Universität Ulm
Institut für Mikrobiologie
Abteilung für Virologie
Leiter: Prof. Dr. Thomas Mertens

Die Klonierung des Glykoprotein H des Humanen Herpesvirus 8 (HHV-8) und die Überprüfung seiner Eignung als diagnostisch relevantes Antigen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von

Angelika Christiane Lang
geb. Stauber
aus Böblingen

2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Mertens

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Kern

Tag der Promotion: 10. Mai 2007

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis 5

1 Einleitung 9

1.1 Das Kaposi-Sarkom 9

1.2 Herpesviren und ihre Glykoproteine 12

1.3 Diagnostik der HHV-8 Infektion 16

1.4 Zielsetzung der Arbeit 19

2 Materialien 20

2.1 Geräte 20

2.2 Verbrauchsmaterialien 21

2.3 Chemikalien 22

2.4 Sonstige Materialien 22

2.5 Radiochemikalien zur Sequenzierung 23

2.6 Enzyme und DNA-Längenstandard 23

2.7 Primer 23

2.8 Antikörper 25

2.9 Antibiotika und Virostatika 25

2.10 Eingesetzte Kits 25

2.11 Plasmide 26

2.12 Zellen 28

2.13 Vakziniaviren 28

2.14 Kulturmedien, Puffer und Lösungen 28

3 Methoden 35

3.1 Ethanol- und Phenolfällung 35

3.2 Amplifikation der DNA des gH-Gens mittels PCR 35

3.3 DNA-Aufreinigung 37

3.4 Bakterienkultur 38

3.5 Klonierung 39

3.6 Plasmidgewinnung 40

3.7 Proteingewinnung durch Bakterieninduktion 40

3.8 Zellkultur 41

3.9 Eukaryontische Expression des gH im Vakziniavirus- system 41

3.10 Sequenzierung 44

3.11 Proteinaufreinigung 45
3.12 Herstellung von Kaninchenantikörpern 47
3.13 Zur Testung des gH eingesetzte Humanseren 47
3.14 Western-Blot 47
3.15 Immunfluoreszenztestung 49
3.16 ELISA-Protokoll 49
4 Ergebnisse 51
4.1 Klonierung des Glykoprotein H (gH) des HHV-8 51
4.2 Prokaryontische Expression des gH in E. coli 53
4.3 Eukaryontische Expression des gH im Vakziniavirus- system 60
4.4 Sequenzierung des gH 69
4.5 Immunologische Charakterisierung des gH 69
4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse 79
5 Diskussion 80
5.1 Expression des gH 80
5.2 Lösung und Aufreinigung der rekombinanten Proteine 82
5.3 Immunologische Untersuchung des gH 83
5.4 Weshalb läßt sich das Gesamt-gH nicht exprimieren und warum ist das gH in Fragmenten kaum immunogen? 83
5.5 Die Diagnostik der HHV-8 Infektion 91
6 Zusammenfassung 99
6.1 Klonierung und Expression des gH 99
6.2 Immunologische Charakterisierung des gH 99
6.3 Fazit 100
7 Literaturverzeichnis 101
8 Anhang 115

Abkürzungsverzeichnis

6xHIS-tag	Peptidmarkierung eines Proteins mit sechsmal der Aminosäure Histidin, welche über eine Interaktion mit Nickelionen eine Aufreinigung der markierten Proteine ermöglicht
AA	Aminosäuren (Amino Acids)
Abb.	Abbildung
AIDS	Erworbenes Immundefizienz Syndrom als Folge einer Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus (Aquired Immune Deficiency Syndrome)
AK	Antikörper
AmpR	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
BCBL	Body Cavity-Based Lymphoma, Lymphom der Körperhöhlen
bidest.	bidestillata; zweimal destilliert
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbumin (Bovines Serumalbumin)
BUdR	Bromuracildesoxyribose, Virostatikum
CHO-Zellen	Ovarzellen des Chinesischen Hamsters
dATP	2'-Deoxyadenosine 5'-Triphosphat, DNA-Baustein
dCTP	2'-Deoxycytidine 5'-Triphosphat, DNA-Baustein
dGTP	2'-Deoxyguanosine 5'-Triphosphat, DNA-Baustein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium, Zellmedium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonucleotid-Triphosphate, DNA-Bausteine
dTTP	2'-Deoxythimidine 5'-Triphosphat, DNA-Baustein
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus, Humanpathogenes Herpesvirus
EIA	Enzym-Immunassay
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (Enzym-Linked-Immuno-sorbent Assay)
F1	Fragment F1 des Glykoprotein H des HHV-8 mit den ersten 153 Aminosäuren (BamH1-EcoRV-Schnittstelle, Basenpaare 1-460)
F2	Fragment F2 des Glykoprotein H des HHV-8 mit den zweiten 204 Aminosäuren (EcorRV-Sph-Schnittstelle, Basenpaare 461-1072)

F2+3	Fragment F2 und F3 des Glykoprotein H des HHV-8 kombiniert (EcoRV-Kpn-Schnittstelle, 416 Aminosäuren, Basenpaare 461-1712)
F3	Fragment F3 des Glykoprotein H des HHV-8 mit den dritten 213 Aminosäuren (Sph-Kpn-Schnittstelle, Basenpaare 1073-1712)
F4	Fragment F4 des Glykoprotein H des HHV-8 mit den vierten 160 Aminosäuren (Kpn-Stu(Ende)-Schnittstelle, Basenpaare 1713-2199)
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat, Fluoreszenzfarbstoff
g	Glykoprotein
gH	Glykoprotein H
gL	Glykoprotein L
GP 85	gH-Analogon des Epstein-Barr-Virus
GuHCL	Guanidinhydrochlorid
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HHV-7	Humanes Herpesvirus 7
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8, auch Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus (KSHV) genannt
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
HSV-1	Herpes-simplex-Virus Typ 1
HSV-2	Herpes-simplex-Virus Typ 2
HVS	Herpesvirus Saimiri
IFT	Immunfluoreszenztest
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase
IU	Internationale Einheit (international Unit)
kD	Kilodalton
KS	Kaposi-Sarkom
KSHV	Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus, anderer Name für das Humane Herpesvirus 8 (HHV-8)
MCS	Multiple Cloning Site, Einklonierungsstelle

MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute
MOI	Multiplicity Of Infection, Verhältnis Viren zu Zellen
mRNA	Messenger RNA, transkribierte RNA
Ni	Nickel
Ni-NTA	Nickel-Nitrilessigsäure (nickel-nitriloacetid acid)
OPD	o-Phenylendiamine
ORF	offener Leserahmen (open reading frame): DNA-Sequenz, die für ein Protein kodiert
PBMC	Periphere Blutlymphozyten
pBS-F2+F3	Plasmid pBlueskript II SK mit den 1252 langen Fragmenten F2+3 des gH des HHV-8
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion)
POD	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
pQE18-gH	Plasmid pQE 18 mit einkloniertem gH
pQE30-F1	pQE-Plasmid mit den vordersten 460 Basenpaaren des gH des HHV-8 (Basenpaare 1-460)
pQE30-F2	pQE-Plasmid mit den mittleren 612 Basenpaaren des gH des HHV-8 (Basenpaare 461-1072)
pQE30-F2+3	pQE-Plasmid mit den mittleren 1252 Basenpaaren des gH (Basenpaare 461-1712)
pQE30-gH	pQE30-Plasmid mit einkloniertem Gesamt-gH des HHV-8
pQE31-F4	pQE-Plasmid mit den hintersten 486 Basenpaaren des gH des HHV-8 (Basenpaare 1713-2199)
pQE32-F3	pQE-Plasmid mit den mittleren 640 Basenpaaren des gH des HHV-8 (Basenpaare 1073-1712)
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
RRV	Rhesusaffenrhadinovirus
rVV	Rekombinantes Vakziniavirus
rVV-gH	Rekombinantes Vakziniavirus mit einkloniertem Glykoprotein H
rVV-gH6HIS	Rekombinantes Vakziniavirus mit einkloniertem Glykoprotein H des HHV-8 und 6x Histidin Markierung am Anfang des Proteins
rVV-gH6HIS/3‘	Rekombinantes Vakziniavirus mit einkloniertem Glykoprotein H des HHV-8 und 6x Histidin Markierung am 3' Ende

rVV-gH6HISΔT5	Rekombinantes Vakziniavirus mit einkloniertem Glykoprotein H des HHV-8 und 6x Histidin Markierung ohne bakteriellen Promotor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N‘, N‘-Tetramethylethylendiamin
TK	Thymidinkinase
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
VZV	Varizella-Zoster-Virus, humanpathogenes Herpesvirus

Benutzte SI-Einheiten:

A	Ampère
Bq	Bequerel
g	Gramm
h	Stunde (hour)
l	Liter
m	Meter
M	Molar
s	Sekunde
W	Watt
V	Volt

Vergrößerungen und Verkleinerungen

k	kilo, tausend
m	milli, tausendstel
µ	mikro, millionstel
n	nano, milliardstel
p	pico, billionstel

1 EINLEITUNG

In dieser Arbeit sollte ein Glykoprotein, das Glykoprotein H (gH), des 1994 entdeckten Humanen Herpesvirus 8 (HHV-8) exprimiert und auf seine Eignung als diagnostisch relevantes Antigen hin untersucht werden. Das HHV-8 wird in Kaposi-Sarkomen nachgewiesen und ist wahrscheinlich ursächlich für diese Erkrankung.

1.1 Das Kaposi-Sarkom

Das Kaposi-Sarkom ist eine seltene maligne vaskuläre Neoplasie der Haut.
1872 wurde es von Moritz Kaposi erstmals beschrieben. Es befällt vor allem die Haut und die hautnahen Schleimhäute, aber auch die innern Organe können befallen werden. Die Läsionen treten multifokal auf. Sie entwickeln sich von dunkelroten Flecken zu braun-bläulichen Knötchen und Plaques. Auch exulzerierende Knoten können im Krankheitsverlauf entstehen. Histologisch zeigt das Kaposi-Sarkom eine Wucherung endothelartiger Zellen und eine Fibroblastenproliferation. Es entsteht ein Mischbild mit spindelförmigen Zellen und endothelausgekleideten Vaskularräumen [Damania et al. 2000].
Seit der Verbreitung des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) hat das Kaposi-Sarkom einen dramatischen Bedeutungswandel erfahren und ist eine häufige Neoplasie im Rahmen der AIDS-Erkrankung (Aquired Immun Deficiency Syndrom) [André et al. 1997].
Im allgemeinen werden vier Formen des Kaposi-Sarkoms unterschieden:

- Eine klassische (sporadische) Variante, die sehr selten ist. Sie betrifft hauptsächlich Männer jenseits des 50. Lebensjahres aus Südosteuropa und Juden. Der Krankheitsverlauf erstreckt sich meist über viele Jahre bei langsamer Progredienz.
- Eine endemische Variante, die in Afrika auftritt. Hier tritt häufiger ein Befall der inneren Organe auf.
- Eine epidemische Variante (HIV-Infektion), an der ca. 15-20% der Patienten mit AIDS [Chang et al. 1994] erkranken. Auf hochwirksame antiretrovirale Therapien erfolgt manchmal ein Rückgang der Progredienz oder sogar eine Abheilung der Läsionen.
- Eine Variante, die mit immunsuppressiven Therapien, z.B. nach Organtransplantation, assoziiert ist [Rüdlinger 1996].

Schon seit langem wird eine infektiöse Genese des Kaposi-Sarkoms vermutet. Die epidemiologischen Besonderheiten des Kaposi-Sarkoms unterstützen diese Vermutung. So ist die klassische Variante des Kaposi-Sarkoms auf bestimmte ethnische Gruppen und geographische Regionen konzentriert [Rüdlinger 1996]. Bei der endemischen Variante tritt eine Häufung in verschiedenen Regionen Zentralafrikas, z. B. in Uganda auf [Gao et al. 1996b].

Bei der HIV-assoziierten Form des Kaposi-Sarkoms fallen mehrere Besonderheiten auf: Das Risiko eines HIV-Infizierten, ein Kaposi-Sarkom zu entwickeln ist etwa 20.000 mal höher als das Risiko der Normalbevölkerung [O'Neill et al. 1997]. Der Krankheitsverlauf ist beim HIV-assoziierten Kaposi-Sarkom sehr viel bösartiger und zeigt weitaus häufiger einen disseminierten Befall als das klassische Kaposi-Sarkom. Bei epidemiologischen Untersuchungen zum Auftreten eines Kaposi-Sarkoms im Rahmen der AIDS-Erkrankung zeigte sich, daß bei homosexuellen und bisexuellen HIV-infizierten Männern das Risiko ein Kaposi-Sarkom zu entwickeln fast 20-fach höher lag (bei ca. 50%) als bei anderen Patientengruppen mit AIDS [Chang et al. 1994]. Auch bei den an AIDS erkrankten Frauen sind solche mit bisexuellen Partnern häufiger betroffen. Diese AIDS-assoziierte Variante des Kaposi-Sarkoms zeigte überdies eine endemische Häufung, z. B. in New York und Kalifornien [Humphrey et al. 1996; Rüdlinger 1996; Renne et al. 1996].

Bei allen Varianten des Kaposi-Sarkoms sind überwiegend Männer befallen [Rüdlinger 1996]. Bei einigen Fällen von Kaposi-Sarkomen wurde berichtet, daß die Läsionen nach einer Behandlung mit dem Virostatikum Foscarnet abheilten und eine Remission der Erkrankung erzielt werden konnte [Morfeldt und Torssander 1994].

Alle diese Besonderheiten stützen die These, daß das Kaposi-Sarkom durch ein übertragbares infektiöses Agens verursacht wird. Eine sexuelle Übertragung ist naheliegend.

1.1.1 Das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus

Seit vielen Jahren wird bereits nach einer infektiösen Ursache des Kaposi-Sarkoms geforscht. Verschiedene Krankheitserreger wie das humane Zytomegalievirus (HCMV), das Hepatitis-B-Virus, das Humane Herpesvirus 6 (HHV-6), das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) und Mycoplasma penetrans wurden bereits als auslösende Ursache verdächtigt [Chang et al. 1994].

1994 entdeckte Yuan Chang mittels „Representational Difference Analysis" DNA-Sequenzen in Kaposi-Sarkomen [Chang et al. 1994], die Ähnlichkeit mit der DNA des

Herpesvirus saimiri (HVS) und des Epstein-Barr-Virus (EBV) hatten. Bei dieser Methode entnimmt man DNA aus erkrankten Arealen, zum Beispiel Lymphknoten, und vergleicht sie mit der DNA aus nicht befallenem Gewebe. Findet man DNA-Sequenzen, die nur im erkrankten Gewebe vorkommen, so werden diese analysiert und mit der DNA von bekannten Krankheitserregern verglichen.

Diese Sequenzen, die von einem neuen Herpesvirus stammen könnten, wurden mit den Sequenzen der bekannten Herpesviren verglichen. Die Analyse zeigte eine Ähnlichkeit dieses neuen Virus mit dem EBV und dem HVS, einem Herpesvirus, das Lymphome in Affen der Neuen Welt verursacht. Die Übereinstimmungen lagen je nach Gen zwischen 39-67%. Das neu entdeckte Herpesvirus wurde Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus (KSHV) oder Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8) genannt.

Diese Forschergruppe um Patrick Moore publizierte Teile der Gensequenz dieses Herpesvirus. Die phylogenetische Analyse dieser Sequenzen zeigte, wie bereits vermutet, daß das Herpesvirus bei den γ-Herpesviren in die Untergruppe der Rhadinoviren einzuordnen ist. Der nächste bekannte Verwandte ist das HVS und bei den humanen Herpesviren das EBV. Die Gruppe entdeckte 17 unvollständige und vollständige Open Reading Frames (ORFs) und benannte sie nach den analogen ORFs im HVS [Moore et al. 1996a].

Ebenfalls 1996 veröffentlichten Russo et al. einen Großteil der Sequenz des HHV-8 und identifizierten 81 ORFs. Davon wiesen 66 Homologien mit ORFs des HVS auf [Russo et al. 1996]. Sie wurden nach den analogen ORFs im HVS benannt. Die übrigen ORFs wurden mit K und einer Nummer bezeichnet (K1-K15).

Mit der PCR konnte die HHV-8 DNA in Gewebeproben aus Kaposi-Sarkomen gefunden werden. Sie konnte in den Spindelzellen und Endothelzellen nachgewiesen werden, welche typisch für ein Kaposi-Sarkom sind [Boshoff et al. 1995]. 1996 gelang es der Forschungsgruppe um Mesri nachzuweisen, daß das HHV-8 ein übertragbares Virus ist, das auch B-Lymphozyten infiziert [Mesri et al. 1996]. Ein weiterer Hinweis darauf, daß das HHV-8 die infektiöse Ursache des Kaposi-Sarkoms ist, sind Serokonversionen vor Auftreten eines Kaposi-Sarkoms [Kedes et al. 1996]. Eine Übertragung ist über Spermien oder über Speichel denkbar [Monini et al. 1996, Taylor et al. 2004].

1997 wurde ein Herpesvirus in Rhesusaffen gefunden, der sehr eng mit dem HHV-8 verwandt zu sein scheint. Dieses wurde Rhesus Monkey Rhadinovirus (RRV) genannt und ist Gegenstand aktueller Forschung [Desrosiers et al. 1997, Dittmer et al. 2005].

1.2 Herpesviren und ihre Glykoproteine

1.2.1 Herpesviren

Herpesviren sind große, doppelsträngige DNA-Viren. Die Bezeichnung stammt aus dem Griechischen von herpein (kriechen). Sie beschreibt die Ausbreitung der Effloreszensen des Herpes simplex Virus (HSV) auf der Haut. Die Herpesviren enthalten bei einer Größe von 100-300 nm und einer ikosaedrischen Form etwa 150.000 bis 230.000 Basenpaare lineare DNA mit entsprechender Kodierungskapazität. Das Virion besteht aus einer auf einem Protein organisierten doppelsträngigen DNA, einem Viruskapsid, dem Tegument und einer Hülle mit Spikes aus Glykoproteinen (Abb.1.1).

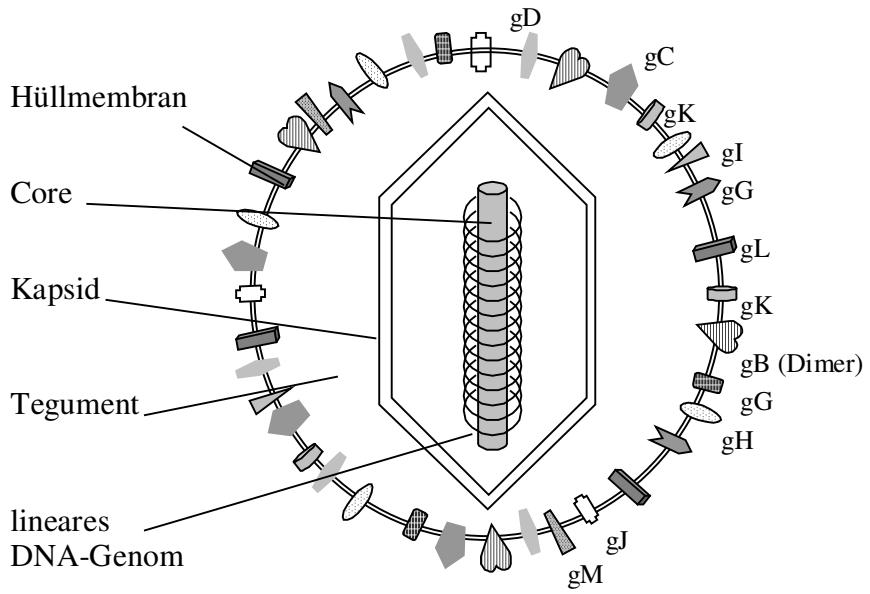


Abb.1.1: Schematische Darstellung eines Herpesvirus. g = Glykoprotein.

Herpesviren sind ubiquitär vorhanden. Es gibt mehr als 80 bekannte Herpesviren. Ihnen gemeinsam ist die Fähigkeit zur Latenz [Clements et al. 1990; Falke 1999; Modrow & Falke 1998].

Die Herpesviren werden in verschiedene Gruppen eingeteilt:

- **α-Herpesviren:** Diese Herpesviren zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum, eine kurze Wachstumszeit und eine schnelle Ausbreitung mit Zerstörung der infizierten Zellen aus. Es sind neurotrope Viren mit Persistenz in Nervenzellen. Bei den humanpathogenen Herpesviren gehören das HSV-1, das HSV-2 und das VZV in diese Gruppe.

- **β-Herpesviren:** Diese Gruppe hat als gemeinsames Merkmal ein enges Wirtsspektrum, einen langsamen Replikationszyklus und eine langsame Ausbreitung. Die virusbefallenen Zellen sind sehr groß. Viren dieser Gruppe sind in Sekretionsdrüsen und lymphoretikulärem Gewebe latent. Bei den humanpathogenen Viren gehört das HCMV, das HHV-6 und das HHV-7 zu dieser Gruppe.
- **γ-Herpesviren:** γ-Herpesviren haben ebenfalls ein enges Wirtsspektrum. Sie infizieren im Unterschied zu den β-Herpesviren B- oder T-Lymphozyten. Humanpathogene Vertreter sind in der Untergruppe Lymphokryptoviren das EBV und in der Untergruppe Rhadinoviren das HHV-8. Vertreter im Tierreich sind zum Beispiel das für bestimmte Affen pathogene HVS und das RRV. Sie gehören ebenfalls in die Untergruppe der Rhadinoviren und sind enge Verwandte des HHV-8.

Die bekannten humanpathogenen Herpesviren sind in der folgenden Tabelle beschrieben.

