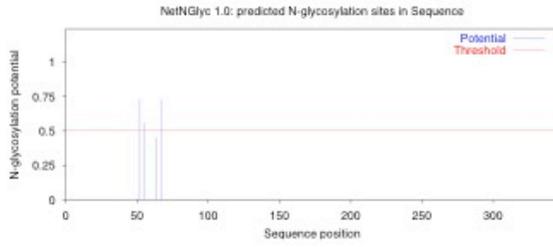
PtroLCV1



PpygLCV1



HsynLCV1

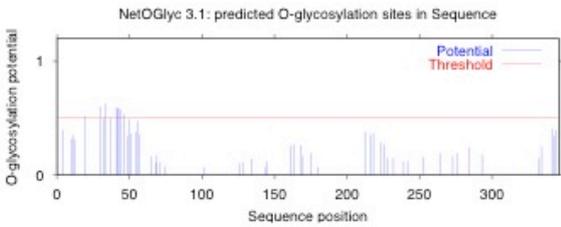


Verwendete Software: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

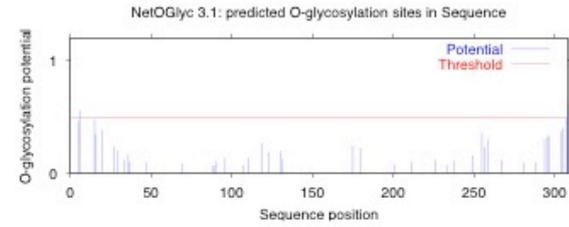
(Grenzwert < 0.5)

Theoretisch bestimmte O-Glykosylierungsstellen der vGPCRs

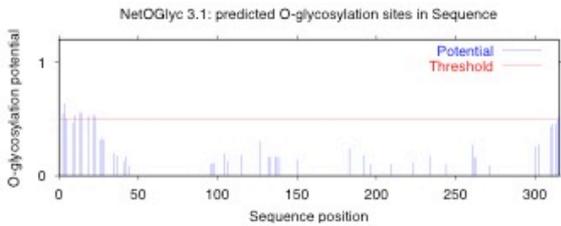
BILF1



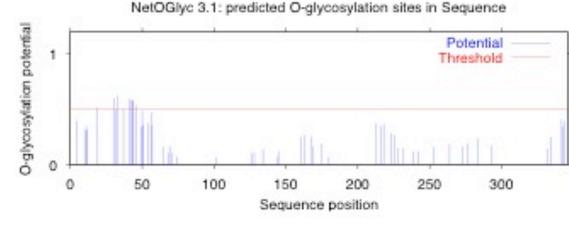
PtroLCV1



PpygLCV1



HsynLCV1



<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>

(Grenzwert < 0.5)

13 Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Georg Pauli für die Bereitschaft zur Übernahme der gutachterlichen Tätigkeit dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Bernhard Ehlers für die Überlassung des Themas, die kontinuierliche Unterstützung und Betreuung sowie das geduldige Warten auf die schriftliche Fassung meiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Mette M. Rosenkilde für ihren großen wissenschaftlichen Beitrag und ihre stetige Ermunterung.

Ich danke meiner gesamten Arbeitsgruppe P14 sowie unserer Nachbargruppe „FG12“ für die gute und angenehme Zusammenarbeit. Ein ganz besonderer Dank gilt hier Nezlisah Yasmun, Bettina Müller, Kerstin Meyer, Sandra Prepens, Merlin Deckers, Sonja Thiele, Jacob Ettinger, Tim Finsterbusch, Claudia Röchner, Petra Kurzendörfer und Maria Woznik für ihre Geduld und ihren wertvollen fachlichen Tipps. Ich bin sehr glücklich, dass ich von so hilfsbereiten, herausfordernden und inspirierenden Kollegen, während meiner Doktorarbeit umgeben war.

Der gesamten Arbeitsgruppe „Molekulare Pharmakologie“ von der Universität Kopenhagen, Dänemark, danke ich für die überaus freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe während meiner Wochen in Kopenhagen. Ein großes Dankeschön möchte ich Valentina Kubale aussprechen, die mich mit viel Geduld in die funktionellen Analysen eingeführt hat.

Meinem „INAGEN Team“ und besonders Dr. Thomas Kledal und Dr. Mads Jeppesen weil sie immer an mich glauben.

Meinen Freunden gilt jede mögliche Art des Dankens: Schön, dass ihr immer für mich da seid!

Meinen Eltern und meiner Familie möchte ich ganz besonders danken. Ohne eure Unterstützung in allen Lebenslagen hätte ich es nie soweit geschafft.

14 Erklärung

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne fremde Hilfe verfasst und noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt wurde.

Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt. Wörtliche und sinngemäße Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Kopenhagen, den 25.02.2013