Tab.1.1: Die humanpathogenen Herpesviren

Name	**Abkürzung**	**Krankheitsbilder**
Herpes simplex Virus 1	HSV-1	Herpes labialis, Gingivostomatitis herpetica, Enzephalitis, Herpes corneae
Herpes simplex Virus 2	HSV-2	Herpes genitalis, Vulvovaginitis, Balanitis, Herpes generalisatus neonatorum
Varizella-Zoster Virus	VZV	Windpocken (Varizellen), Herpes zoster, Enzephalitis, Pneumonie
Epstein-Barr Virus	EBV	Infektiöse Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber), Hepatitis, Burkitt-Lymphom, nasopharyngeales Karzinom, lymphoproliferative Erkrankungen
Humanes Zytomegalievirus	HCMV	Mononukleose ähnliches Krankheitsbild, konnatale CMV-Infektion mit fetalen Fehlbildungen. Insbesondere bei Immunsuppression: Hepatitis, Pneumonie, Nephritis, Gastroenteritis, Retinitis, Enzephalitis

Humanes Herpesvirus 6	HHV-6	Exanthema subitum (Dreitagefieber), febrile Infekte bei Kindern
Humanes Herpesvirus 7	HHV-7	Krankheitszuordnung nicht sicher bekannt (Exanthema subitum?)
Humanes Herpesvirus 8 (Kaposi-Sarkoma assoziiertes Herpesvirus)	HHV-8 (KSHV)	Kaposi-Sarkom, Primary Effusion Lymphoma, Multicentric Castleman's Disease

[Clements et al. 1990; Falke 1999; Modrow & Falke 1998, Levy 1997]

1.2.2 Funktion der Glykoproteine in Herpesviren, Rolle des Glykoprotein H (gH)

Glykoproteine sind Proteine mit angefügten Zuckerketten. Der Kohlenhydratanteil liegt in Form von Oligosaccharidketten vor. Die Glykoproteine spielen in Herpesviren eine wichtige Rolle. Sie sind ein Bestandteil der Virushülle und vermitteln wichtige Funktionen an der Virusoberfläche. Sie sind beteiligt bei der Adsorption der Viren an die Rezeptoren der Zelle und an der Penetration und Aufnahme der Partikel in die Zellen. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Induktion einer schützenden Immunantwort [Modrow & Falke 1998].

Die Hülle des HSV-1 trägt 11 bekannte Glykoproteine und im Genom befinden sich vier weitere ORFs, die für potentielle Glykoproteine kodieren.

Die Glykoproteine lassen sich in drei Bereiche gliedern:

1. Das N-terminale Ende ist hydrophil und befindet sich an der Außenseite des Virus. An ihm hängen die Oligosaccharidketten und die meisten Antigendeterminanten.
2. Die Transmembranregion verankert das Protein in der Hülle des Virus.
3. Das C-terminale Ende ist zytoplasmatisch. Seine Funktion ist nicht bekannt, vermutlich interagiert es mit anderen Membranproteinen.

Die Glykoproteine werden nach der Proteinbiosynthese im rauhen endoplasmatischen Retikulum mit Oligosaccharidketten ausgestattet und im Golgiapparat weiterverarbeitet, bevor sie an die Plasmamembran weitertransportiert werden. Die Oligosaccharidketten tragen zwar nur wenig zu den Antigeneigenschaften der Glykoproteine bei, vermitteln aber eine Erkennungsfunktion und tragen zur korrekten Faltung der Proteine bei [Campadelli-Fiume 1994].

Von diesen Glykoproteinen sind gB, gC, gD, gE, gG, gH und gI an der Oberfläche des Virions und an der Oberfläche der infizierten Zellen lokalisiert [Gompels et al. 1998; Fuller et al. 1989]. gB, gD und gH sind für ein infektiöses Virion essentiell [Foa-Tomasi

et al. 1991]. Wahrscheinlich spielen sie eine Rolle beim Andocken und Eindringen des Virus in die Zelle sowie bei der Fusionierung von Zellen und der Ausschleusung des Virus. gC, gE und gI beeinflussen möglicherweise die Immunreaktion auf eine Infektion. gC bildet einen C3b-Rezeptor, gE und gI bilden gemeinsam einen Rezeptor, der an die Fc-Region von Immunglobulin G binden kann. Ein weiteres Glykoprotein, das Produkt des UL20 Gens, spielt wahrscheinlich eine Rolle im Transport des Virus in den Extrazellularraum [Roberts et al. 1991; Clements et al. 1990; Campadelli-Fiume 1994]. Die Glykoproteine gD, gB und gC des Herpes simplex Virus Typ 1 induzieren bei Immunisierung hohe Titer von virusneutralisierenden Antikörpern und gewährleisten einen guten Schutz vor einer generalisierten Infektion in Tieren [Blacklaws et al. 1990].

Betrachtet man das gH des HSV-1, das Analogon zu dem in dieser Arbeit erforschten gH, so zeigt sich, daß das gH ein wichtiger Bestandteil des infektiösen Virions ist. Eine Mutante des HSV-1, bei der das gH in seiner Aminosäuresequenz verändert ist, bildet zwar Viruspartikel, die gebildeten Viren sind aber nicht infektiös [Desai et al. 1988]. Monoklonale Antikörper gegen das gH des HSV-1 schützen Mäuse vor einer zosteriformen Ausbreitung des HSV-1 [Forrester et al. 1991]. Außerdem wurde festgestellt, daß monoklonale Antikörper gegen das gH des HSV-1 das Eindringen des Virus in die Zelle und den Transfer des Virus von infizierten auf nicht infizierte Zellen, aber nicht das Andocken des Virus an die Zelle verhindern [Fuller et al. 1989; Gompels et al. 1989].

Beim EBV verhindern Antikörper gegen das gH-Analogon, das gp85, eine Infektion mit EBV, indem sie die Fusion mit der Wirtszelle verhindern [Yaswen et al. 1993]. Auch beim VZV, HCMV und HHV-6 bewirken Antikörper gegen das gH einen Schutz vor einer Infektion [Nemecková et al. 1996, Kaye et al. 1992; Urban et al. 1996, Qian et al. 1993].

gH-Analoga wurden auch im Pseudorabies-Virus, im Equinen Herpesvirus 4, Bovinen Herpesvirus 1 und im HVS gefunden [Klupp et al. 1991, Gompels et al 1988].

Zusammenfassend lässt sich zum Glykoprotein H der Herpesviren sagen:

1. Das Glykoprotein H ist das nach dem Glykoprotein B am zweitbesten konservierte Glykoprotein der Familie der Herpesviren, ein gH-Analogon wurde in allen bisher untersuchten Herpesviren gefunden [Pulford et al. 1995].

2. Es spielt eine wichtige Rolle beim Eindringen des Virus in die Zelle aber nicht beim Andocken an die Zelle.
3. Antikörper gegen gH neutralisieren die Infektiosität der Herpesviren Komplement-unabhängig [Takeda et al. 1997].

1.2.3 Das Glykoprotein H des HHV-8

Von der Forschergruppe um Patrick Moore wurde beim Vergleich des Genoms des HHV-8 mit den Genomen des HVS und des EBV ein Analogon zum gH des HVS gefunden [Moore et al. 1996]. Dieses Gen wird im ORF 22 des HHV-8 kodiert und ist 2200 Basenpaare lang. Die Übereinstimmung mit dem gH-Gen des HVS beträgt 35%, mit dem des EBV 26%, die Ähnlichkeit wird beim HVS mit 55%, beim EBV mit 48% angegeben. Diese Ähnlichkeit erlaubt es, das Gen zu identifizieren. Bei einer Übereinstimmung mit dem EBV-Gen von 26% ist es gleichzeitig relativ unwahrscheinlich, daß eine Kreuzreaktivität zwischen dem gH des EBV und dem gH des HHV-8 besteht.
Aufgrund all dieser erwähnten Eigenschaften schien das gH des HHV-8 ein idealer Kandidat für die Herstellung eines serologischen Tests zu sein.

1.3 Diagnostik der HHV-8 Infektion

Die Infektion eines Organismus mit HHV-8 kann entweder auf der DNA- oder auf der Proteinebene nachgewiesen werden. Der Nachweis von HHV-8 spezifischer DNA mittels PCR wurde zuerst angewandt und ist bis heute weit verbreitet. Der Nachweis von Virusproteinen oder von Antikörpern gegen Virusproteine erfolgt mit Hilfe von Immunoblots, Enzym Linked Immunosorbent Assays (ELISA) oder Immunfluoreszenz-untersuchungen.

1.3.1 Test auf das HHV-8 mit der PCR

Schon bald nach der Entdeckung des HHV-8 wurde nach seinen DNA-Sequenzen in verschiedenen Tumoren gesucht. Dabei bediente man sich der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Hierbei wurde, um eine höhere Sensitivität zu erreichen, oft eine „nested PCR“ benutzt. Das ist eine doppelte PCR, bei der zwei PCR-Zyklen nacheinander geschaltet werden. Auch in der Abteilung für Virologie der Universität Ulm wurde die Diagnostik der HHV-8 Infektion mit einer nested-PCR durchgeführt [Pranghofer 2002].
HHV-8-Sequenzen wurden in allen Formen von Kaposi-Sarkomen sowie in Body Cavity-Based Lymphomas (BCBL) und lymphoblastischen Varianten von Multicentric

Castleman‘s Disease gefunden. Das BCBL wird oft auch als Primary Effusion Lymphoma bezeichnet. All diese Erkrankungen sind Neoplasien des lymphatischen Systems [Bigoni et al. 1996; Cathomas et al. 1996; Cesarman et al. 1996; Damania et al. 2000; Decker et al. 1996; Dictor et al. 1996; Gaidano et al. 1996; Jin et al. 1996; Luppi et al. 1996; Weiss et al. 1996].

Um epidemiologische Daten über die Verbreitung des HHV-8 in der Bevölkerung zu erhalten, wurden mononukleäre Zellen im peripheren Blut (PBMCs) auf HHV-8 Sequenzen untersucht [Ambroziak et al. 1995; Bigoni et al. 1996; Decker et al. 1996; Humphrey et al. 1996; Lefrère et al. 1996; Luppi et al. 1996; Moore et al. 1996b, Noel et al. 1995].

Eine Übersicht über die ersten Ergebnisse gibt die folgende Tabelle:

Tab.1.2: Statistik der ersten, in den Jahren 1995 und 1996 veröffentlichten Untersuchungen auf PCR-Sequenzen des HHV-8 in Zellen des peripheren Blutes.

PCRs mit PBMCs		**Patienten mit Kaposi-Sarkom**		**HIV pos. Patienten ohne KS**		**Gesunde Probanden**		**Immun-supprimierte Patienten**	
Autor	**Jahr**	**Anzahl**	**Pos.**	**Anzahl**	**Pos.**	**Anzahl**	**Pos.**	**Anzahl**	**Pos.**
Ambroziak et al.	1995	10	100%			20	0%		
Bigoni et al.	1996			58	7%	56	9%		
Decker et al.	1996	5	60%			5	60%	5	80%
Humphrey et al.	1996	98	35%	64	19%	11	0%		
Lefrère et al.	1996	11	91%	59	3%				
Luppi et al.	1996					13	0%		
Moore et al.	1996	21	52%	42	9,5%				
Noel et al.	1995	78	63%					26	0%

Verwendete Abkürzungen: KS = Kaposi-Sarkom, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, HHV-8 = Humanes Herpesvirus 8, HIV = Humanes Immundefizienzvirus, pos.= positiv, PBMC = Mononukleare Zellen des peripheren Blutes.

Dabei ergaben sich Prozentzahlen zwischen 35-100 % für Patienten mit Kaposi-Sarkom, zwischen 3-19 % für HIV positive Patienten ohne klinisch diagnostiziertes Kaposi-Sarkom und zwischen 0-60 % für gesunde Blutspender (Tab.1.1). Die doch sehr

stark differierenden Zahlen erklären sich teilweise aus der kleinen Probenzahl, wie zum Beispiel bei Decker et al. mit nur 5 Patienten in jedem Kollektiv. Natürlich sind sie auch durch die sehr störanfällige Methode der PCR bedingt. Bei dieser Methode reichen kleinste Verunreinigungen an DNA um durch die expotentielle Vermehrung falsche Ergebnisse zu erhalten.

Um wirklich aussagekräftige Daten über die Durchseuchung der Bevölkerung zu erhalten, benötigt man serologische Tests, mit denen man auch Personen identifizieren kann, die schon vor längerer Zeit Kontakt mit dem HHV-8 hatten. Zudem sind serologische Test wie zum Beispiel der Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) einfach durchzuführen.

Bei Beginn dieser Arbeit gab es kaum Tests mit rekombinanten HHV-8-Proteinen. Nur das Kapsidprotein, kodiert vom ORF 65, und das vom ORF 52 kodierte Protein wurden bereits 1996 für serologische Tests eingesetzt [Simpson et al 1996]. Dabei zeigte sich, daß nur das Protein des ORF 65 für einen serologischen Test geeignet ist, das Protein des ORF 52 zeigte keine Reaktivität. Von den Patienten mit Kaposi-Sarkom und AIDS waren 84% im Western-Blot auf ORF 65 positiv, bei den Gesunden waren es 3%.

Um eine Verbesserung der serologischen Tests zu erreichen und um die Antikörperantwort auf andere Proteine des HHV-8 zu überprüfen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Strukturprotein des HHV-8 rekombinant hergestellt werden. Die Eignung dieses Antigens sollte dann im Western-Blot und ELISA überprüft werden.

Die Glykoproteine eignen sich bei anderen Herpesviren für diesen Zweck sehr gut, da sie Bestandteil der Virushülle sind. Daher wurde für diese Arbeit ein Glykoprotein ausgewählt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Klonierung und Expression des Glykoprotein H (gH) des Human Herpesvirus 8 (HHV-8) und die Überprüfung seiner Eignung als diagnostisch relevantes Antigen. Zu diesem Zweck sollten folgende Teilschritte durchgeführt werden:

1. Amplifikation des gH-Gens mittels PCR aus Lymphknoten eines HIV und HHV-8-koinfizierten Patienten und Klonierung in geeignete Expressionsvektoren.
2. Expression des gH in prokaryontischen und eukaryontischen Expressionssystemen.
3. Optimierter Nachweis des gH durch Immunoblot oder Immunfluoreszenz.
4. Entwicklung eines Immunoblots und eines ELISAs mit dem rekombinanten gH-Protein. Endziel ist der Nachweis einer HHV-8-Infektion in Humanseren mit Hilfe des rekombinanten gH.

2 MATERIALIEN

2.1 Geräte

Analysenwaage für kleine Gewichte AJ 100	Mettler, Gießen
Analysenwaage PM 2000	Mettler, Gießen
Apparatur für Western-Blotting Trans Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Biotrap*BT 1000	Schleicher & Schuell, Dassel
Brutschränke für die Bakterienkultur	Hereaeus Instruments, Hanau
Brutschränke für die Zellkultur	Hereaeus Instruments, Hanau
DNA/RNA-Calculator Gene Quant	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Elektrophoreseapparatur für Agarosegele (DNA Sub Cell ™)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoreseapparatur für Proteingele	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader EAR 400 AT	SLT-Tekan, Overrath
Entwicklungsmachine für Röntgenfilme Sacura QX 60	Konica, Hohenbrunn
Eppendorf Pipetten 10 µl	Eppendorf; Hamburg
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Geltrockner Gel Dryer Model 583	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gilson Pipetten 20, 200 und 1000 µl	Abimed, Langenfeld, Frankreich
große Zentrifuge – Megafuge 1,0 R	Hereaeus Instruments, Hanau
Kamera für Agarosegele	Kaiser, Buchen, Germany
Ligationsbad 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator	LKB, Brommen, Schweden
Magnetstabheizrührer	Janke & Kunkel, Staufen
Membranpumpe – Titertek	Bender & Holbein, Ulm
Mikrowelle	Bosch, Germany
Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
PCR-Cycler	MWG Biotech GmbH, Ebersberg
PH-Meter Multical®	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim

Photometer Spectro Photometer Novaspec II	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Roller für Bakterienkulturen	Bellco, Vineland, USA
Sequencer ABI PRISM® Genetic Analyser	Applied Biosystems, Foster City, USA
Spannungsgeber:	
Microcomputer Electrophoresis Power Supply	Consort, Turnhout, Belgien
Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilbank, Heraeus Lamin Air HLB 2472 GS	Heraeus, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad- Sonifier®B-12	Bransonic, Dansbury, USA
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vakuumpumpe	Bachofer, Reutlingen
Video Graphic Printer	Sony, Tokio, Japan
Vortex-Mixer VF 2	Janke & Kunkel, Staufen
Wasserbad	Köttermann, Hängsingen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Blackcaps	Greiner, Nürtingen
BT1 und BT2 Membranen (Biotrap-Apparatur)	Schleicher & Schuell, Dassel
Gel-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel
gestopfte Pipettenspitzen	Biozym, Oldendorf
High Density Printing Paper VPP-110 HD	Sony, Tokio, Japan
Mikrotiterplatten für den ELISA	Greiner, Nürtingen
Nitrozellulosefilter (Hybond ECL)	Amersham Life Science, Braunschweig
Pipetten aus Glas - 5, 10 und 20 ml	HBG, Germany
Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen
PVDF Protein Sequencing Membrane	Biorad, Kanada
Reaktionsgefäße - 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße - 10 und 50 ml	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilme (Biomax MR)	Eastman-Kodac, USA

Zellkulturschalen	Nunc GmbH, Wiesbaden
Zellschaber (disposable cell scraper)	Greiner, Nürtingen

2.3 Chemikalien

30%ige Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Agarose (Ultra Pure Agarose)	Invitrogen Life Technologies, Schottland
Ammoniumpersulfat (APS)	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bindsilane	LKB, Bromma, Schweden
Borsäure	J. T. Baker, Deventer, Holland
Casein, alkali-soluble	Merck, Darmstadt
Coomassie® Brilliant Blue	Serva, Heidelberg
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase)	Biomol, Hamburg
Isopropanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Mineralöl für die PCR	Sigma, Deisenhofen
Milchpulver (Magermilchpulver)	Glücksklee, Nestlé, Schweiz
Phenol (Roti-Phenol)	Roth, Karlsruhe
Repel Silane	LKB, Bromma, Schweden
TEMED (N, N, N‘, N‘-Tetramethylethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Tris (Tris-hydroxymethylaminomethan)	USB, Cleveland, USA
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Tween 20	Merck–Schuchhardt, Hohenbrunn
Hefeextrakt (Yeastextract)	Difco Laboratories, Detroit, USA

Alle übrigen eingesetzten Chemikalien stammen von Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe oder Serva, Heidelberg.

2.4 Sonstige Materialien

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
DNA-Längenstandards	Invitrogen, Eggenstein
Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM)	Invitrogen, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FCS)	Seromed, Berlin

Glutamin	Seromed, Berlin
Minimal Essential Medium (MEM)	Invitrogen, Eggenstein
nicht essentielle Aminosäuren	Seromed, Berlin
Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Proteinstandard Prestained SDS-Page Standards Broad Range	Biorad, München
Trypsin	DAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

2.5 Radiochemikalien zur Sequenzierung

$^{[35}$S]-α-dATP	Amersham, Braunschweig

2.6 Enzyme und DNA-Längenstandard

CIAP und zugehörige Puffer	MWG Biotech GmbH, Ebersberg
DNA-Kinase und Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Expand™ Long Template PCR System	Boehringer Mannheim
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym aus Hühnereiweiß	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Pwo DNA Polymerase	Boehringer Mannheim
Restriktionsenzyme und Puffer	Boehringer Mannheim, MBI Fermentas, St. Leon-Rot oder Invitrogen, Eggenstein
Taq-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin	DAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
DNA-Längenstandard	Invitrogen, Eggenstein

2.7 Primer

pQE Sequencing Primer Type III/IV	QIAGEN GmbH, Hilden
alle anderen Primer	MWG Biotech GmbH, Ebersberg

Benutzte Primerverdünnung in den PCRs: 10 pmol/µl

2.7.1 Zur Gewinnung des gH und seiner Plasmidkonstrukte eingesetzte Primer

(fett gedruckt die eingefügten Schnittstellen für Restriktionsenzyme)

	5'----------3'
Ex 1 /gh 85	gAA ATC TAC Agg Cag Atc CTg TCC
Bam 1/gh 85	gg**g gAT CC**A TgC Agg GTC TAg
Bam 2/gh 85	CCA gCA TTA g**gg ATC CA**g TCT AAA gC
Bam 3/gh 85	ATg ACC TAg A**gg ATC C**AT gCA ggg TCT AgC
Bam 4/gh 85	gg**g gAT CC**A TgC Agg gTC TAg CCT TCT Tgg
Sal A/gh 85	CTT ACA gAg AAT TAC ACT CgC
Sal B/gh 83	CCT CgA TTg ATA CgA TCC Tgg
SalB2/gh 83	gAA AgT gTg CCA CCA ACA TCT g
Stu /gh 83	AgT CTg **Agg CCT** AAT AAA ggA Tgg
Ex 2 /gh 83	gAC ggC AAT CCA CTT TCT gAg gTg
Bgl2/5#His	gAg AAA AgA TCT Atg AgA ggA TCg CAT CAC CAT

2.7.2 Zur Sequenzierung des gH eingesetzte Primer

	5'----------3'
Seq808R	AgC gTg ACg ACC ACg AAA T
Seq963R	AgA ATC TTT Agg CAg gAT Cg
Seq1226R	AAT ACA gTT CCg CAT ACT gC
Seq1536R	gTg Agg ACC gTg TgT ATg T
Seq1919R	gAT ATA CgT gAC gTg Agg C
Seq2246R	CCC TCA gCC ACA AAT AAT gA
Seq384	TgA ATg TgA TCA Cgg AgC C
Seq731	CCA TAT CCA TTg gCA ACA AC
Seq1106	CCg gAC ATA TTC TTg gTg TT
Seq1479	TGT ACA CAC TCg gCg ATA C
Seq1844	CCg gCg ATT AAC TgT TCA AA
Seq 2167	ggT gCA gAC CAA CCT CTT T
Seq 1R	gTT ATT gTC gTC gCC gTT gTC
pQE III/IV	Cgg ATA ACA ATT TCA CAC AG

2.8 Antikörper

QIAexpress Anti·His Antibodies (monoklonale Mäuseantikörper)	
Penta His Antibody	QIAGEN, Hilden
Tetra His Antibody (Selektor Kit)	QIAGEN, Hilden
^{RGS}·His Antibody	QIAGEN, Hilden
POD-Anti-Mouse IgG F‘ab-Fragment	Sigma USA/Canada
Kaninchen-Anti-Mausimmunglobuline (HRP)	Dako, Dänemark
Monoclonal Anti-human IgG (Fc Specific),	
Mouse Ascites Fluid, Isotype IgG2a;	
Clone Number HP-6071	Sigma USA/Canada
Peroxidase-Conjugated F(ab‘)$_2$	
Fragment of Rabbit Anti-Human IgG	Dako, Dänemark
POD-gekoppelter Anti-Human Antikörper	
(Jackson Immuno Research, Baltimore)	Dianova, Hamburg
Kaninchen-Anti-Human IgG (HRP)	Dako, Dänemark
Kaninchen-Anti-Human IgG (FITC)	Dako, Dänemark
Goat-Anti-Rabbit IgG (HRP)	Dako, Dänemark

2.9 Antibiotika und Virostatika

Ampicillin Sodium Salt	Fluka Biochemika, Schweiz
Bromuracildesoxyribose (Budr)	Sigma, München
Kanamycin	Merck, Darmstadt
Penicillin	Seromed, Berlin
Streptomycin	Seromed, Berlin

2.10 Eingesetzte Kits

Anti·His Antibody Strips	QIAGEN, Hilden
ECL^{TM} Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
Elisasubstrat (o-Phenylenediamine (OPD))	Medac, Hamburg
Ni-NTA HisSorb Strips	QIAGEN, Hilden
Ni-NTA Spin Columns	QIAGEN, Hilden
Pharmacia Biotech T7 Sequencing Kit	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Qia Quick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden

QIAprep Spin Plasmid Kit	QIAGEN, Hilden
QIA-quick Maxipräp-Kit	QIAGEN, Hilden

2.11 Plasmide

Plasmid p7,5K131A	Laborbestand
pQE 30, pQE 31, pQE 32	QIAGEN, Hilden
pQE 18	QIAGEN, Hilden
pBluescript® II SK (+/-)	Stratagene Europe Amsterdam, Niederlande

Schematische Darstellung der am häufigsten benutzten Plasmide

p7,5K131A = Vakziniavirusplasmid

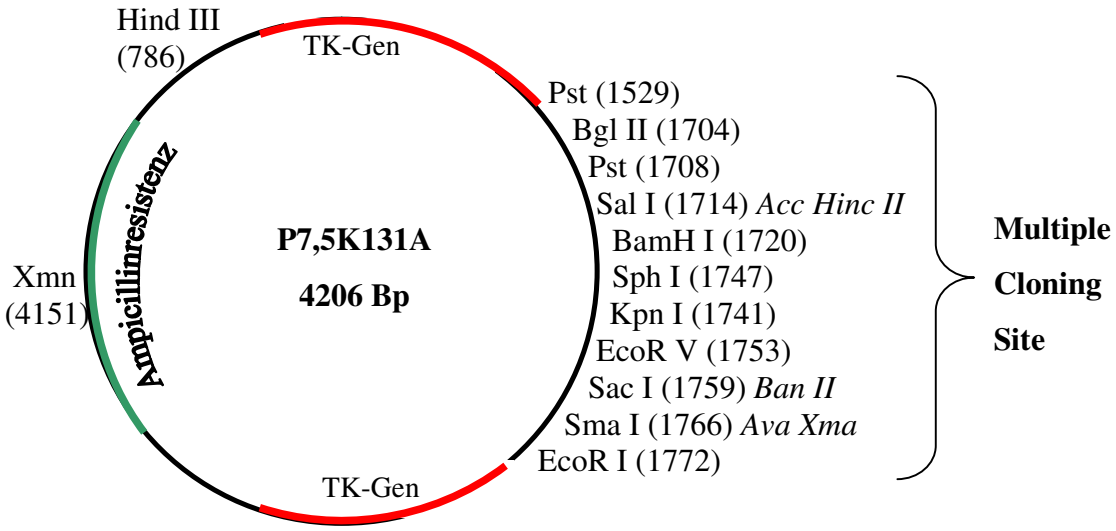


Abb.2.1: Schematische Darstellung des Plasmids P7.5K131A zur Rekombination in Vakziniaviren. Hinter den Restriktionsenzymschnittstellen in Klammern die Lage in Basenpaaren. TK= Gen der Thymidinkinase

pQE30 = mit 6x HIS tag versehenes Bakterienplasmid

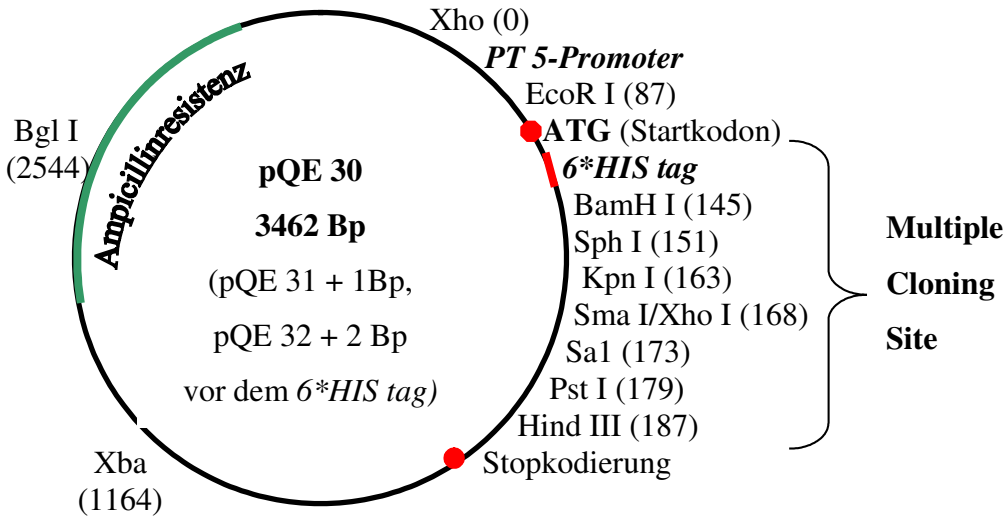


*Abb.2.2: Schematische Darstellung des Plasmids pQE 30 zur Rekombination in Bakterien. Hinter den Restriktionsenzymschnittstellen in Klammern die Lage in Basenpaaren. Die Plasmide pQE 31 und 32 unterscheiden sich nur in der Anzahl der Basenpaare zur Einhaltung des Leserasters. Bp = Basenpaare; 6*HIS tag = Markierung mit 6x der Aminosäure Histidin zur späteren Aufreinigung der Proteine.*

pBluescript® II SK = Plasmid zur Umklonierung

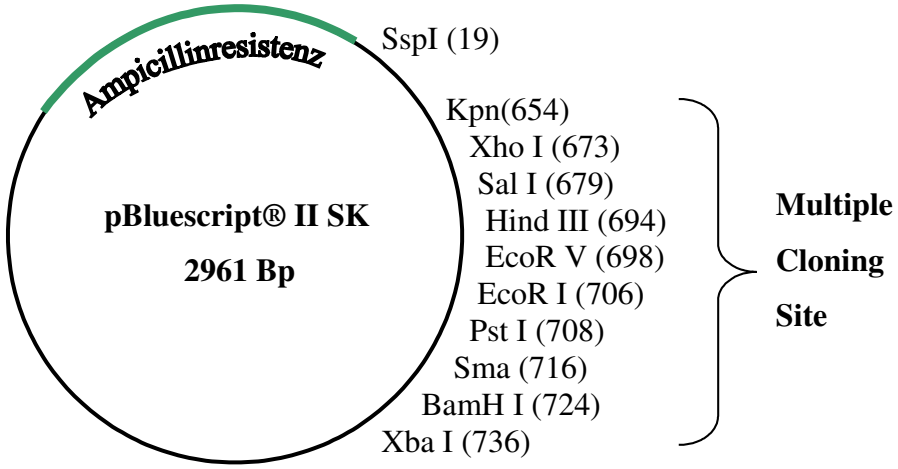


Abb.2.3: Schematische Darstellung des Plasmids pBluescript® II SK. Hinter den Restriktionsenzymschnittstellen in Klammern die Lage in Basenpaaren. Bp = Basenpaare.

2.12 Zellen

E. coli Bakterien:

SG13009 [pREP4]	QIAGEN, Hilden
Xl1-Blue	Stratagene Europe Amsterdam, Niederlande

Eukaryontenzellen:

CV-1: (ATCC CCL70), Nierenzellen der grünen Meerkatze

TK$^-$: 143B-(ATCC CRL), Thymidinkinase-negative humane Osteosarkom-Zellen

2.13 Vakziniaviren

Vakzinia-Wildtyp-Stamm Copenhagen

Temperatursensitive Vakzinia-Mutante ts7

2.14 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

LYSEPUFFER B FÜR PROTEINASE K-VERDAU

- 100 mM KCl
- 20 mM Tris-HCl pH 8,3
- 5 mM $MgCl_2$
- 0,9 % Tween 20
- 1 % Gelatine

NATRIUMACETAT ($NaHCO_3$) ZUR ETHANOLFÄLLUNG

- 0,1 M $NaHCO_3$ in H_2O
- pH mit NaOH auf 9,8 einstellen

2.14.1 Für das Arbeiten mit DNA

10X PCR-PUFFER

- 100 mM Tris-HCl pH 9,0
- 15 mM $MgCl_2$
- 500 mM KCl

DNTP-MIX

- dATP, dTTP, dGTP, dCTP: je 2 mM

TAE-PUFFER

- 0,04 M Tris
- 0,02 M Natriumacetat
- 1 mM EDTA
- pH mit Essigsäure auf 7,2 einstellen

FARBMARKER FÜR AGAROSEGELE

- 0,25 % Bromphenolblau
- 50 % Glycerin
- 10 mM EDTA

ETHIDIUMBROMID-STAMMLÖSUNG

- 100 µg Ethidiumbromid/ml H_2O

ETHIDIUMBROMIDFÄRBUNG

- 150 ml Aqua dest.
- 100 µl Ethidiumbromid-Stammlösung

2.14.2 Materialien zur Bakterienkultur

LB-MEDIUM

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt)
- 10 g NaCl
- ad 1 l Aqua bidest.
- Am selben Tag autoklavieren

ANTIBIOTIKA-STAMMLÖSUNGEN

- Ampicillin: 100 mg/ml
- Kanamycin: 25 mg/ml
- Bedarf: 1 µl pro ml Medium

2.14.3 Materialien zur Zellkultur und Vakziniavirusrekombination

DMEM-MEDIUM FÜR CV1 ZELLEN:

- 500 ml DMEM-Medium von Gibco
- 5 ml Penicillin (1000 U/ml)
- 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat
- 2 mM L-Glutamin
- 50 ml Fetales Kälberserum (FCS)

MEM-MEDIUM FÜR TK^- ZELLEN

- 500 ml MEM-Medium
- 50 ml Fetales Kälberserum (FCS)
- 100 IU/ml 5 ml Penicillin
- 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat
- 5 ml von 2 mM Glutamin-Stammlösung
- 5 ml nicht essentielle Aminosäuren

PBS (0,01M) – PHOSPHATE BUFFERED SALINE

- 8,5 g NaCl
- 1,36 g KH_2PO_4
- pH von 7,8 einstellen; autoklavieren

EDTA 0,05% ZUM ZELLEN ABLÖSEN

- 25 ml 1% EDTA in 500 ml PBS

HBS – HEPES BUFFERED SALINE (PH 7,13)

- 25 mM HEPES
- 0,75 mM NaH_2PO_4
- 140 mM NaCl
- mit NaOH pH auf 7.13 einstellen

PBS-A

- 136 mM NaCl
- 2,6 mM KCl
- 8 mM Na_2HPO_4
- 1,5 mM KH_2PO_4

GLYCEROLSCHOCKLÖSUNG

- 15% Glycerol in HBS

2.14.4 Materialien zur Sequenzierung

10X TBE-LAUFPUFFER:

- 121 g Tris
- 7,4 g EDTA
- 53,4 g Borsäure
- ad 1 l H_2O

Zur Elektrophorese 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen

SEQUENZGEL

Platte ohne Ohren:

- 5 ml 100% Ethanol
- 20 µl Bindsilane
- 150 µl Natriumacetat 10%

Platte mit Ohren

- Repel Silane

Beide Platten mit der jeweiligen Lösung bestreichen, gut abdampfen lassen, nachwischen, Plattensystem zusammenbauen

Sequenzgel:

- Acrylamid-Stammlösung:

- 84 g Harnstoff
- 53 ml Acrylamid (30%)
- 20 ml 10x TBE-Laufpuffer
- ad 200 ml Aqua bidest.
- Im lichtgeschützten Gefäß im Kühlschrank aufbewahren

- Zu 40 ml der Stammlösung direkt vor dem Gebrauch zufügen:
- 300 µl 10 % APS
- 30 µl TEMED
- in Gelapparatur gießen, Kamm einlegen
- Polymerisation abwarten

2.14.5 Materialien zum Arbeiten mit Proteinen

10X LÄMMLI-PUFFER

- 144 g Glycin
- 30 g Tris
- 10 g SDS
- ad 1 l mit Aqua bidest.

Vor Benutzung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen

PROTEIN SDS GEL

15 % Trenngel (20ml)	**9 % Trenngel (20ml)**	**4 % Sammelgel (10,2ml)**
▪ 10 ml Acrylamid	▪ 6 ml Acrylamid	▪ 1,3 ml Acrylamid
▪ 5 ml Tris 1,5 M pH 8,8	▪ 5 ml Tris 1,5 M pH 8,8	▪ 2,5 ml Tris 0,5 M pH 6,8
▪ 4,6 ml H_2O bidest.	▪ 8,6 ml H_2O bidest.	▪ 6,1 ml H_2O bidest.
▪ 0,2 ml 10% SDS	▪ 0,2 ml 10% SDS	▪ 0,1 ml 10% SDS
▪ 10 µl TEMED	▪ 10 µl TEMED	▪ 10 µl TEMED
▪ 150 µl 10% APS	▪ 150 µl 10% APS	▪ 150 µl 10% APS

Trenngel in Gelapparatur gießen, mit Wasser überschichten, Polymerisation abwarten. Wasser abgießen, Sammelgel aufgießen, Kamm einstecken.

PROBENPUFFER FÜR SDS-GELE (PH 8,8)

1x Probenpuffer

- 200 mM Tris pH 8,8
- 0,5 M Sucrose
- 5 mM EDTA
- 0,1 % Bromphenolblau

2x Probenpuffer

- 400 mM Tris pH 8,8
- 1 M Sucrose
- 10 mM EDTA
- 0,2 % Bromphenolblau

COOMASSIE FARBLÖSUNG

- 2,5 g Coomassie Blue
- 500 ml Methanol
- 120 ml Essigsäure
- ad 1 l H_2O

FIXIERER/ENTFÄRBER

- Auf 1 l
- 75 ml Essigsäure
- 50 ml Methanol
- ad 1 l H_2O

BRADFORD-REAGENZ

- 100 mg Coomassie Brillant Blue G-250 in 50 ml 95% Ethanol lösen
- 100 ml Phosporsäure (85%)
- mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen, durch Filterpapier filtrieren

2.14.6 Aufreinigung der Proteine über die Ni-NTA-Spin Columns (QIAGEN)

- Lösungspuffer: 0,1 M NaH_2PO_4; 0,01 M Tris/HCl; pH 8,0;
  200 mM NaCl; 1 mg/ml Lysozym;
- Puffer A, C und E laut Anleitung des Herstellers QIAGEN (The QIAexpressionist, March 1997, Seite 81) mit pH Anpassung oder alternativ Imidazol

2.14.7 Puffer und Lösungen für Western-Blot, ELISA und Immunfluoreszenz

SEMI-DRY-TRANSFER-BLOTPUFFER

- 39 mM Glycin
- 48 mM Tris
- 20% Methanol
- ad 1 l mit Aqua bidest.

TBS-PUFFER:

20x TBS (pH 7,5)

- 400 mM Tris 48,46 g
- 3 M NaCl 175,5 g
- pH mit HCl einstellen;
- ad 1 l Aqua bidest. auffüllen

1x TBS-Puffer nach QIAGEN

- 10 mM TrisCl pH 7,5
- 150 mM NaCl

ROUTINEWASCHLÖSUNGEN

TBS-Tween-Waschlösung

- 1 ml Tween 20 ad 1 l 1x TBS

TBS-Tween-Triton-Puffer nach QIAGEN

- 20 mM TrisCl pH 7,5
- 500 mM NaCl
- 0,05% Tween 20
- 0,2% TritonX-100

EINGESETZTE ANTIKÖRPERVERDÜNNUNGEN

- Humanseren 1:100
- Kaninchenseren 1:500
- QIAGEN AK 1:1000
- 2.AK meist 1:1000 (je nach Anleitung des Herstellers)
- Anti-Kaninchen-AK 1:2000
- 2.AK Dako F‘ab-Fragment 1:300 – 1:500

BLOCKPUFFER

- 1% Milchpulver in TBS/Tween
- 3% Milchpulver in TBS-Puffer nach QIAGEN
- 10 % Milchpulver in TBS-Puffer nach QIAGEN
- 1% Casein in TBS-Puffer nach QIAGEN
- 3% BSA in TBS-Puffer nach QIAGEN
- 3% Gelatine in TBS-Puffer nach QIAGEN

2.14.8 Lösungen für den ELISA

SUBSTRATLÖSUNG:

- 3 ml Lösemittel auf eine Tablette o-Phenylenediamine (OPD) (Medac, Hamburg)

PBS (QIAGEN-ELISA)

- 11,39 g K_2HPO_4 50 mM Potassium Phosphate Puffer
- 2,84 g KH_2PO_4
- 150 mM NaCl = 8,76 g
- pH muß ca. 7,5 sein

BLOCKPUFFER (QIAGEN-ELISA)

- O,2% BSA in PBS (QIAGEN-ELISA)

3 METHODEN

3.1 Ethanol- und Phenolfällung

3.1.1 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung dient der Aufreinigung von DNA oder Proteinen. Dabei wird zu einem Volumen Probe drei Volumen 100% Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat gegeben und bei –20 °C mindestens 20 min gefällt. Die Probe wird mit 13.000 rpm 15 min abzentrifugiert und der Überstand abgekippt. Das Pellet wird dann mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und wieder mit 13.000 rpm 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und das Pellet wird getrocknet. Anschließend kann das Pellet im gewünschtem Puffer oder in Wasser gelöst werden.

3.1.2 Phenolfällung

Mit der Phenolfällung können ebenfalls Proteine oder DNA gereinigt und zudem Enzyme inaktiviert werden. Hier wird zu einem Volumen Probe die gleiche Menge an Phenol gegeben. Beides wird gut vermischt und 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die obere Phase wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, die unter Phase wird verworfen. Danach wird ein Volumen Chloroform zugeben, vermischt und wieder abzentrifugiert. Es wird nochmals die obere Phase abgenommen. Mit dieser wird nun eine Ethanolfällung durchgeführt.

3.2 Amplifikation der DNA des gH-Gens mittels PCR

3.2.1 Proteinase K Verdau

Die DNA zur Amplifikation des gH mit der PCR wird für diese Arbeit aus dem Gewebe eines Lymphknotens gewonnen. Dieser Lymphknoten stammt von einem HIV positiven Patienten mit Kaposi-Sarkom. Er ist in der bereits durchgeführten diagnostischen PCR positiv auf HHV-8 DNA. Die DNA-Gewinnung erfolgt durch einen Proteinase K Verdau. Dazu wird eine stecknadelkopfgroße Probe aus dem Gewebe entnommen und mit 100 µl H_2O in ein Reaktionsgefäß gegeben. Es werden 100 µl Lysepuffer B und 5 µl Proteinase K zugefügt. Alles zusammen wird bei 56 °C 1 h geschüttelt. Danach wird die Proteinase K bei 95 °C 10 min deaktiviert. Es werden 200 µl H_2O und 400 µl Phenol zugegeben und eine Phenolfällung und anschließend eine Ethanolfällung durchgeführt. Das gewonnene DNA-Pellet wird in 50 µl reinem H_2O aufgenommen und in der PCR eingesetzt.

3.2.2 PCR und Nested PCR:

Die Sequenz des gH ist in der Genbank *data base* (Accession nomber U75698) im Internet veröffentlicht. Sie ist 2192 Basenpaare lang. Das ORF 22, welches für das gH kodiert, erstreckt sich von Nukleotid 37113 bis Nukleotid 39305. Die Sequenz ist im Anhang aufgeführt [Russo et al. 1996]. Nach dieser Sequenz werden die Primer ausgesucht. Als Amplifikationsvorlage für die PCR wird DNA aus einem HHV-8 infizierten Lymphknoten eingesetzt. Die PCR zur Gewinnung des gH wird mit den Polymerasen Pwo und Expand^{TM} als nested PCR im Thermocycler durchgeführt. Dabei werden zwei PCRs zur Gewinnung desselben DNA-Fragments nacheinander ausgeführt *(nested PCR)*. Beidesmal wird dasselbe PCR-Programm benutzt. Bei den PCRs, die nur zur Verifizierung der Rekombination in Vakziniaviren oder zur Kontrolle von Plasmiden durchgeführt werden, wird die Taq-Polymerase zur Amplifikation benutzt. Hier werden nur kleinere DNA-Stückchen benötigt und es ist genug Ausgangs-DNA vorhanden. Deshalb kann auf die zweite *(nested)* PCR verzichtet werden. Die Primer werden in einer Konzentration von 10 pmol/µl eingesetzt. Die PCR-Ansätze erfolgen laut der Tabelle 3.1, die Programmierung des Thermocyclers zeigt die Tabelle 3.2.

Tab.3.1: Pipettierschema für die verschiedenen PCR-Ansätze abhängig von der jeweils verwendeten Polymerase

TAQ	**PWO**	**EXPAND^{TM}**
▪ 29,5 µl H_2O ▪ 5 µl dNTP-Mix ▪ 5 µl 10x PCR Puffer ▪ 2,5 µl [+] Primer ▪ 2,5 µl [-] Primer	▪ 13 µl H_2O ▪ 5 µl dNTP-Mix ▪ 3 µl [+] Primer ▪ 3 µl [-] Primer ▪ 1 µl DNA	▪ 9 µl H_2O ▪ 12,5 µl dNTP-Mix ▪ 1,5 µl [+] Primer ▪ 1,5 µl [-] Primer ▪ 0,5 µl DNA
▪ 5 µl DNA ▪ 0,5 µl Taq	▪ 5 µl 10x PCR Puffer ▪ 0,5 µl Pwo ▪ 19,5 µl H_2O	▪ 5 µl 10x PCR Puffer ▪ 0,75 µl Expand^{TM} ▪ 19,25 µl H_2O
1 Tropfen Öl		

Tab.3.2: PCR-Programme: Die Tabelle zeigt die für die jeweilige Polymerase verwendete Programmierung des PCR-Cyclers.

TAQ		PWO		EXPAND™	
94 °C	120 s	94 °C	120 s	94 °C	120 s
94 °C 58 °C 72 °C	30 s 45 s 50 s } 35 Zyklen	94 °C 50 °C 72 °C	15 s 30 s 120 s } 10 Zyklen	94 °C 50 °C 68 °C	10 s 30 s 120 s } 10 Zyklen
		94 °C 50 °C 72 °C	15 s 30 s 140 s-160 s -180 s... jeder Zyklus 20 s länger } 18 Zyklen	94 °C 50 °C 68 °C	10 s 30 s 140 s-160 s -180 s... jeder Zyklus 20 s länger } 18 Zyklen

3.3 DNA-Aufreinigung

3.3.1 DNA-Elektrophorese

Die gewonnene DNA aus PCR oder Plasmiden wird mittels Elektrophorese in Agarosegelen nach Längen aufgetrennt. Dabei wird für das Agarose-Gel 1% Agarose mit TAE-Puffer aufgekocht und in eine Gelkammer gegeben. Wenn das Gel fest ist, wird die Gelkammer mit TAE-Puffer aufgefüllt. Die DNA-Probe wird mit 2 µl Farbmarker vermischt und in die Geltaschen gegeben. Zur Größenbestimmung läuft eine DNA-Standardleiter mit. Je nach Größe der Gele wird eine Spannung von ca. 95-120 V und eine Stromstärke von 500 A angelegt. Nach erfolgter Auftrennung wird das Gel in einer Ethidiumbromidlösung ungefähr 10 min gefärbt, in TAE oder Aqua dest. 2x 5 min gewaschen und unter der UV-Lampe ausgewertet und fotografiert.

3.3.2 Extraktion der DNA aus dem Agarosegel

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wird benötigt, um die DNA nach einer PCR oder einem Restriktionsenzymverdau gezielt aus dem Gel zu lösen und damit für die weitere Bearbeitung zur Verfügung zu stellen. Zum Extrahieren der DNA aus einem Agarosegel werden die entsprechenden Banden unter der UV-Lampe ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA aus den Agarosegelstückchen erfolgte mit dem Qia Quick Gel Extraction Kit laut Anleitung des Herstellers QIAGEN.

3.3.3 Messung der DNA-Konzentration einer Probe

Um den DNA-Gehalt einer Probe zu bestimmen, wird die DNA-Probe mit H_2O verdünnt, meist 1:200. Die Messung der Adsorption im Photometer erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Nullabgleich wird mit reinem Wasser vorgenommen. Die DNA-Konzentration errechnet sich dann folgendermaßen:
Konzentration in µg/µl = 0,05 x Verdünnungsfaktor (z.B. 200) x Messwert

3.4 Bakterienkultur

3.4.1 Kultivierung der Bakterien

Alle Bakterien werden in LB-Medium gezüchtet.
Zur Expression des gH und seiner Fragmente werden Escherischia coli (E. coli) Bakterien des Stammes SG 13009 (QIAGEN) verwendet. Diese Zellen werden unter Kanamycin in einer Konzentration von 25 µg/ml kultiviert.
Zur Amplifikation der Plasmide dient außerdem der Bakterienstamm XL-blue (Stratagene), der ohne Antibiotikazugabe kultiviert wird. Die Selektion aller Plasmide erfolgt mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml.

3.4.2 Bakterienplatten gießen

Für die Bakterienplatten wird 3 g Bacto-Agar mit 200 ml LB-Medium bis zum kompletten Auflösen des Agars gekocht. Danach läßt man das Medium unter Rühren auf ca. 42 °C abkühlen und fügt dann das gewünschte Antibiotikum zu (z.B. 200 µl Ampicillinstammlösung in einer Konzentration von 100 mg/ml). Das Medium muß anschließend sofort in Petrischalen ausgegossen werden.

3.4.3 Übernachtkulturen

Zum Anlegen von Übernachtkulturen wird eine Bakterienkolonie von der Kulturplatte gepickt. Sie vermehrt sich über Nacht bei 37 °C in 3 ml LB-Medium unter ständiger Bewegung, um ein Absetzen zu verhindern (je nach Bedarf mit Antibiotikum).

3.4.4 Kompetente Zellen nach der $CaCl_2$-Methode

Zur Einschleusung eines Plasmids muß die Bakterienwand für die Aufnahme der Plasmide durchlässig gemacht werden. Dazu wird 100 ml LB-Medium mit 1-2 ml Übernachtkultur angesetzt und bei 37 °C geschüttelt, bis eine optische Dichte von 0,3 bis 0,4 (gemessen bei 600 nm Wellenlänge) erreicht ist. Dann wird die Kultur 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgekippt. Jetzt muß auf Eis weitergearbeitet werden. Jedes Pellet wird in 50 ml 0,1 M $MgCl_2$ aufgenommen und

anschließend 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und jedes Pellet in 1 ml 0,05 M $CaCl_2$ resuspendiert (+ 15% Glycerol, falls die kompetenten Zellen eingefroren werden). Die Kulturen läßt man 20 min auf Eis stehen. Die Zellen werden in 150 µl Aliquots eingesetzt oder bei –70 °C zur späteren Verwendung eingefroren.

3.4.5 Glycerolstocks anlegen

Zur Aufbewahrung von Bakterien wird 100 µl 75 % Glycerol mit 400 µl Bakterienkultur vermischt und bei –70 °C eingefroren.

3.5 Klonierung

Zur Klonierung der benötigten Plasmide werden folgende Verfahren eingesetzt:

3.5.1 Restriktionsenzymverdau

Dabei wird zur gewünschten Menge DNA 1 µl Restriktionsenzym, 1 µl 10x Puffer, passend zum Enzym, und H_2O bis zu einer Menge von 10 µl gegeben. Die DNA wird 1 h bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur, meist 37 °C, gespalten. Falls danach eine Inaktivierung der Enzyme benötigt wird, kann diese entweder durch eine 10 minütige Erhitzung auf 65 °C oder durch eine Phenolfällung erfolgen.

3.5.2 Dephosphorylierung

Um dephosphorylierte DNA-Enden zu erhalten, die man zum Beispiel für eine Ligation mit Blunt-Ends benötigt, wird folgendermaßen vorgegangen: Zum Ansatz mit Plasmid wird 1 µl CIAP, 1/10 Volumen Dephosphorylierungspuffer und 1/10 Volumen Solution-Buffer gegeben. Mit Wasser wird auf 10 oder 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird 30 min bei 37°C dephosphoryliert. Danach wird zweimal eine Phenolfällung durchgeführt, um das Enzym sicher zu deaktivieren.

3.5.3 Herstellung von blunt-ends

Zur Herstellung von glatten Enden der DNA-Fragmenten werden eine DNA-Kinase und Klenow-Fragmente benutzt. Dabei werden 8 µl DNA-Fragment, 1 µl Kinasepuffer, 1 µl Kinase und 1 µl dNTPs (20 mM) zusammen 30 min bei 37 °C inkubiert. Dann wird 1 µl Klenow-Fragment zugegeben, wieder 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend werden die Enzyme entweder 10 min bei 65 °C inaktiviert oder es werden 38 µl H_2O zugegeben und eine Phenolfällung angeschlossen.

3.5.4 Ligation

Zur Ligation werden Fragment und Vektor in einem Verhältnis von ungefähr 3:1 in ein Reaktionsgefäß gegeben, dazu 1 µl T4-DNA-Ligase, 1/10 Volumen 10x Ligationspuffer und Wasser bis zu einem Volumen von 10 oder 20 µl. Vektor und Plasmid werden über Nacht bei 16 °C ligiert.

3.5.5 Transformation

Die fertigen Plasmide werden in die kompetent gemachten Bakterien eingeschleust. Dazu werden 100 – 150 µl kompetente Bakterien des Stammes XL-blue oder SG 13009 vorgelegt und ungefähr 5 µl DNA zu den Bakterien gegeben. Das Gemisch wird 30 min auf Eis inkubiert, dann wird ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. 800 µl LB-Medium wird zu den Bakterien gegeben und alles wird bei 37 °C 20 min inkubiert. Anschließend werden die Bakterien 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand wird abgekippt. Das Pellet wird im Restmedium gelöst und auf Bakterienplatten, die mit dem Selektionsantibiotikum versetzt sind, ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.6 Plasmidgewinnung

3.6.1 Minipräp

Um Plasmid-DNA zur Kontrolle der Ligationen und Umklonierungen zu gewinnen, wird die Minipräp eingesetzt. Die Plasmide werden nach Anleitung des Herstellers QIAGEN mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit aus Übernachtkulturen gewonnen.

3.6.2 Maxipräp

Für die Gewinnung von größeren Mengen der Plasmide wird die Maxipräp benutzt. Dabei werden 40 ml LB-Medium, je nach Bedarf mit Antibiotikazusatz, mit 1,5 ml Bakteriensuspension angeimpft. Über Nacht vermehren sich die Bakterien im Schüttler bei 37 °C. Die Bakterienkulturen werden am nächsten Morgen 15 min bei 5000 Umdrehungen abzentrifugiert. Die Plasmide werden mit dem QIA-quick Maxipräp-Kit laut Anleitung des Herstellers QIAGEN gereinigt.

3.7 Proteingewinnung durch Bakterieninduktion

3.7.1 Proteininduktion mit IPTG

Zur Gewinnung von Protein aus Bakterien wird nach der Anleitung des Ni-NTA Spin Kit, August 1998, S. 8-9 von QIAGEN vorgegangen. Die pQE-Plasmide werden in den

Bakterienstamm SG13009 eingebracht und mit Kanamycin und Ampicillin kultiviert. Vor der Induktion mit 2mM IPTG wird eine Kontrollprobe abgenommen. Die optimale Induktionszeit wird bestimmt, indem jede halbe Stunde 1 ml induzierte Bakteriensuspension abgenommen, abzentrifugiert, eingefroren und auf einem Coomassie gefärbten SDS-Proteingel ausgewertet wird. Sie beträgt bei diesen Versuchen zwei Stunden. Alle weiteren Induktionen werden mit dieser Zeit durchgeführt.

Für die direkte Auftrennung der Proteine über ein SDS-Proteingel wird das Bakterienpellet von 1 ml Suspension eingesetzt.

Um Protein für die Aufreinigung mit den Ni-NTA-Spin Columns zu gewinnen, wird 100 ml Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von 0,7 induziert. Die optische Dichte wird bei 600 nm Wellenlänge im Photometer gemessen.

3.8 Zellkultur

Die Zelllinien CV1 (Nierenzellen der grünen Meerkatze) und TK- (Thymidinkinase-negative humane Osteosarkomzellen) werden für die Vakziniavirus-Rekombination, die Vermehrung und Titration der rekombinanten Vakziniaviren und den Immunfluoreszenztest eingesetzt. Die Zellen werden bei 37 °C und 90% relativer Luftfeuchtigkeit in Medium kultiviert.

3.8.1 Zellen splitten (vermehren)

Um die Zellen zu splitten wird von einer Petrischale mit konfluenten Zellen das Medium abgenommen und die Zellen mit 0,01 M PBS gewaschen. Die Zellen werden mit 1 ml Trypsin abgelöst, mit Medium abgewaschen und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 auf die neuen Platten verteilt.

3.9 Eukaryontische Expression des gH im Vakziniavirus-system

3.9.1 Herstellung einer Vakziniavirus-Rekombinanten

Die Transfektion der Zellen wird mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode nach Graham und van der Eb (1973) durchgeführt [Graham and van der Eb 1973]. Dabei entstehen Kristalle, die mit der DNA von den Zellen aufgenommen werden. Dazu werden CV 1 Zellen am Vortag so ausgesät, daß sie zu etwa 90% konfluent sind. Diese Zellen werden dann mit der temperatursensitiven Vakziniavirus-Mutante infiziert. Dazu wird von den Kulturschalen (∅ 3,4cm) das Medium abgenommen und jedes Schälchen

wird mit 300 µl der in PBS-A verdünnten ts7-VAC-Mutante infiziert. Das Schälchen wird 1 h bei Raumtemperatur immer wieder bewegt, dann wird 2 ml Medium für CV1-Zellen zugegeben und das ganze wird 2 h im Brutschrank bei 33,5 °C und 5% CO_2 bebrütet. 500 ng DNA des Vakziniavirus-Wildtyps Copenhagen, ca. 1 µg Rekombinationsplasmid und 62 µl 2 M $CaCl_2$–Lösung werden mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt und vorsichtig gemischt. In einem 50 ml Röhrchen werden 30 ml HBS vorgelegt und das DNA-Gemisch tropfenweise unter ständigem Mischen zugefügt. Der Ansatz wird 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Hälfte des Mixes wird auf die infizierten und bebrüteten CV1-Zellen getröpfelt und 3-5 h bei 39,5 °C inkubiert. Danach wird das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS-A gewaschen. Dann wird 1 ml Glycerolschocklösung zugegeben. Die Zellen werden 1-1,5 min stehen gelassen, absaugt, 2x mit PBS-A gewaschen und es werden 2 ml DMEM zugegeben. Nun werden die Zellen bei 39,5°C 2 Tage weiter inkubiert bis deutliche Plaques sichtbar sind. Die Schälchen werden eingefroren. Nach dem Auftauen werden die Zellen und der Überstand gesammelt und für die Selektion der Vakziniavirus-Rekombinanten verwendet.

3.9.2 Selektion der TK-negativen Vakziniavirus-Rekombinanten

Die Rekombination erfolgt im Thymidinkinasegen des Vakziniavirus. Im Rekombinationsplasmid wird die DNA in Sequenzen der Thymidinkinase eingebaut. Rekombinierte Viren enthalten infolgedessen keine funktionsfähige Thymidinkinase mehr. Um die rekombinierten Viren aus den Wildtypviren zu selektieren wird das Virostatikum Bromuracildesoxyribose (BUdR), ein Nukleosidanalogon, benutzt. Dieses Medikament wird von der Thymidinkinase in seine metabolisch aktive phosphorylierte Form überführt und führt beim Einbau zum Kettenabruch. Thymidinkinase-negative Klone sind daher resistent gegenüber BUdR, Wildtyp-Vakziniaviren nicht [Heuschmid 1998].

Die Selektion erfolgt auf TK^- Zellen. Diese werden bereits am Vortag angelegt. Aus den transfizierten Ansatz werden 330 µl entnommen und 3x 10 s mit 120 W beschallt um die rekombinanten Viren aus den Zellen auszulösen. Es wird eine Verdünnungsreihe in TK^--Medium hergestellt, mit Verdünnungen von 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000. Von den am Vortag angelegten TK^- Zellen wird der Überstand abgesaugt und die Virusverdünnungen werden aufpipettiert. Nach 30 minütiger Adsorption bei Raumtemperatur wird der Überstand abgesaugt und 2 ml Medium mit 20 µg BUdR zugegeben. Nach einer etwa zweitägigen Bebrütung bei 37 °C werden aus 3 Plaques die

Zellen gepickt, und zwar aus der Verdünnungsstufe mit den wenigsten sichtbaren Plaques, und in je 300 µl MEM aufgenommen. Die gepickten Zellen werden 3x 10 s mit 120 W beschallt und es wird erneut eine Verdünnungsreihe angelegt. Diese Verdünnungen werden wieder auf TK^- Zellen gegeben und unter BUdR selektiert. Nach weiteren zwei Tagen werden diesmal nur Zellen aus einem Plaque gepickt und in 300 µl Medium für CV1 Zellen aufgenommen. Der Ansatz wird nochmals 3x 10 s mit 120 W beschallt und kann nun zur Gewinnung eines Virusstocks eingesetzt werden.

3.9.3 Produktion eines Virusstocks

Die Gesamtmenge des selektierten Ansatzes wird auf am Vortag angelegte CV1-Zellen in Schalen mit 3,4 cm Durchmesser gegeben und ½ bis 1 h inkubiert. Anschließend wird 3 ml CV1 Medium zugegeben und die Zellen werden so lange bebrütet, bis sie ganz durchlysiert sind. Die Zellen werden abgeklopft, in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben und 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Das Medium wird verworfen und das Pellet in 900 µl PBS aufgelöst. Die Zellen werden durch Ultraschallbeschallung aufgeschlossen. Das Zelldebridement wird durch Abzentrifugation für 5 min bei 1800 rpm pelletiert. Um noch vorhandene Viren aus den Zellen zu lösen wird das Pellet nochmals in PBS gelöst und abzentrifugiert. Der bei den beiden Zentrifugationen gewonnene Überstand stellt den neuen Virusstock da. Er wird bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

3.9.4 Bestimmung des Virustiters

Um den Virengehalt der Virustocks zu bestimmen wird eine Plaquetitration durchgeführt. Aus den Virusstocks werden nach Beschallung Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-8} hergestellt. Mit diesen Verdünnungen werden CV1 Zellen in einer Kulturplatte mit 48 Vertiefungen infiziert. Nach 30 Stunden werden die Plaques in den zwei höchsten Verdünnungsstufen mit sichtbaren Plaques gezählt. Aus dem Mittelwert ergibt sich der Virustiter. Er liegt für die hier verwendeten rekombinanten Viren zwischen $2x10^8$ und $2x10^9$ pro ml.

3.9.5 Proteingewinnung aus virusinfizierte Zellen für den Western-Blot

Zur Gewinnung von rekombinantem Protein aus virusinfizierten Zellen werden schwach konfluente Zellen mit einer MOI von ungefähr 1 infiziert. Am nächsten Tag wird von den durchinfizierten Zellen das Medium abgesaugt und die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen. Es wird ungefähr 200 µl 1x Proteinprobenpuffer auf die Zellen gegeben. Die Zellen werden mit einem Scratcher von der Kulturplatte abgekratzt und

mit dem Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben. Alternativ können die Zellen auch mit Medium abgekratzt und im Reaktionsgefäß abzentrifugiert und gewaschen werden. Die Proben werden mit dem Proteinprobenpuffer 5 min bei 95°C gekocht und je nach Viskosität bis zur Pipettierbarkeit mit Ultraschall beschallt. Jetzt können die Proteine über ein SDS-Proteingel aufgetrennt werden.

3.9.6 PCR-Nachweis der Rekombinanten in infizierten Zellen

Zur Kontrolle der Rekombination mit der PCR werden 90 µl des Virusstocks zuerst mit Phenol und dann mit Ethanol gefällt. Das Pellet wird in 50 µl H_2O aufgenommen und 0,5 µl dieser Probe werden in der PCR mit der Taq-Polymerase eingesetzt. Als Primer dienen die in der Diagnostik verwendeten gH Primer [Pranghofer 2002].

3.10 Sequenzierung

Die Sequenzierungen werden entweder mit dem Pharmacia Biotech T7 Sequencing Kit oder dem Sequenzierer ABI PRISM® Genetic Analyser durchgeführt. Eingesetzt wird das Plasmid rVV-gH6xHISΔT5 und das Plasmid rVV-gH.

3.10.1 Protokoll Sequenzierung 310er:

Bei der Sequenzierung mit dem ABI PRISM® Genetic Analyser wird 500 ng bis 1,0 µg DNA eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgt laut Anleitung des Herstellers.

3.10.2 Sequenzierung mit dem Pharmacia Biotech T7 Sequencing Kit

Diese Sequenzierung beruht auf der modifizierten Dideoxy-Methode mit der T7-Polymerase. Zur Sequenzierung wird ca. 3,5 µg DNA verwendet. Die DNA wird auf 32 µl mit H_2O aufgefüllt und dann mit 8 µl 2 M NaOH 10 min bei Raumtemperatur denaturiert. Nach Zugabe von 7 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 4 µl H_2O wird die DNA mit 120 µl 100% Ethanol 15 min bei –20°C gefällt. Das Pellet wird 15 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und nochmals 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und man läßt das Pellet trocknen.
Die eigentlich Sequenzierungsreaktion wird mit dem T7-Sequencing-Kit der Firma Pharmacia durchgeführt. Die Hybridisierung der Primer erfolgte nach Resuspendierung des Pellets in 11 µl H_2O mit 1 µl Primer und 2 µl Annealing Buffer bei 37 °C für 20 min. Pro Sequenzreaktion werden 370 kBq ^{35}S-α-dATP verwendet. Die Proben werden 2 min bei 75-80 °C denaturiert. 2-2,5 µl der Proben werden auf das Sequenzgel aufgetragen. Als Laufpuffer dient TBE. Das Gel muß bei ca. 1800 V mindestens ½ h vorher einlaufen, dann werden die Proben aufgetragen und die DNA-Fragmente werden

etwa 1½-4 h bei 1800 V aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird das Gel 15 min in 10% Essigsäure fixiert, gewaschen und 1 h bei 80 °C getrocknet. Das Gel wird über Nacht in Röntgenkassetten gegen Kodak Biomax MR-Filme exponiert. Die Sequenzen können nun auf den Filmen abgelesen werden.

3.11 Proteinaufreinigung

3.11.1 Elektrophorese eines Proteingels

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt mit SDS-Proteingelen in Lämmli-Puffer. Für die Auftrennung der Proteine werden bis auf wenige Ausnahmen 15% SDS-Gele benutzt. Die Proben werden in 1x oder 2x Probenpuffer 2 min bei 95 °C gekocht und dann auf das Gel aufgetragen. Die mitgeführte Standardleiter ist von Biorad. Die Elektrophorese erfolgt bei 35 mA und 200 V für etwa 1,2 h.

3.11.2 Coomassie-Färbung:

Zur Darstellung der Proteine wird meist die Coomassie-Färbung benutzt. Die Farblösung wird für 10-15 min auf das Proteingel gegeben. Das Gel wird anschließend mit Fixierer z. B. über Nacht entfärbt.

3.11.3 Silberfärbung eines Proteingels

Man kann zur Anfärbung der Proteine auch die etwas empfindlichere Silberfärbung benutzen. Hierfür wird das SDS-Proteingel erst 3x 20 min in 50 % Ethanol gewaschen. Dann wird das Gel 1 min in 50 ml 0,2 g/l Natriumthiosulfat vorinkubiert, nochmals 3x 20 s in Aqua bidest. gewaschen und 20 min mit 0,1g Silbernitrat und 40 µl 37 % Formaldehyd in 50 ml Lösung gefärbt. Die überschüssige Lösung wird 2x mit Aqua bidest. abgewaschen und das Gel in 50 ml Lösung mit 3 g Na_2CO_3 und 100 µl 37 % Formaldehyd bis zur gewünschten Färbung entwickelt. Die Entwicklung wird mit Stopplösung (12 % Essigsäure, 50 % Methanol in Aqua bidest.) gestoppt.

3.11.4 Proteingel trocknen

Die SDS-Proteingele können zur Aufbewahrung getrocknet werden. Dazu wird das Gel 3x 20 min in 20% Ethanol gewaschen. Es wird auf ein mit Wasser angefeuchtetes Filterpapier gelegt, mit Frischhaltefolie bedeckt und dann im Geltrockner getrocknet.

3.11.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgt nach der Methode von Bradford. Die Probe wird auf 100 µl mit 0,15 M NaCl aufgefüllt. Der Nullabgleich erfolgt mit

0,15 M NaCl ohne Protein. Es wird 1 ml Bradford-Reagenz zugegeben, alles vermischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion kann nun im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden und die zugehörige Proteinkonzentration aus einer Eichkurve abgelesen werden. Diese Eichkurve muße zuvor durch die Messung von bekannten Proteinkonzentrationen eines Proteins erstellt werden.

3.11.6 Proteinelution mit der Biotrap Apparatur

Mit diesem Verfahren können Proteine aus einem mit Coomassie-gefärbten Proteingel eluiert werden. Dazu werden die benötigten Banden aus dem mit Coomassie gefärbten Proteingel ausgeschnitten und in 50 % Ethanol und 50 mM Tris pH 8,0 über einen Tag gewaschen. Die Nitrozellulosemembranen BT2 werden wie in der Skizze beschrieben eingebaut. Beim Einbau der Glyzerinmembran BT1 muß darauf geachtet werden, daß die längere Seite der Membran an die mit einem Pfeil markierte Seite zu liegen kommt. Diese Membran darf nicht austrocknen. Jetzt können die Klammern festgedreht werden. Die Biotrap-Apparatur wird in eine große Agarosegelkammer gestellt und mit 1x Lämmli-Puffer aufgefüllt bis die Pegel in den Biotrap Kammern mindestens 0,5 cm betragen. Die ausgeschnittenen Proteingelstücke werden in die mittlere Kammer gegeben. Die Pegel werden in allen Kammern angeglichen und eine „Schranke“ wird so in die Agarosegelkammer gestellt, daß der Stromfluß durch die Biotrap-Apparatur führt. Nun kann für ca. 12 h ein Strom von 100 V angelegt werden. Vor der Entnahme des Eluats muß der Strom für 10-15 s umgepolt werden, um das Protein von der Glyzerinmembran zu lösen. Nun kann das Eluat aus der Kammer pipettiert werden und das so gewonnene Protein wird z.B. zur Kaninchenimmunisierung eingesetzt.

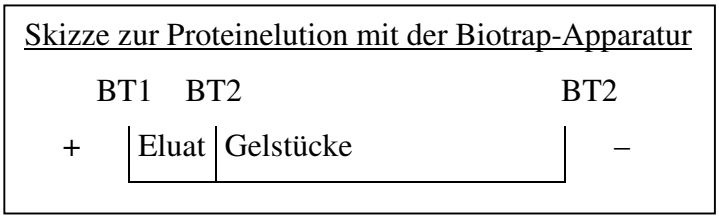


Abb.3.1: Skizze zum Aufbau der Biotrap-Apparatur

3.11.7 Aufreinigung der rekombinanten Proteine über die Ni-NTA Spin Columns

LYSOZYMVERDAU DES B-E FRAGMENTS:

Um die rekombinanten Proteine, die in einer schwer löslichen Form vorliegen, in einem für die Nickel-Säulchen geeigneten Puffer zu lösen, wird das Pellet in 1 ml Lösungspuffer mit Lysozym aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wird ungefähr 3 min mit 120 W beschallt und dann bei 15.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in Puffer A durch beschallen gelöst. Es folgt nochmals

eine Inkubationsphase von 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird 5 min bei 15000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wird auf die Ni-NTA Spin Columns gegeben.

Die Proteinreinigung erfolgt mit dem Ni-NTA Spin Kit von QIAGEN. Dabei wird gemäß der Anleitung des Herstellers für denaturierende Konditionen vorgegangen. Alternativ wird statt durch die Absenkung des pH auch durch Zugabe von Imidazol gewaschen und eluiert. Es werden bis zu 100 ml induzierte Bakterienkultur eingesetzt. Bei der Zentrifugation muß nach Rücksprache mit dem Hersteller die Umdrehungszahl erhöht werden, da sonst kein Durchfluß zu erreichen ist. Es werden bis zu 8000 rpm benötigt.

3.12 Herstellung von Kaninchenantikörpern

Die Proteine zur Impfung der Kaninchen werden durch Aufreinigung mit der Biotrap-Apparatur gewonnen. Das gewonnene Eluat wird mit Ethanol gefällt und in 200 µl PBS aufgenommen und mit Freud's Complete Adjuvans versetzt. Den zur Antikörpergewinnung eingesetzten Kaninchen wird zuerst ein Praeserum abgenommen. Dann wird ihnen das Protein gespritzt. Nach 2 und 4 Wochen werden sie geboostert. Nach 6 Wochen wird das Serum gewonnen.

3.13 Zur Testung des gH eingesetzte Humanseren

Für die immunologische Charakterisierung des gH stehen folgende Seren aus dem Bestand der virologischen Diagnostik der Universitätsklinik Ulm und von freiwilligen Probanden zur Verfügung:

11 Seren von 6 verschiedenen Patienten mit Kaposi-Sarkom.

5 Seren von 5 Kindern, die am Abnahmezeitpunkt zwischen 9 und 17 Monate alt waren.

4 Seren von Erwachsenen, bei denen ein geringes Risiko für sexuell übertragene Krankheiten vorliegt. Die Seren werden bei –20°C gelagert.

3.14 Western-Blot

Beim Western-Blot werden die im SDS-Proteingel aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose transferiert und dann mit selektiven Antikörpern nachgewiesen.

3.14.1 Proteingel blotten

Die Proteine werden mit der Trans Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) auf die Nitrozellulose übertragen. Dazu werden erst drei in Blotpuffer angefeuchtete Filterpapiere auf das Blotgerät gelegt. Auf diese wird die erst in Wasser und dann in

Transferpuffer angefeuchtete Nitrozellulosemembran gelegt, darauf das ebenfalls in Transferpuffer gewaschene Proteingel und zum Schluß wieder drei angefeuchtete Filterpapiere. Das Gerät wird nun vollständig zusammengefügt und die Proteine 30 min bei 12 V auf die Nitrozellulose geblottet.
Beim Blotten auf die PVDF-Membran wird analog dazu nach Anleitung des Herstellers Biorad vorgegangen.

3.14.2 Standardprotokoll Western-Blot

Beim Western-Blot werden viele verschiedene Varianten durchgeführt. Deshalb wird hier nur ein allgemeines Protokoll aufgeführt und die Varianten werden später beschrieben:
Zuerst wird die Nitrozellulose oder PVDF-Membran 2x 5 min in TBS-Puffer gewaschen und 30-60 min mit Blockpuffer geblockt. Dann wird ein Waschschritt durchgeführt, die Membran wird 2x 5 min mit Waschpuffer und 1x 5 min mit TBS gewaschen. Der 1. Antikörper wird in Blockpuffer verdünnt aufgeben und 1 h inkubiert. Wieder wird wie vorher 3x 5 min gewaschen und der 2. Antikörper in Blockpuffer für 1 h zugegeben. Jetzt wird die Membran 3x 5 min und 1x 15 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Membran wird mit Filterpapier abgetrocknet und mit dem ECL-Westernblotentwicklungssystem nach Anleitung des Herstellers entwickelt. Das überschüssige Reagenz wird abgetupft, der Blot mit Frischhaltefolie abgedeckt und gegen einen Röntgenfilm für 20 s bis 2 min exponiert.

3.14.3 Western-Blot nach QIAGEN-Anleitung

Bei den Western-Blots mit den QIAGEN-Antikörpern, die gegen den 6xHIS-tag gerichtet sind, wird laut der Anleitung des Herstellers *„Western und Colony Blot Protocols for use with RGS·His Antibody, Penta·His Antibody, and Tetra·His Antibody“* der QIAGEN GmbH, vorgegangen [QIAGEN GmbH 1997]. Diese Anleitung wird teilweise auch für die anderen Western-Blots benutzt. Bei den QIAGEN-Antikörpern darf als Blockpuffer nur BSA oder Casein eingesetzt werden.

3.14.4 Optimierung des Westernblots

Zur Optimierung der Sensitivität der Western-Blots und zur Verminderung des Hintergrundes wird eine Versuchsreiche mit aufgetropftem Protein durchgeführt. Dazu wird das aufgereinigte Proteinfragment direkt auf die Nitrozellulose getropft. Diese läßt man kurz trocknen und verfährt dann wie beim Western-Blot. Mit diesem Verfahren werden die verschiedenen Wasch- und Blockbedingungen ausgetestet.

Ein Beispiel zeigt die Tabelle 3.3.

Tab.3.3: Schemazeichnung zur Austestung der optimalen Western-Blot Bedingungen mittels aufgetropftem gereinigtem Protein

NaCl-Konzentration	Tritonkonzentration				
		0,5%	1%	1,5%	2%
	1 M	●	●	●	●
	1,5 M	●	●	●	●
	2 M	●	●	●	●
		●	●	●	●

Blocksubstanz	
1% Casein	●
3% Gelatine	●
3% BSA	●
10% Milchpulver	●

Außerdem wird eine Versuchsreihe mit der PVDF Protein Sequencing Membran von Biorad durchgeführt, um zu prüfen, ob hier die Hintergründe geringer sind.

3.15 Immunfluoreszenztestung

Bei Immunfluorezenztests mit den Vakziniavirusrekombinanten werden Zellen auf Deckgläschen gezogen und mit einer Verdünnungsreihe der rekombinanten Vakziniaviren infiziert. Am nächsten Tag werden die Deckgläschen vorsichtig aus den Vertiefungen der Kulturplatte genommen, 1x in PBS gewaschen, getrocknet und auf Objekträger geklebt. Die Zellen werden bei –20°C in Methanol/Aceton (1:2) 10 min fixiert und danach luftgetrocknet. Die Humanseren werden 1:100 in 0,01 M PBS/1% BSA verdünnt und auf die mit PBS angefeuchteten Deckplättchen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h in einer feuchten Kammer bei 37°C werden die Zellen 3x mit 0,01 M PBS gewaschen. Der mit Fluorescin Isothiocyanat (FITC)-konjugierte zweite Antikörper wird laut Anleitung des Herstellers Dako in 0,01 M PBS/1% BSA verdünnt. Zu 1500 µl Antikörperverdünnung werden 6 µl Evans Blue als Gegenfarbstoff gegeben. Diese Mischung wird auf die Deckplättchen pipettiert und wie vorher 1 h inkubiert. Die Deckplättchen werden 3x mit 0,01 M PBS gewaschen und mit Glycerin/PBS im Verhältnis 9:1 eingedeckt. Jetzt können sie unter dem Fluoreszenzmikroskop in Ölimmersion ausgewertet werden.

3.16 ELISA-Protokoll

Für den ELISA werden einerseits normale Mikrotiterplatten mit dem Protein beschichtet, andererseits werden auch Versuche mit den Anti·His Antibody Strips und den Ni-NTA HisSorb Strips von QIAGEN durchgeführt. Bei diesen beiden Systemen wird für die Beschichtung mit dem Protein nach Herstelleranleitung vorgegangen.

3.16.1 ELISA mit den normalen Mikrotiterplatten

Die normalen ELISA-Mikrotiterplatten werden mit 10 µl gereinigtem Protein in 10 ml 0,1 M $NaHCO_3$ (pH 9,8) beschichtet. Von dieser Lösung werden in jede Vertiefung 100 µl pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Proteinlösung abgekippt und die Platte mit 1% Milchpulver in TBS/Tween, 200 µl pro Well, für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Nun wird 2x mit TBS/Tween gewaschen und der 1. Antikörper (meist Humanseren in einer Verdünnung von 1:100 oder in Titrationsstufen) in Blockpuffer in die Vertiefungen gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Platten 5x mit TBS/Tween gewaschen. Der 2. Antikörper (POD-gekoppelter Anti-Human Antikörper von Dianova) wird nach Herstellerangaben 1:2000 in 1% Milchpulver in TBS verdünnt und in die Vertiefungen gegeben. Es wird wieder 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird nochmals 5x mit TBS/Tween und 1x mit TBS gewaschen. 100 µl der eingesetzten Substratlösung o-Phenylenediamine (OPD) werden in jede Vertiefung pipettiert, die Farbentwicklung abgewartet und mit 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Die ELISA-Platten werden auf dem ELISA-Automaten EAR 400 AT ausgewertet.

3.16.2 Anti·His Antibody Strips und Ni-NTA HisSorb Strips

Bei diesen Systemen wird laut Anleitung des Herstellers QIAGEN vorgegangen. Es werden 20 µl der über Ni-Säulen gereinigten B-E Proteine eingesetzt. Der Blockpuffer ist 0,2% BSA in PBS bei den *Anti·His Antibody Strips* und 1% BSA in PBS bei den *Ni-NTA HisSorb Strips*. Gewaschen wird mit 50 mM PBS. Die Entwicklung erfolgt mit demselben System wie unter 3.16.1 beschrieben.

4 ERGEBNISSE

4.1 Klonierung des Glykoprotein H (gH) des HHV-8

4.1.1 Sequenzanalyse des gH und Entwicklung einer Klonierungsstrategie

Die kodierende Sequenz des gH wurde der Genbank (Accession: U93872) entnommen. Das gH-Homolog des Humanen Herpesvirus 8 wird durch den ORF22 (Bp 37412-39604 der publizierten Sequenz) kodiert. Die Sequenz des gH ist 2193 Bp lang und kodiert für ein Protein mit 730 Aminosäuren. Eine Restriktionsanalyse wurde durchgeführt, um Enzyme zu definieren, die nur eine oder wenige Schnittstellen auf der Sequenz (Abb.4.1) aufweisen bzw. die gH-Sequenz nicht schneiden.

SCHEMAZEICHNUNG:

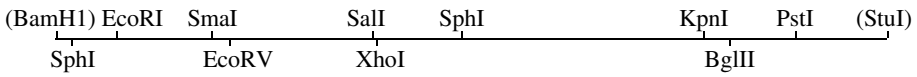


Abb.4.1: Das gH-Gen des HHV-8. Schematische Darstellung mit Schnittstellen der wichtigsten Restriktionsenzyme. 200 Basenpaare entsprechen ungefähr 1 cm. In Klammern die durch die PCR eingefügten Schnittstellen.

Um Restriktionsenzymschnittstellen für die spätere Klonierung zur Verfügung zu haben, wurden Primer ausgesucht, die in das 5‘ Ende eine BamH1 Schnittstelle und in das 3‘ Ende eine StuI Schnittstelle einfügen. Diese Restriktionsenzyme haben keine Schnittstellen im gH-Gen und wurden im Hinblick auf die später benötigten Umklonierungen in Plasmide zur Vakziniavirusrekombination ausgesucht.

4.1.2 Amplifikation des gH-Gens mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Im ersten Schritt wurde der DNA-Abschnitt, welcher für das gH kodiert, mittels PCR aus HHV-8 positiven Lymphknoten amplifiziert. Die PCR wurde mit Material aus einem Lymphknoten durchgeführt, der in der diagnostischen PCR positiv auf HHV-8-DNA getestet worden war. Dazu wurde ein stecknadelkopfgroßes Gewebestück aus dem Lymphknoten entnommen. Dieses Stück wurde mit Proteinase K verdaut, die DNA mit Phenol-Chloroform extrahiert, gefällt und in Wasser aufgenommen. Die so gewonnene DNA wurde in der PCR eingesetzt. Eine Schemazeichnung der eingesetzten Primer zeigt die Abb.4.2. Die Ex 1/Ex 2 Primer lagen außerhalb des Gens und wurden

für die nested-PCR benötigt. Die zu amplifiziernde Sequenz war 2200 Basenpaare lang (BamH1- bis Stu-Schnittstelle).

PRIMERSCHEMAZEICHNUNG:

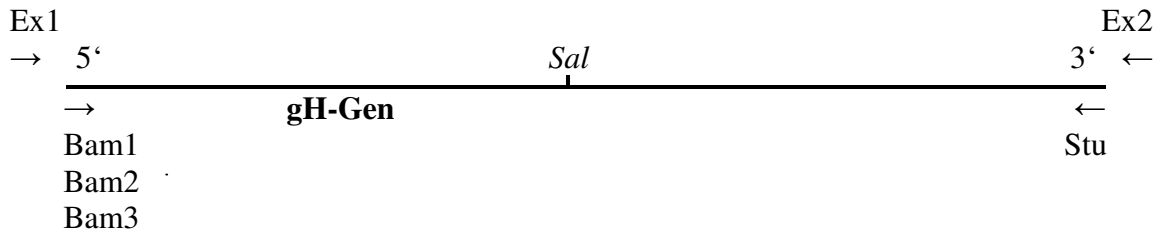


Abb.4.2: Das gH-Gen HHV-8 mit schematischer Einzeichnung der in der PCR benutzten Primer

Es zeigte sich, daß zur erfolgreichen Amplifikation des gH-Gens eine nested-PCR nötig ist. Außerdem wurden bessere Ergebnisse mit den Polymerasen Pwo und Expand™ von Boehringer erzielt, die sich speziell für die Gewinnung langer PCR-Fragmente eignen. Bei diesen Polymerasen entstehen sichere Blunt-Ends, so daß eine weitere Aufbearbeitung zur Gewinnung von Blunt-Ends entfällt *(„proof-reading“).*

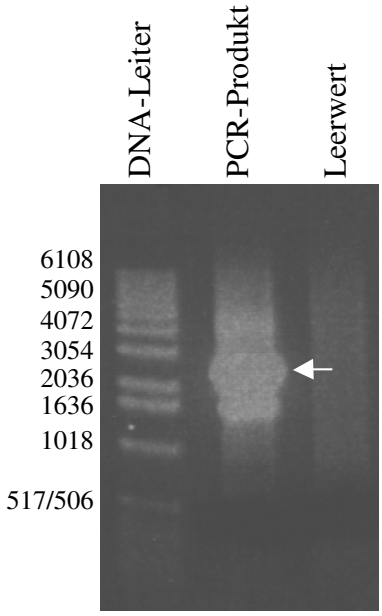


Abb.4.3: Agarosegel mit dem Gesamt-gH PCR-Produkt (ca. 2200 BP). Primer der 1. PCR Bam2-Stu, der 2. PCR Bam1-Stu.

Um die Bedingungen der PCR zu optimieren und die Annealing-Temperatur für alle Primer gleichzuhalten, wurde mit verschiedenen Primern experimentiert.

Folgende Primerkombinationen führten mit den Polymerasen Pwo und Expand™ schließlich zum Erfolg:

1. PCR: Ex1-Stu und 2. PCR: Bam2-Stu

1. PCR: Bam2-Stu und 2. PCR: Bam1-Stu

1. PCR: Bam2-Stu und 2. PCR: Bam3-Stu

Die PCR wurde nach der für die Polymerasen angegebenen Anleitung von Boehringer durchgeführt, abweichend davon erfolgte das Annealing bei 50 °C.

Das gH-Gen konnte somit in voller Länge aus Patientenmaterial amplifiziert werden (Abb 4.3).

4.2 Prokaryontische Expression des gH in E. coli

4.2.1 Klonierungsstrategien mit Plasmidkarten

Zur prokaryontischen Expression wurde das PCR-Amplifikat des gH-Gens mit BamHI geschnitten und in ein SmaI/BamHI geschnittenes pQE-Plasmid ligiert. Bei einer Expression in pQE-Plasmiden wird das gH als Fusionsprotein mit einer N-terminalen Markierung mit 6x Histidin (6xHIS-tag) exprimiert. Dieses Histidin-Ende interagiert mit Nickel-Ionen und bildet mit Nitrilotriacetischer Säure (Ni-NTA) einen Chelat-Komplex. Der 6xHIS-tag erlaubt eine einfache Aufreinigung des Proteins über kommerziell erhältliche Ni-NTA-Säulen und, im Hinblick auf spätere immunologische Untersuchungen, auch die Bindung des Fusionsproteins an Ni-NTA-beschichtete ELISA-Platten.

Um das Leseraster des genetischen Codes einzuhalten wurde das Plasmid pQE30 eingesetzt (Abb.4.4).

pQE30 (pQE31+2Bp; pQE32+1Bp)

Xho	EcoR1	ATG	6xHis	BamHI	SphI	KpnI	Sma	SalI	PstI	Hind3	Xba	Bgl1	Xho1
0	87	114	126-144	145	151	163	168	173	179	187	1118	2544	3416

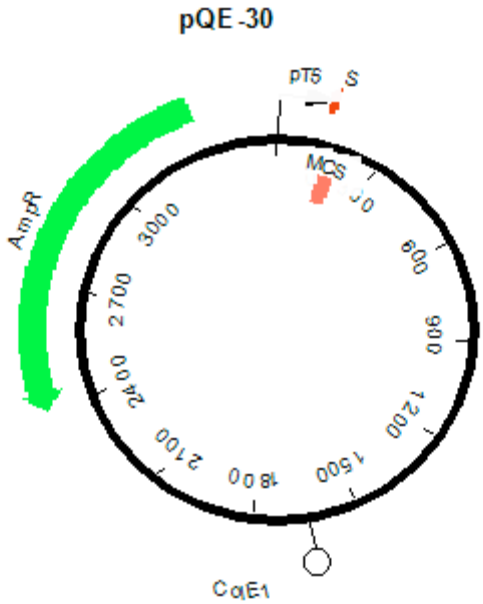


Abb.4.4: Schematische Darstellung des zur prokaryontischen Expression benutzten PQE-Plasmids. Eingezeichnet sind die Ampicillin-Resistenz (AmpR), die Multiple Coning Site (MCS), der Promoter (pT5) und das Start Codon (S), außerdem in der oberen Tabelle die Lage der Restriktionsenzyme. Die Abkürzung Bp steht für Basenpaare.

Die Transformation erfolgte nach der $CaCl_2$-Methode, die Selektion wurde mit Ampicillin durchgeführt. Das pQE-Konstrukt mit einkloniertem gH wurde pQE30-gH genannt.

pQE30 mit eingefügtem gH = pQE30-gH

Xho	EcoRI	ATG	6xHis	BamHI	**gH**	Sma	SalI	PstI	HindIII	XbaI	BglI	XhoI
0	87	114	126-144	145		2350	2355	2361	2369	3300	4726	5598

BamHI	**SphI**	**EcoRI**	**SmaI**	**EcoRV**	**SalI**	**XhoI**	**SphI**	**KpnI**	**BglII**	**PstI**	**StuI**	**SmaI**
145	**185**	**304**	**558**	**606**	**981**	**991**	**1218**	**1858**	**1928**	**2102**	**2344**	**2350**

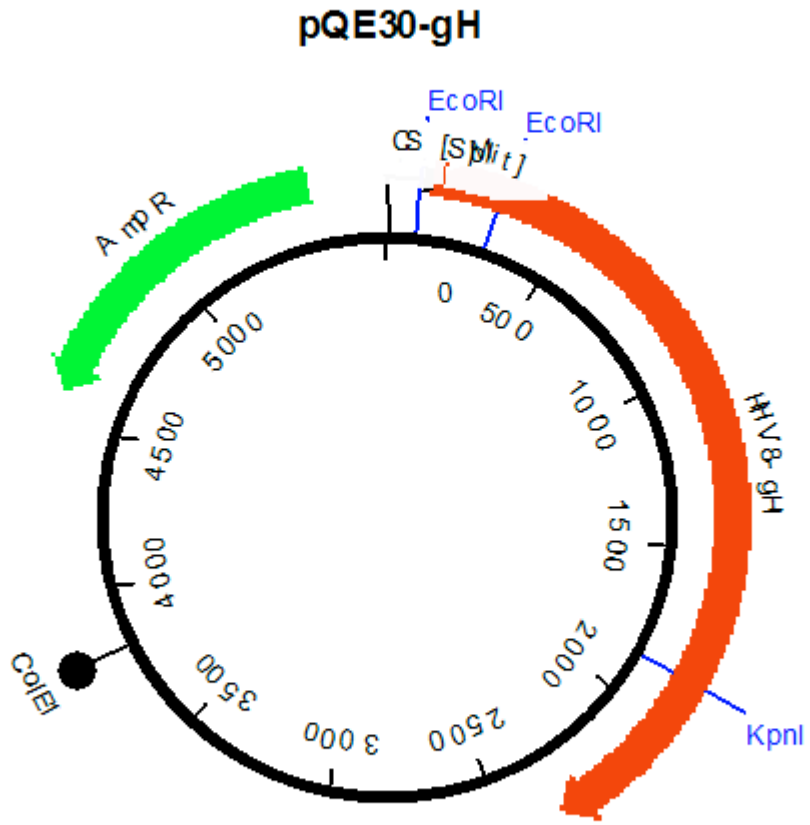


Abb.4.5: Klonierung des gH in das Plasmid pQE30. Schematische Darstellung des pQE30-gH, in der oberen Tabelle mit Lage der Restriktionsenzymschnittstellen. AmpR= Ampicillinresistenz.

Durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und KpnI konnte der richtige Einbau des gH-Gens überprüft werden (Abb.4.6).

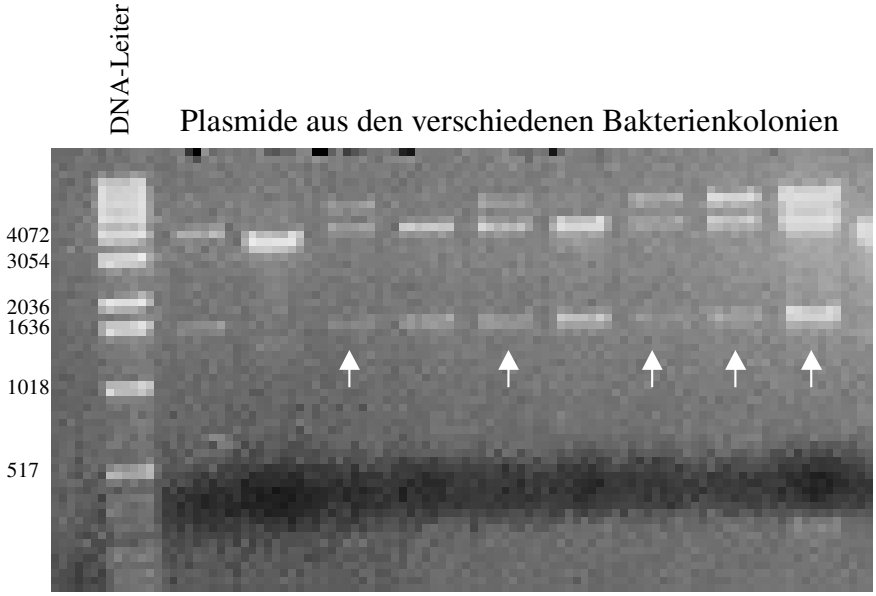


Abb.4.6: Restriktionsenzymverdau, Plasmid PQE30 mit eingefügtem Glykoprotein H (PQE30-gH) EcoRI und KpnI geschnitten. Die Pfeile markieren die korrekten Plasmide, mit denen dann weitergearbeitet wurde.

Nachdem der Restriktionsenzymverdau korrekte Ergebnisse lieferte, sollte das Protein in Bakterien exprimiert werden. Dazu wurden die rekombinanten Bakterien mit IPTG induziert und nach ½-6 Stunden geerntet und abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in SDS-Proteinprobenpuffer lysiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einem 15% SDS-Proteingel. Das rekombinante Protein hat ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 82,7 kD.

In den angefertigten Proteingelen ließ sich weder durch Coomassie-Färbung oder Silberfärbung noch durch einen ersten Western-Blot mit Humanseren von HHV-8 positiven Patienten eine Proteinexpression nachweisen.

Dieser Test wurde vor der Markteinführung der Anti-HIS-Tag Antikörper durchgeführt, er war zu diesem Zeitpunkt die einzige Kontrollmöglichkeit mit Antikörpern.

Nach der Markteinführung der Anti-HIS-Tag Antikörper durch die Firma QIAGEN wurde auch mit diesen ein Western-Blot durchgeführt. Auch damit ließ sich keine Proteinexpression nachweisen.

4.2.2 Klonierungsstrategie von Teilfragmenten des gH

Da eine Expression des gesamten gH in E.coli nicht nachweisbar war, wurden lineare Epitope des gH als Teilfragmente in Bakterien exprimiert. Dazu wurde das gH-Gen über interne Schnittstellen (Abb.4.7) in fünf Teilen zerschnitten und in pQE-Plasmide kloniert.

<u>Schemazeichnung:</u> Aufteilung des gH in Teilfragmente

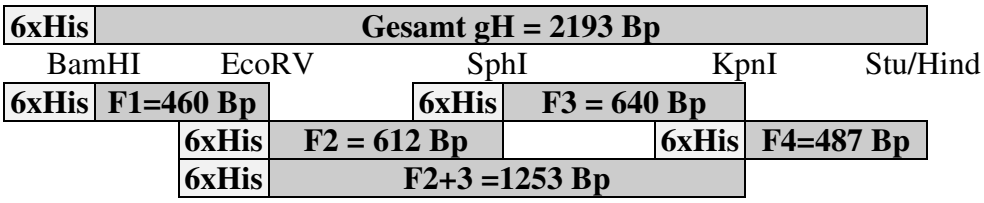


Abb.4.7: Schemazeichnung der in Bakterienvektoren klonierten Fragmente des HHV-8-gH. F steht für die einzelnen Fragmente, Bp für Basenpaare und 6xHis für die Histidinmarkierung der PQE-Proteine zur späteren Aufreinigung.

1) Für die vordersten 460 Basenpaare wurde das pQE30-gH Plasmid zuerst mit PstI geschnitten und dann mit Klenow behandelt. Das Klenow wurde inaktiviert und das Plasmid mit EcoRV geschnitten, über ein Agarosegel gereinigt und religiert. Damit entstand ein Plasmid mit dem Fragment F1 (pQE30-F1), das die vordersten 460 Basenpaare des gH umfaßt.

2) Für die hintersten 486 Basenpaare wurde das pQE30-gH mit KpnI und HindIII geschnitten. Das entstandene 486 Bp-Fragment wurde isoliert und zur in-frame Expression in das KpnI und HindIII geschnittene, aufgereinigte pQE31-Plasmid einkloniert (pQE31-F4).

3) Für die mittleren Fragmente war eine Umklonierung nötig. Dabei wurde das Plasmid pQE30-gH EcoRV und Kpn geschnitten und das 1252 Basenpaare lange Fragment des gH isoliert. Das Plasmid pBlueskriptII SK wurde Sma und Kpn geschnitten und der Vektor isoliert. Dann wurde das Fragment in den Vektor ligiert. Es entstand das Plasmid pBS-F2+F3, das nun als Grundlage für weitere pQE-Konstrukte verwendet wurde, die in das passende Leseraster kloniert wurden:
   a) Fragment von EcoRV bis Kpn (F2+3=1252 Basenpaare)
      Dazu wurde pBS-F2+F3 mit BamHI und KpnI geschnitten und das Fragment in ein BamHI und KpnI geschnittenes pQE30 Plasmid einligiert: pQE30-F2+3.

b) Fragment von EcoRV bis SphI (F2=612 Basenpaare)

Das Plasmid pBS-F2+F3 wurde BamHI und SphI geschnitten, und das Fragment in einen BamHI und SphI geschnittenen pQE30 Vektor eingebracht: pQE30-F2.

c) Fragment von SphI bis KpnI (F3=640 Basenpaare)

Hierzu wurde pBS-F2+F3 mit SphI und KpnI behandelt und in einen mit SphI und KpnI vorgeschnittenen pQE32 Vektor eingebracht: pQE32-F3.

Zur Verdeutlichung der Klonierungsstrategien wird hier und auf der nächsten Seite eine schematische Darstellung der Konstrukte gezeigt (Tab.4.1 und Tab.4.2).

Tab.4.1: Das Glykoprotein H und die zur Klonierung von Teilfragmenten des gH benötigten Konstrukte und Plasmide in schematischer Darstellung. Die Konstrukte werden mit Längenangabe und Angabe der Restriktionsenzymschnittstellen dargestellt.

pQE		**gH**		**pQE30-gH**		**pBlueskript II**		**PBs + F2+3**	
Xho	0	BamHI	0	Xho	0	SspI	19	SspI	19
EcoRI	87	Sph	40	EcoRI	87	Kpn	654	**KpnI**	**654**
ATG	114	EcoRI	159	ATG	114	XhoI	673	SphI	1294
6xHis	126-144	SmaI	413	6xHis	126-144	SalI	679	XhoI	1521
BamHI	145	EcoRV	461	**BamHI**	**145**	HindIII	694	SalI	1531
SphI	151	SalI	836	Sph	185	EcoRV	698	***EcoRV/***	**1906**
KpnI	163	XhoI	846	EcoRI	304	EcoRI	706	***Sma***	
Sma	168	SphI	1073	SmaI	558	PstI	708	BamHI	1914
SalI	173	KpnI	1713	EcoRV	606	Sma	716	XbaI	1926
PstI	179	BglII	1783	SalI	981	BamHI	724		
HindIII	187	PstI	1957	XhoI	991	XbaI	736		
Xba	1118	Stu	2199	SphI	1218			Bemerkung:	
BglI	2544			KpnI	1858			Das gH Fragment F2+F3 ist in umgekehrter Leserichtung einkloniert.	
XhoI	3416			BglII	1928				
				PstI	2102				
				Stu	2344				
				Sma/-	**Ca. 2350**				
				SalI	Ca. 2355				
				PstI	Ca. 2361				
				HindIII	Ca. 2369				
				Xba	Ca. 3300				
				BglI	Ca. 4726				
				Xho1	Ca. 5598				
				gH-Fra.	**2199**			**gH-Fra.**	**1252**
Gesamt	**3416**	**Gesamt**	**2199**	**Gesamt**	**5598**	**Gesamt**	**2961**	**Gesamt**	**3359**

Erläuterungen zur Tabelle 4.1: Die Einheit sind immer Basenpaare. gH-Fra.: Länge des klonierten gH Fragmentes. Hellgrau unterlegt gH-Teile, dunkelgrau Teile aus pBlueskriptII SK (pBS). F 1-4 bezeichnet die verschiedenen Fragmente aus dem gH-Gen.

Tab.4.2: Die Plasmide mit den Teilfragmenten des gH in schematischer Darstellung. Die klonierten Konstrukte werden mit Längenangabe und Angabe der Restriktionsenzymschnittstellen dargestellt.

pQE30-F1		**pQE30-F2**		**pQE32-F3**		**pQE31-F4**		**pQE30-F2+3**	
XhoI	0	XhoI	0	XhoI	0	XhoI	0	XhoI	0
EcoRI	87	EcoRI	87	EcoRI	87	EcoRI	87	EcoRI	87
ATG	114	ATG	114	ATG	114	ATG	114	ATG	114
6xHis	126-144	6xHis	126-144	6xHis	126-144	6xHis	126-144	6xHis	126-144
BamHI	145	**BamHI**	***145***	BamHI	145	BamHI	145	**BamHI**	**145**
SphI	185	*Sma/*	*153*	**SphI**	**151**	SphI	151	*Sma/*	*153*
EcoRI	304	*EcoRV*		**KpnI**	**791**	**KpnI**	**163**	*EcoRV*	
SmaI	558	SalI	528	SmaI	796	BglII	233	SalI	528
EcoRV	**606**	XhoI	538	SalI	801	PstI	407	XhoI	538
Pst (Klenow)		**SphI**	**765**	PstI	807	Stu	649	SphI	765
HindIII	614	KpnI	777	HindIII	815	Sma/-	Ca. 655	**KpnI**	**1405**
XbaI	1545	SmaI	782	XbaI	2701	SalI	Ca. 660	Sma	1410
BglI	2971	SalI	787	BglI	3172	PstI	Ca. 666	SalI	1415
XhoI	3843	PstI	793	XhoI	4044	**HindIII**	**Ca. 674**	PstI	1421
		HindIII	801			Xba	Ca. 1605	HindIII	1429
		XbaI	1782			BglI	Ca. 3031	Xba	2360
		BglI	3158			XhoI	Ca. 3903	BglI	3786
		XhoI	4030					XhoI	4658
gH-Fra.	**461**	**gH-Fra.**	**612**	**gH-Fra.**	**640**	**gH-Fra.**	**486**	**gH-Fra.**	**1252**
Gesamt	**3843**	**Gesamt**	**4030**	**Gesamt**	**4044**	**Gesamt**	**3903**	**Gesamt**	**4658**

Erläuterungen zur Tabelle 4.2: Die Einheit sind immer Basenpaare. gH-Fra.: Länge des klonierten gH Fragmentes. Hellgrau unterlegt gH-Teile, dunkelgrau Teile aus pBlueskriptII SK (pBS). F 1-4 bezeichnet die verschiedenen Fragmente aus dem gH-Gen.

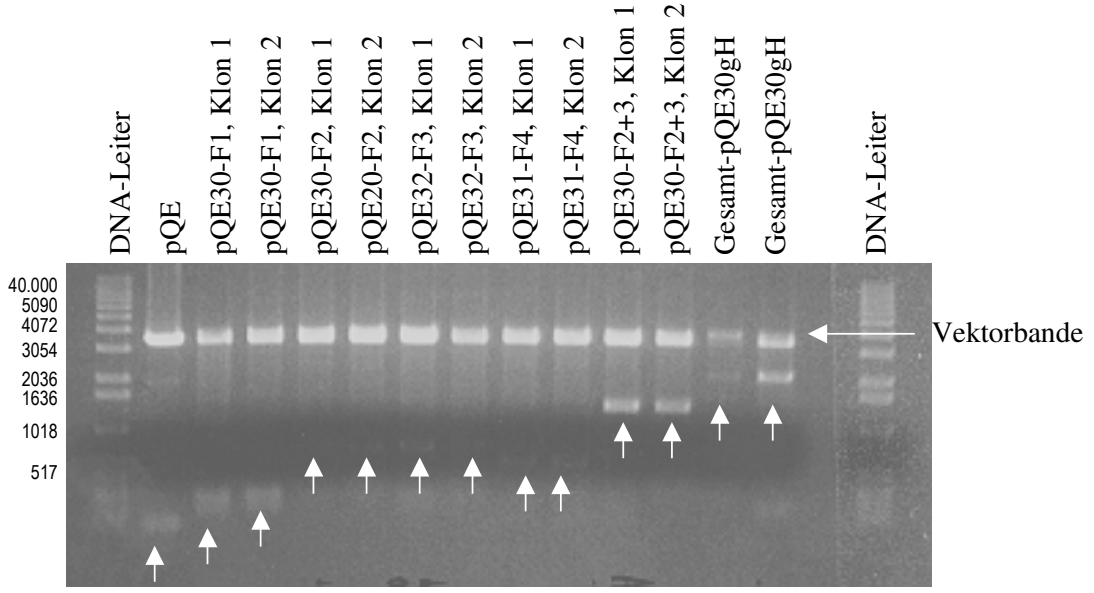


Abb.4.8: Restriktionsenzymverdau zur Kontrolle der in PQE-Plasmide klonierten Fragmente des gH. Alle Plasmide wurden mit EcoRI und HindIII gespalten. Die Fragmente sind mit einem Pfeil markiert.

4.2.3 Expression der Teilproteine in E.coli

Um die Proteine der pQE-Plasmide zu exprimieren wurden die Plasmide in den E.coli Stamm SG13009 eingeschleust und unter Wachstumsbedingungen mit IPTG induziert. Das Bakterienpellet wurde nach der Abzentrifugation in SDS-Probenpuffer gelöst und die Proteine über ein 15% Acrylamid-Proteingel aufgetrennt.

Alle fünf Teilproteine wurden exprimiert und konnten in der Coomassie-Färbung dargestellt werden (Abb.4.9). Zur Kontrolle wurde ein Western-Blot mit Anti-HIS-Tag Antikörpern der Firma QIAGEN durchgeführt, der ebenfalls den Nachweis aller Teilproteine des gH erlaubte (Abb.4.9).

Die Expression des gH im prokaryontischen System führte somit zu einem Teilerfolg. Die Expression des gesamten Proteins in E. coli gelang zwar nicht, wohl aber die Expression von fünf Teilproteinen, welche die gesamte Sequenz des gH repräsentieren.

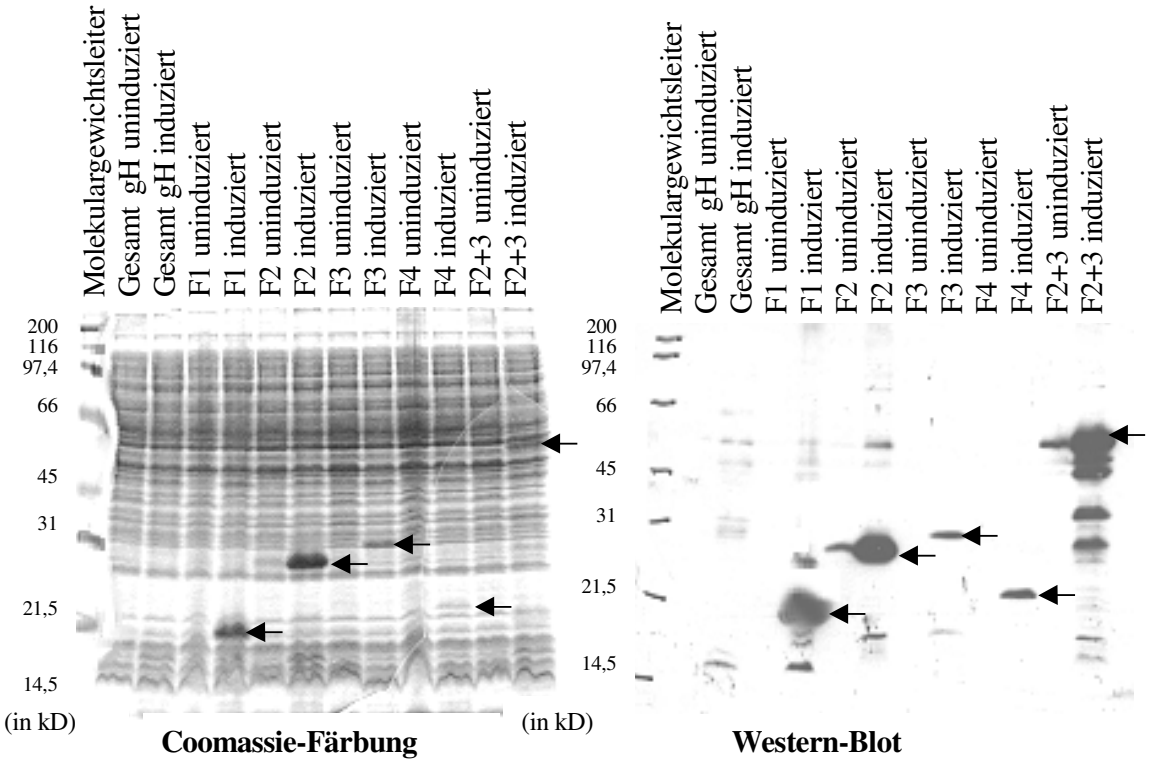


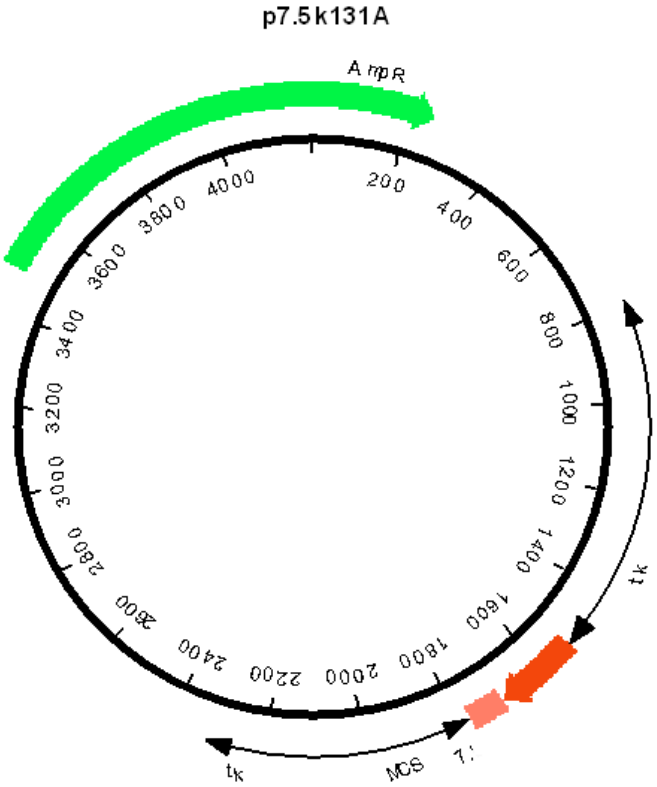
Abb.4.9: Coomassie gefärbtes 15% SDS-Proteingel mit aufgetrennten Bakterienlysaten und Western-Blot mit denselben Proben. Transformierte Bakterien mit rekombinanten PQE-Plasmiden, 2 Stunden mit IPTG induziert.
Western-Blot: 1. Antikörper Anti-RGS von Qiagen (1:1000), 2. Antikörper Anti-Mouse IgG (1:2000), geblockt mit 1% Casein.
F1: Fragment von BamHI bis EcoRV, Basenpaare 1-460 des gH;
F2: Fragment von EcoRV bis Sph, Basenpaare 461-1072 des gH;
F3: Fragment von Sph bis KpnI; Basenpaare 1073-1712 des gH;
F4: Fragment von Kpn bis Ende des Gens; Basenpaare 1713 –2199 des gH;
F2+3: Fragment E-S und Fragment S-K zusammen; Basenpaare 461-1712 des gH.

4.3 Eukaryontische Expression des gH im Vakziniavirus-system

4.3.1 Klonierungsstrategien mit Plasmidkarten

Um ein komplettes Glykoprotein mit glykosiliertem Anteil zu erhalten, kann man nicht auf eine Bakterienexpression zurückgreifen, da die Proteine in den Bakterien nicht mit Zuckerketten versehen werden. Deshalb war in die Versuchsplanung eine Expresssion des gH mit Hilfe rekombinanter Vakziniaviren in eukaryontischen Zellen vorgesehen. Für immunologische Experimente bietet eine eukaryontische Expression zudem die Möglichkeit des Nachweises von Konformationsepitopen, die nur in korrekt weiterverarbeiteten und gefalteten Proteinen nachweisbar sind.

In der Abteilung Virologie der Universität Ulm wird für die Rekombination im Vakziniavirus das Plasmid p7,5k131A eingesetzt. Die Expression wird durch den Vakziniaviruspromoter 7,5k gesteuert, eine Rekombination im Vakziniavirusstamm Copenhagen ist durch die auf dem Plasmid vorhandenen Homologien zum Thymidinkinasegen (tk) von Vakziniaviren möglich (Abb.4.10).



Multiple Cloning Site des Plasmids p7.5k131A	
Lage in Basenpaaren	Restriktions-enzymschnitt-stelle
1704	BglII
1708	PstI
1714	SalI
1720	BamHI
1727	HindIII
1741	KpnI
1747	SphI
1753	EcoRV
1759	SacI
1766	SmaI
1772	EcoRI

Abb.4.10: Schematische Darstellung des zur Vakziniarekombination benutzen Plasmids p7,5k131A. Rechts sind die Restriktionsenzymschnittstellen der Multiple Cloning Site dargestellt. AmpR = Ampicillinresistenz; MCS = Multiple Cloning Site; tk = Thymidinkinase.

Es wurden vier verschieden Konstrukte kloniert, davon ein Teil mit dem schon bei der Bakterienexpression benutzten 6xHIS-tag.

Folgende Plasmide wurden konstruiert und mit rVV für rekombinantes Vakziniavirus benannt:

1) rVV-gH: Um das gH-Gen in den Vektor p7,5K131A einzubauen, wurde der Vektor mit EcoRV und BamHI und das auf Seite 52 in Kapitel 4.2.1 beschriebene Plasmid pQE30gH mit Stu und BamHI geschnitten. Die Ligation der beiden Fragmente ergab das Plasmid rVV-gH (Abb.4.11).

rVV-gH								
1704	1708	1714	**1720**		**3920**	3926	3933	3939
BglII	PstI	SalI	**BamHI**	gH	**EcoRV/Stu**	SacI	SmaI	EcoRI

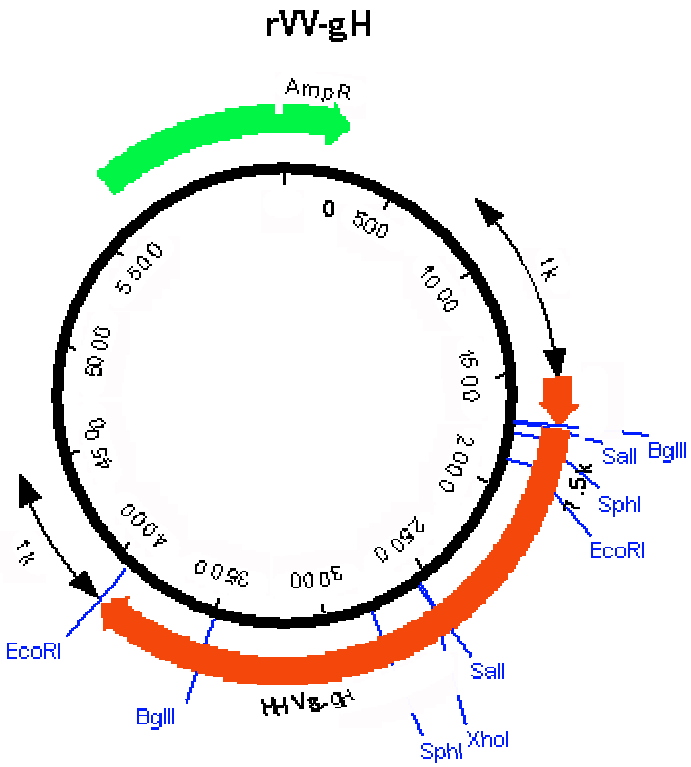


Abb.4.11: Schematische Darstellung des Konstruktes rVV-gH. Mit Rot ist unten die Einklonierung des gH in das P7,5k131A-Plasmid dargestellt. Oben die Einklonierung des gH in die Multiple Cloning Site (MCS) des Plasmids mit Lage der Restriktionsenzymschnittstellen. Hellgrau unterlegt das gH. In fetter Schrift die benutzten Restriktionsenzymschnittstellen. tK = Thymidinkinasegen, AmpR = Ampicillinresistenz.

Das Plasmid rVV-gH wurde durch Spaltung mit EcoRI und mit SphI überprüft (Abb.4.12). Plasmide mit korrektem Restriktionsmuster wurden zur Rekombination verwendet.

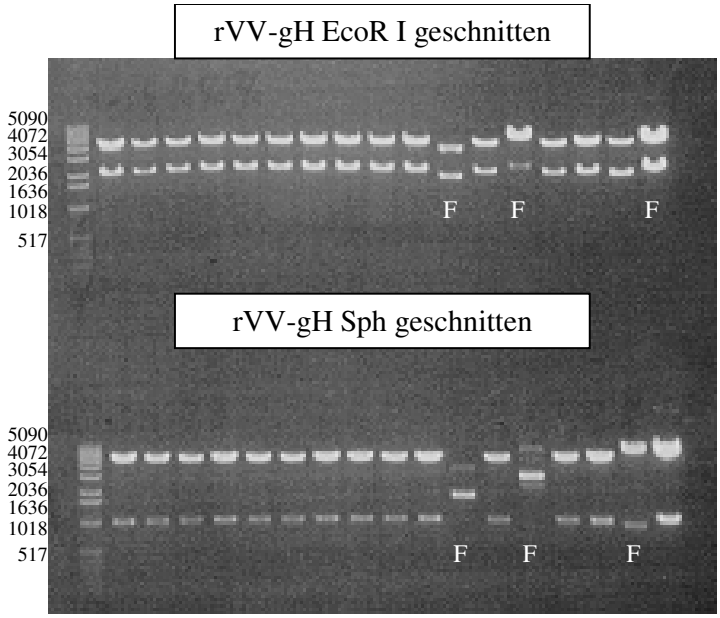


Abb.4.12: Restriktionsenzymverdau von p7,5k131A mit eingefügtem Glykoprotein H ohne His-tag Markierung (rVV-gH). Verschiedene DNA-Präparationen aus Bakterienklonen. Bei der Spaltung mit EcoRI ergeben sich Spaltprodukte von 4317 und 2059, bei der mit Sph von 5340 und 1033 Basenpaaren. F markiert falsche Konstrukte.

2) rVV-gH6HIS: Das Plasmid rVV-gH-6His mit N-terminalem 6xHIS-tag wurde aus den bereits vorhandenen Plasmiden rVV-gH und pQE30-gH wie folgt konstruiert: Das Plasmid rVV-gH wurde mit SalI und XhoI geschnitten. Aus pQE30-gH wurde mit einem XhoI-Verdau das 991 Bp lange 5´-gH-Fragment mit dem 6xHis Ende und dem Anfang des gH-Gens gewonnen. Beide Fragmente wurden isoliert und das 991 Basenpaare lange Fragment des gH anschließend in den Vektor ligiert. Das so konstruierte Plasmid rVV-gH6His ist in Tab.4.3 schematisch dargestellt.

Tab.4.3: Schematische Darstellung des Vakziniakonstruktes rVV-gH6HIS. Dieses Konstrukt enthält das gesamte gH mit einem 6x His-tag in dem Vakziniavektor p7,5k131A. Dargestellt ist die Multiple Cloning Site des P7,5k131A mit einkloniertem Konstrukt und Lage der Restriktionsenzymschnittstellen.

rVV-gH6HIS									
1704	**1714**	1720	1828	1840	1859	**2705**	4058	4064	4077
BglII	**SalI/Xho**	BamHI	EcoRI	*6xHIS*	BamHI	**Xho**	EcoRV/Stu	SacI	EcoRI

Erläuterung zur Tabelle 4.3: Hellgrau unterlegt das gH. In fetter Schrift die benutzten Restriktionsenzymschnittstellen.

Die Orientierung des 991 Basenpaare langen Fragmentes wurde danach durch einen Restriktionsenzymverdau überprüft. Das Plasmid rVV-gH6HIS und insbesondere die korrekte Orientierung des 5´-Bereichs von gH wurde durch Spaltung mit SalI und durch eine Doppelspaltung mit BglII und EcoRV überprüft (Abb.4.13).

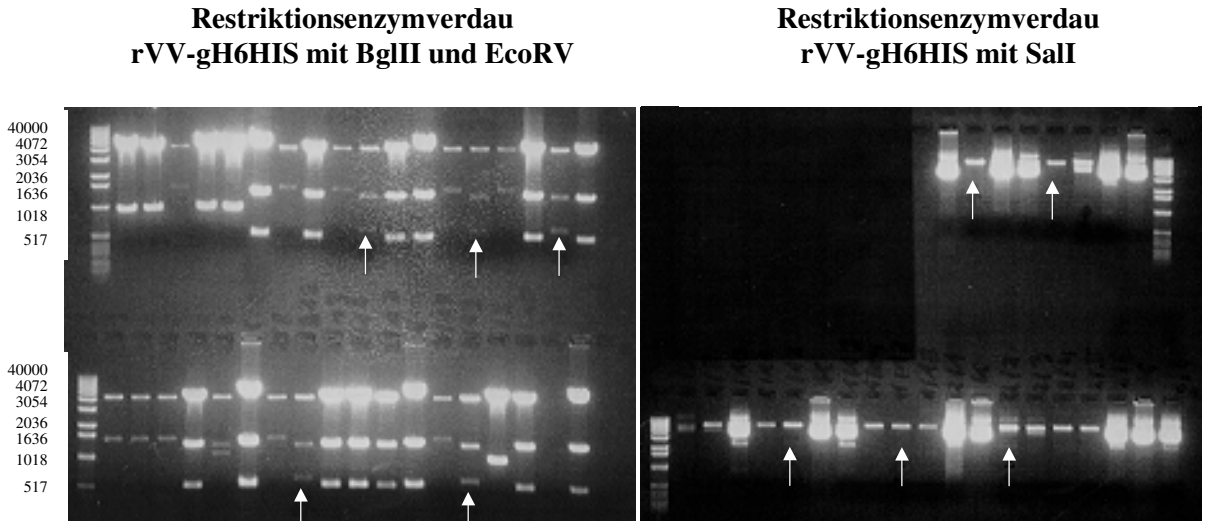


Abb.4.13: Restriktionsenzymverdau von rVV-gH6HIS (P7,5k131A mit eingefügtem Glykoprotein H und 6xHistidin Markierung). Mit den Pfeilen sind die richtigen Konstrukte markiert. Bei der Spaltung mit BglII und EcorRV entstehen Fragmente mit einer Länge von 616, 1322 und 4572 Basenpaaren, bei der Spaltung mit Sal I entfällt beim richtigen Produkt eine Schnittstelle und das entstehene Fragment hat eine Länge von 6510 Basenpaaren.

3) rVV-gH6HISΔT5: Um störende Interaktionen des im Plasmid rVVgH-6HIS noch vorhandenen bakteriellen Promoters T5 aus den pQE-Plasmiden mit dem eukaryontischen p7,5K131A-Promoter zu verhindern, wurde ein Plasmid konstruiert, in dem der T5-Promoter des pQE-Plasmides fehlt, die 6x His-Sequenz am 5‘ Ende des gH aber trotzdem vorhanden ist. Dazu wurde eine PCR mit dem Primerpaar Bgl2/5#His und Sal B/gh83 auf dem Template pQE30-gH durchgeführt. Das entstandene Amplifikat konnte über die im Primer vorhandene BglII-Schnittstelle und die EcoRV-Schnittstelle an Position 461 des gH in das BamHI/EcoRV-gespaltene Plasmid rVV-gH kloniert werden. Die 5´-Region des gH ist in Tab.4.4 schematisch dargestellt. Leider war es nicht möglich, den Erfolg der Klonierung durch einen Restriktionsenzymverdau zu kontrollieren, da keine selektiven Restriktionsenzymschnittstellen zur Verfügung standen und das nur 36 Basenpaare längere Fragment mit der 6xHIS-tag Markierung vom Plasmid ohne Markierung auf dem Agarosegel nicht zu unterscheiden war. Deshalb wurde eine Sequenzierung mit dem Pharmacia Biotech T7 Sequencing Kit

durchgeführt. Mit dieser Sequenzierung konnten die richtigen Bakterienkolonien selektiert werden.

Tab.4.4: Schematische Darstellung des Vakziniaviruskonstruktes rVV-gH6HISΔT5. Dieses Konstrukt enthält das gesamte gH mit einem 6x HIS-tag in dem Vakziniavirusvektor p7,5k131A ohne bakteriellen T5-Promoter. Dargestellt ist die Multiple Cloning Site des P7,5k131A mit einkloniertem Konstrukt, die Lage der Restriktionsenzymschnittstellen und der 6xHis Markierung.

rVV-gH6HISΔT5									
1704	1714	**1720**	1725	1737	1756	**2216**	3956	3962	3975
BglII	SalI	**BamHI/BglII**	ATG	*6xHIS*	BamHI	**EcoRV**	Stu/EcoRI	SacI	EcoRI

Erläuterung zur Tabelle 4.4: Hellgrau unterlegt das gH. In fetter Schrift die benutzten Restriktionsenzymschnittstellen.

4) rVV-gH6HIS/3‘: Da das gH ein virales Glykoprotein ist, das zur Prozessierung im endoplasmatischem Retikulum und im Golgi-Apparat möglicherweise eine Signalsequenz aufweist, bestand die Möglichkeit, daß ein N-terminaler 6xHIS-tag nach der Proteinsynthese im Vakziniavirussystem abgespalten wird. Daher wurde bei einem weiteren Konstrukt der 6xHIS-tag an das 3‘Ende des Plasmids gestellt. Dazu war eine Zwischenklonierung in das Plasmid pQE 18, das den 6xHIS-tag am 3‘ Ende trägt, erforderlich. Leider standen für die Umklonierung des Gesamt-gH keine passenden Restriktionsenzymschnittstellen zur Verfügung. Deshalb beschränkten wir uns auf die vorderen 1783 Basenpaare des gH-Gens. Diese wurden mit BamHI und BglII herausgeschnitten und in das BamHI/BglII geschnittene pQE 18 kloniert. Das entstandene Plasmid pQE18-gH wurde in Bakterien vermehrt und dann Xba geschnitten. Es erfolgte eine Behandlung mit Klenow um ein Blunt-End zu gewinnen und nach der Inaktivierung des Klenow-Fragmentes ein Schnitt mit BamHI. Das Plasmid p7,5K131A wurde nach einer Spaltung mit SacI ebenfalls mit Klenow behandelt und mit BamHI nachgeschnitten. Dann wurde das Fragment in den Vektor einkloniert. Das entstandene Plasmid ist in Tab.4.5 schematisch dargestellt.

Bei diesem Konstrukt konnten die richtigen Bakterienkolonien mit Hilfe eines Restriktionenzymverdaus mit HindIII selektiert werden (zweite HindIII-Schnittstelle an Position 786 des p7,5K131A).

Tab.4.5: Schematische Darstellung des Vakziniaviruskonstruktes rVV-gH6HIS/3‘. Dieses Konstrukt enthält die vorderen 1783 Basenpaare des gH mit einem 6x HIS tag am 3' Ende in dem Vakziniavirusvektor p7,5k131A. Dargestellt ist die Multiple Cloning Site des P7,5k131A mit einkloniertem Konstrukt, die Lage der Restriktionsenzymschnittstellen und der 6xHis Markierung.

rVV-gH-6HIS/3´										
1704	1708	1714	**1720**	3503	aus pQE 18			**Klenow**		
BglII	PstI	SalI	**BamHI**	BglII	*6xHIS*	Stop	HindIII	**SacI/Xba**	SmaI	EcoRI

Erläuterung zur Tabelle 4.5: Hellgrau unterlegt das gH. In fetter Schrift die benutzten Restriktionsenzymschnittstellen.

4.3.2 Expression von gH in mit Vakziniavirus infizierten Zellen

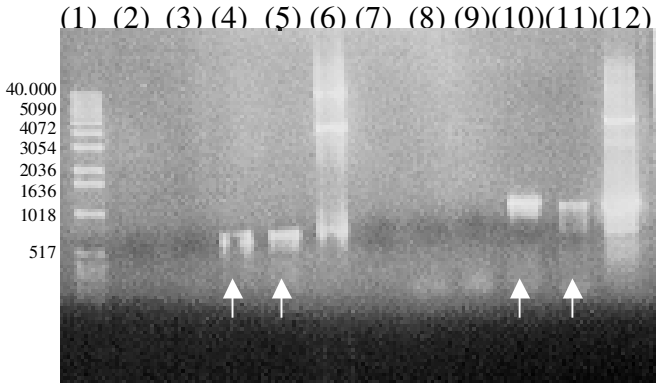
Bei der Vakziniavirusrekombination mit dem Plasmid p7,5K131A erfolgt die Rekombination im Thymidinkinasegen der Vakziniaviren. Im Plasmid p7,5K131A ist der ORF der Thymidinkinase durch den 7.5K-Promoter und das inserierte Fremdgen unterbrochen. Bei erfolgreicher Rekombination synthetisieren die entstehenden Vakziniavirusrekombinanten keine Thymidinkinase mehr, so daß die Rekombinanten gegenüber dem Virustatikum BUdR resistent werden. BUdR muß durch eine Thymidinkinase monophosphoryliert werden, um als Polymerasehemmer zu wirken. Somit ist eine Selektion der Rekombinanten durch BUdR möglich. Alle vier oben beschriebenen p7.5K-Konstrukte wurden in Vakziniaviren rekombiniert. Nach erfolgter Selektion wurden jeweils drei unabhängige Vakziniavirusklone isoliert und plaquegereinigt. Die rekombinanten Vakziniaviren und die Eigenschaften der erwarteten rekombinanten Proteine sind in Tab.4.6 zusammengefasst. Für die Berechnung des Molekulargewichts des Glykoproteins wurde die Benutzung von 9 der 15 potentiellen Glykosylierungsstellen in der Aminosäuresequenz des gH angenommen.

Tab.4.6: Überblick über in Vakziniavirus rekombinierten Konstrukte

Name	**Insert**	**Virustiter**	**MG des rekombinantes Proteins**	
			Theoretisch	Glykoprotein
rVV-gH	2200 Bp	$2x10^8$ /ml	81,3 kD	ca. 100 kD
rVV-gH6HIS	2346 Bp	$1,5x10^9$ /ml	82,8 kD	ca. 100 kD
rVV-gH6HISΔT5	2246 Bp	$8x10^8$ /ml	82,8 kD	ca. 100 kD
rVV-gH6HIS/3‘	1800 Bp	$2x10^8$ /ml	67,1 kD	ca. 85 kD

Abkürzungen: rVV = rekombinantes Vakziniavirus, MG = Molekulargewicht, ml = Milliliter, Bp = Basenpaare; kD= Kilodalton

Die rekombinanten Viren wurden zunächst mit Hilfe einer PCR auf die Anwesenheit des gH-Gens des HHV-8 überprüft. Diese zeigte, daß bei allen Konstrukten zwar nicht jede Rekombination erfolgreich war, aber immer mindestens eine. Hier zeigte sich eine Bande in der erwarteten Größe von 580 Bp, so daß man davon ausgehen konnte, daß die Rekombination zumindest teilweise erfolgreich war (Bsp. in Abb.4.14). Die Konstrukte rVV-gH, rVV-gH6HIS und rVV-gH6HISΔT5 wurden zudem teilweise sequenziert, um den Übergang von der Plasmidsequenz zur gH-Sequenz zu überprüfen. Dabei zeigte sich die korrekte Sequenz.



(1) DNA-Leiter
(2) Zellkontrolle mit uninfizierten Zellen
(3) rVV-gH6HISΔT5, Rekombinante 1
(4) rVV-gH6HISΔT5, Rekombinante 2
(5) rVV-gH6HISΔT5, Rekombinante 3
(6) DNA aus Maxipräp, rVV-gH6HISΔT5
(7) Leerwert (Probe ohne DNA)
(8) Zellkontrolle mit uninfizierten Zellen
(9) rVV-gH6HIS/3‘, Rekombinante 1
(10) rVV-gH6HIS/3‘, Rekombinante 2
(11) rVV-gH6HIS/3‘, Rekombinante 3
(12) DNA aus Maxipräp, rVV-gH-6HIS/3‘

Abb.4.14: PCR-Kontrolle der Vakziniavirusrekombinanten. Abgebildet sind verschiedene Rekombinanten der Konstrukte rVV-gH6HISΔT5 (Vakziniavektor mit gH und 6xHis ohne T1 Promotor) und rVV-gH6HIS/3‘ (Vakziniavektor mit gH und 6x His-tag am 3‘Ende). Die durchgeführte PCR ergibt ein ca. 580 Basenpaare langes DNA-Stück. Korrekte PCR- Banden sind mit Pfeilen markiert.

Nun wurde versucht, die Expression der rekombinanten Proteine nachzuweisen. Konfluente Zellen wurden mit den rekombinanten Viren infiziert und 24h inkubiert. Das Zellysat wurden wurde in Puffer aufgenommen und die Proteine durch Kochen oder Ultraschallbeschallung aufgeschlossen und gelöst.

Mit den rekombinierten Proteinen aus dem Konstrukt rVV-gH wurde ein erster ELISA durchgeführt, bei dem die Reaktionen gegen die Humanseren E1, P1/1, P3/1 und P6/1 in Verdünnungen von 1:10 bis zu 1:1280 getestet wurden. Hier war die Extinktion bei den Kontrollen höher als bei den HHV-8 positiven Patienten, so daß erst versucht wurde, die Konstrukte in Western-Blots zu untersuchen. Ein Beispiel für solch einen

Western-Blot findet sich in Abb.4.15. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedenster Western-Blots mit unterschiedlichen Bedingungen zeigt die Tab.4.7 auf der nächsten Seite. Es zeigte sich, daß weder mit den monoklonalen Antikörpern gegen den 6xHIS-tag noch mit Humanseren die rekombinanten Proteine nachweisbar waren. Dieses Ergebnis bestätigten auch die durchgeführten Immunfluoreszenztestungen mit den Konstrukten rVV-gH und rVV-gH6HIS. Hier diente Serum eines Patienten mit HIV-assoziiertem Kaposi-Sarkom als erster Antikörper, FITC-konjugierter Anti-Human Antikörper als zweiter Antikörper. Auch hier waren die rekombinanten Proteine nicht zu erkennen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es nicht gelang das gH des HHV-8 im Vakziniavirussystem zu exprimieren bzw. nachzuweisen, obwohl mit Hilfe verschiedener Konstrukte versucht wurde Einflüsse durch bakterielle Promotoren und/oder den 6xHIS-tag auszuschließen und obwohl die PCR und auch die Sequenzierung die passende Sequenz der Plasmide bestätigten.

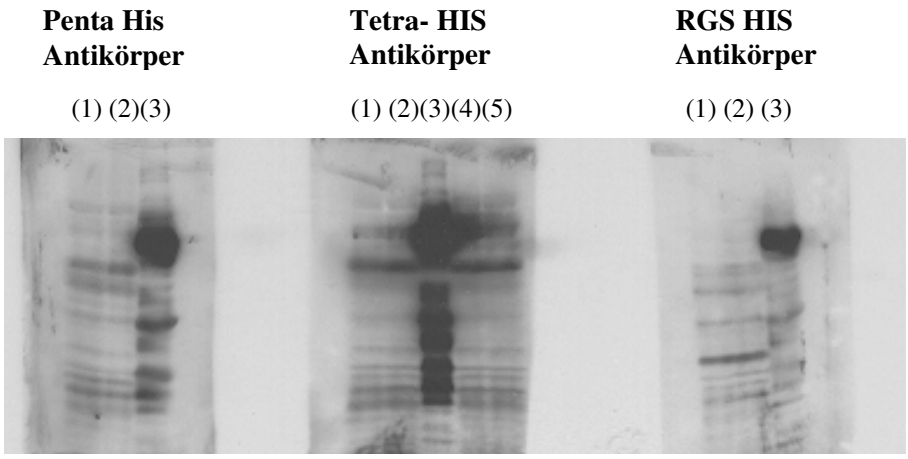


Abb.4.15: Testung verschiedener Anti-HIS tag-Antikörper mit einer Vakziniavirus-rekombinanten. Western-Blot auf Nitrozellulose nach Anleitung von QIAGEN; Rek. = Rekombinante; Kontrolle = mit 6xHIS tag markiertes rekombinantes Protein aus Laborbestand.

Tab.4.7: Statistik der mit den Vakziniarekombinanten durchgeführten Blots.
Alle Blots wurden mit dem Western-Blot Protokoll nach Anleitung des Herstellers QIAGEN durchgeführt und mit 3% BSA geblockt.

Datum	1. AK	V. 1.AK	2. AK	V. 2.AK	Sonstiges	Getestete Rekombinaten	Nummer	Ergebnisse
24.07.97	RGS, Tetra, Penta	1:2000	POD-Anti-Mouse-IgG	1:1000		T1-Negativkontrolle rVV-gH rVV-gH-6HIS	 R4 R1,R2	N N N,N
01.08.97	RGS, Tetra, Penta	1:2000	POD-Anti-Mouse-IgG	1:1000	TCA-gefälltes Zellysat	T1-Negativkontrolle rVV-gH-6HIS Positivkontrolle	 R1,R2,R3	N N,N,N S
14.08.97	Penta	1:2000	POD-Anti-Mouse-IgG	1:1000	TCA-gefällt, 6, 12, 24, 48 h Infektionszeit	T1-Negativkontrolle rVV-gH-6HIS	 R1,R2, R3	N fraglich
21.10.97	Penta	1:1500	POD-Anti-Mouse-IgG	1:1000		T1-Negativkontrolle rVV-gH-6HISΔT5	 R1,R2,R3	 N,N,N
27.10.97	Penta	1:1000	POD-Anti-Mouse IgG F‘ab-Fragment	1:2000	TCA-gefällt, 9% Gel	T1-Negativkontrolle rVV-gH rVV-gH-6HISΔT5 rVV-gH-6HIS/3‘ Positivkontrolle	 R5 R1,R2,R3 R1,R2,R3	N N N,N,N N,N,N fraglich
06.11.97	Penta	1:1000	POD-Anti-Mouse IgG F‘ab-Fragment	1:2000	Über Ni-NTA aufgereinigte Proteine 9% Gel	T1-Negativkontrolle rVV-gH-6HISΔT5 rVV-gH-6HIS/3‘	 R1,R2,R3 R1,R2,R3	zu klein ca. 60 kD
12.11.97	Penta	1:1000	POD-Anti-Mouse IgG F‘ab-Fragment	1:1500	Über Ni-NTA aufgereinigte Proteine 9% Gel	T1-Negativkontrolle rVV-gH rVV-gH-6HIS rVV-gH-6HISΔT5	 R1,R5 R1,R2,R3 R1,R2,R3	N N,N N,N,N N,N,N
18.11.97	Penta	1:150	POD-Anti-Mouse IgG F‘ab-Fragment	1:1500	0,5% Tween	T1-Negativkontrolle rVV-gH rVV-gH-6HISΔT5 rVV-gH-6HIS/3‘	 R1 R1,R2 R3	N N N,N N
18.11.97	Penta	1:150		1:1500	0,2% Tween			
18.11.97	ohne			1:1500	0.05% Tween			
18.11.97	ohne			1:1500	0,5% Tween			
25.11.97	E1; E2; P1/1 P3/1	1:100	POD-gekoppelter Anti-Human Antikörper (Jackson Immuno Research, Baltimore)	1:1000	Über Ni-NTA aufgereinigte Proteine; 9% Gel	T1-Negativkontrolle rVV-gH rVV-gH-6HIS rVV-gH-6HISΔT5 rVV-gH-6HIS/3‘	 R1 R1 R1,R2,R3 R1,R2,R3	Eine Bande bei allen Blots, auch bei den Kontrollen

Abkürzungen Tabelle 4.7 auf der vorhergehenden Seite: *AK = Antikörper; V = Verdünnung; RGS, Penta und Tetra sind Abkürzungen für die verschiedenen gegen den 6xHIS tag gerichteten Antikörper (QIAGEN, Hilden); TCA = Trichloressigsäure; R = Rekombinante; S = spezifische Bande sichtbar; N = negatives Ergebnis, keine spezifische Bande sichtbar; E und P sind die eingesetzten Humanseren, P steht für HHV-8 positiver Patient, E = erwachsene Kontrollperson.*

4.4 Sequenzierung des gH

Um die Sequenz der Plasmide und den Übergang vom Plasmid zum gH-Gen zu überprüfen, wurde eine Sequenzierung der Konstrukte durchgeführt. Sequenziert wurde das Konstrukt rVV-gH-6HIS der Vakziniavirusrekombinanten und das Konstrukt pQE30-gH der Bakterienkonstrukte. Beide Konstrukte sind Endprodukte nach einer Reihe von Umklonierungen. Das gesamte gH-Gen wurde sequenziert, um den Grad der Übereinstimmung zwischen der in der Literatur veröffentlichten DNA-Sequenz des gH mit dem in dieser Arbeit vorgestellten zu vergleichen und um mögliche Mutationen als Grund für die Nichtexpression durch rekombinante Vakziniaviren auszuschließen. Zur Sequenzierung wurde ca. alle 300-400 Basenpaare ein Primer eingesetzt, von dem aus dann sequenziert wurde (Abb.4.16).

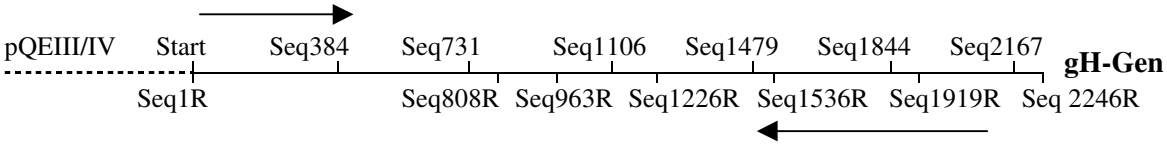


Abb.4.16: Sequenzierungstrategie. Schematische Darstellung mit der Lage der Primer und der Richtung der Sequenzierung. 1 cm entspricht ungefähr 200 Basenpaaren.

Bei der Analyse der Sequenzierung ließ sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem veröffentlichten und dem hier sequenzierten Code feststellen. Es wurden nur 2 Punktmutationen entdeckt, die aber keinen großen Einfluß auf die Proteinstruktur haben dürften. Die eine lag bei Basenpaar 647, hier wurde aus einem Adenin ein Guanin und deshalb aus der Aminosäure Leucin die Aminosäure Prolin. Die zweite lag bei Basenpaar 647, hier wurde aus Cytosin Thymin. Diese Mutation hat keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz.

Auch der Übergang vom Plasmid pQE30 zum gH-Gen war korrekt. Dies läßt Fehler in der DNA-Sequenz des gH als Ursache für die nicht erfolgte Expression des gH als unwahrscheinlich erscheinen.

4.5 Immunologische Charakterisierung des gH

Zur Entwicklung eines serologischen Testes mit dem gH-Protein des HHV-8 standen nach Abschluss der Expressionsversuche letztlich die in Bakterien exprimierten

Teilproteine des gH zur Verfügung, die in Abb.4.17 nochmals schematisch dargestellt sind.

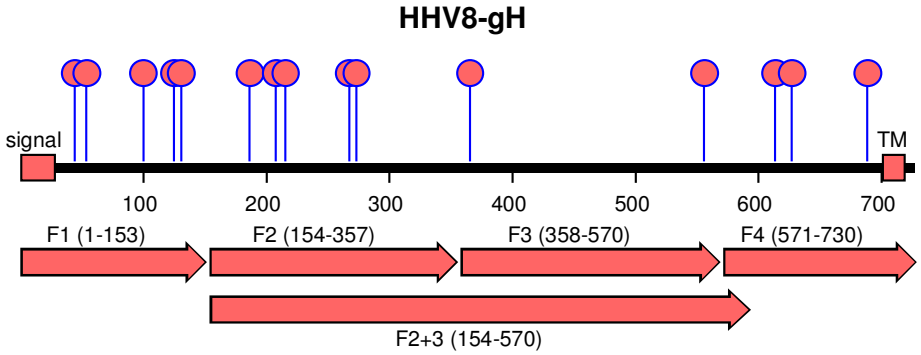


Abb.4.17: Schematische Darstellung der Teilproteine mit Lokalisierung möglicher Epitope für Antikörper. Die Zahlen geben die Länge in Aminosäuren an.

Zur Lokalisierung möglicher antigener Epitope wurde das gH-Protein zunächst mit Hilfe von Computerprogrammen auf Antigenitätsindizes und auf die Oberflächenwahrscheinlichkeit einzelner Peptide untersucht (Abb.4.17 und 4.18).

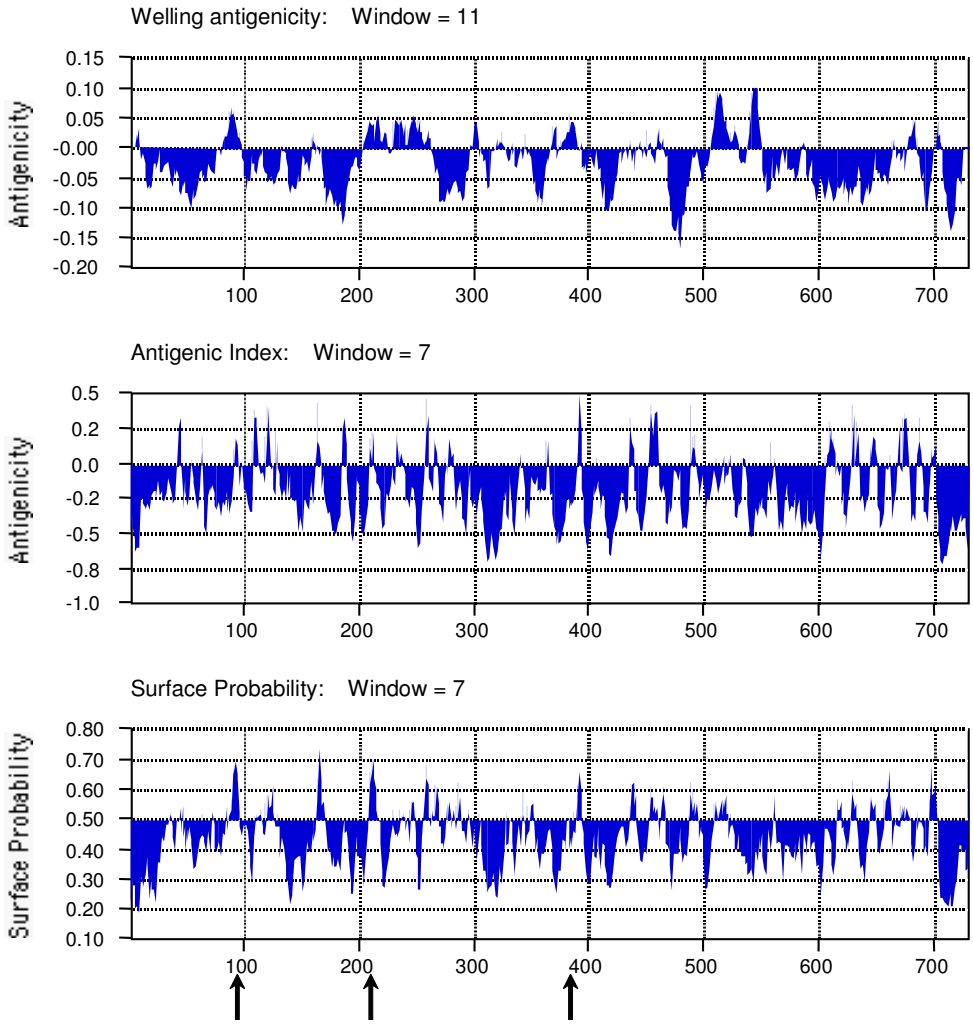
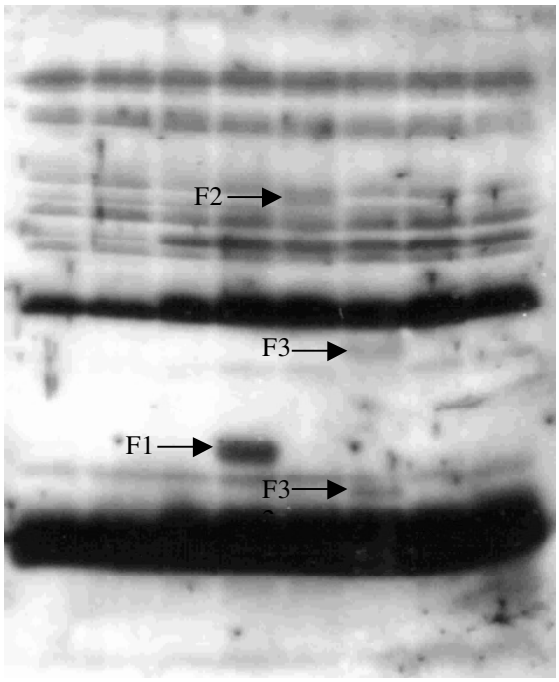


Abb.4.18: Abbildung der Oberflächenwahrscheinlichkeit der Epitope des gH. Die Regionen, bei denen gleichzeitig eine hohe Wahrscheinlichkeit für potenzielle Antigenität und für eine Oberflächenexposition gegeben ist, sind mit den Pfeilen markiert.

Regionen, in denen gleichzeitig eine hohe Wahrscheinlichkeit für potenzielle Antigenität und für Oberflächenexposition gegeben war, fanden sich in den Bereichen F1, F2 und F3. Um eine experimentelle Bestätigung für diese Vermutung zu erhalten, wurden die Teilproteine im Western-Blot mit einem Humanserum getestet, das von einem Patienten mit Kaposi-Sarkom stammte. Dieser Patient war in der diagnostischen PCR positiv auf HHV-8 getestet worden. Es konnte hier mit hoher Wahrscheinlicheit von der Anwesenheit HHV-8-spezifischer Antikörper ausgegangen werden (Abb.4.19).

(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)



(1) PQE uninduziert
(2) F1 Fragment uninduziert
(3) PQE induziert
(4) F1-Fragment induziert
(5) F2+3-Fragment induziert
(6) F2-Fragment induziert
(7) F3-Fragment induziert
(8) F4-Fragment induziert

Abb.4.19: Western-Blot mit den rekombinanten Proteinen und Serum eines Patienten mit Kaposi-Sarkom. Bakterienlysate 4 h induziert auf 15% SDS-Proteingel, 1. Antikörper Humanserum von Patient P1/2 1:100 verdünnt, 2. Antikörper Anti-Human IgG von Dako; Blot mit 1% Casein geblockt. Die Pfeile markieren spezifische Banden.

In diesem Versuch zeigte das Fragment F1 eine eindeutige Reaktivität, die Fragmente F2 und F2+3, auf denen ebenfalls antigene Epitope vermutet wurden, zeigten ein deutlich schwächere Reaktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Fragmente F1 und F2 zur Herstellung von Kaninchenseren verwendet. Die Kaninchenseren sollten bei einer systematische Analyse der Eignung von gH-Teilproteinen zur serologischen Diagnostik als Positivkontrolle dienen.

4.5.1 Reinigung von Teilproteinen des gH

Für die Herstellung von Antigen zur Immunisierung von Kaninchen, für Immunoblots und insbesondere für ELISAs mit Humanseren war es wichtig, die Proteine aufzureinigen, um unspezifische Reaktionen gegen E. coli Proteine zu vermeiden.

Zur Gewinnung von Protein für die Antikörperproduktion in Kaninchen wurden größere Mengen Bakterienlysat in SDS-Probenpuffer aufgenommen, über ein Proteingel getrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Gelstücke mit dem induzierten Protein wurden ausgeschnitten und über die Biotrap-Apparatur in Lösung gebracht. Die so aufreinigten Proteine wurden anschließend durch Coomassiefärbung und Western Blot überprüft (Abb.4.20).

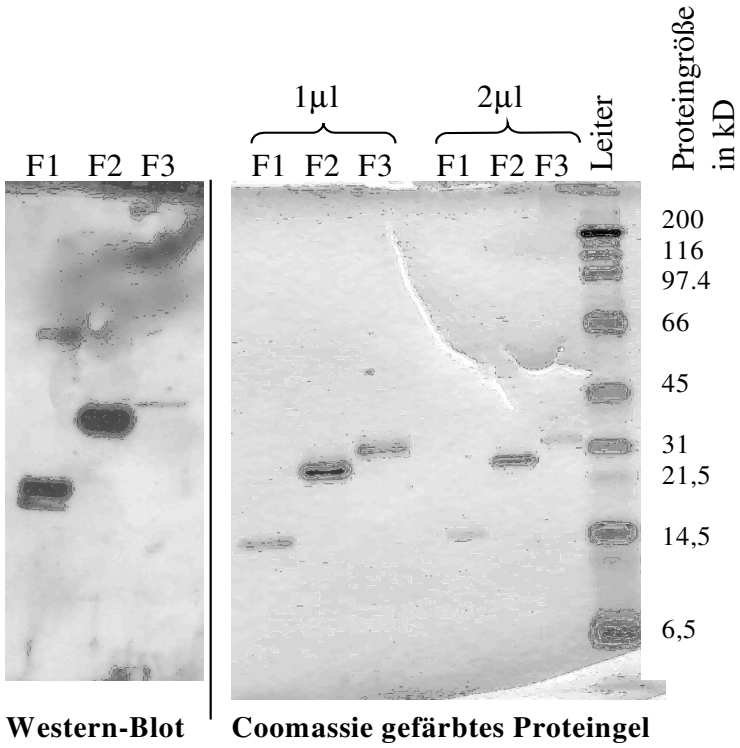


Abb.4.20: Kontrolle der durch Gelelution gereinigten Teilproteine des gH. Mit den Proteinfragmenten F1 und F2 wurden Kaninchen immunisiert. Western-Blot mit Anti-RGS Antikörpern nach Anleitung von Qiagen, Casein geblockt, 2. Antikörper Anti-Maus Antikörper.

Die Teilproteine F1 und F2 wurden so in ausreichender Reinheit gewonnen und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die hier verwendete Methode mit der Biotrap-Apparatur eignet sich allerdings nur für kleine Mengen an Protein und ist sehr aufwändig. Deshalb wurde eine Reinigung der Proteine über Ni-NTA Spin Columns etabliert. Die Aufreinigung erfolgt über eine Interaktion der Ni-Ionen in den vorgefertigten Säulchen der Firma QIAGEN mit dem 6x Histidin-Ende der Proteine. Da die gut exprimierten Proteine nicht in dem für die Ni-NTA Spin Columns vorgesehenen Puffern löslich waren, wurden Versuchsreihen mit verschiedenen Puffern und Detergentien durchgeführt.

Es wurden verschiedene Triton-Konzentrationen, SDS- und Mercaptoethanol-Zusätze und auch die Kombination dieser 3 Substanzen getestet. Der Ausgangspuffer war immer 6 M GuHCl, 0,1 M NaH_2PO_4, 0,01 M Tris pH 8,2. Alle diese Puffer waren nicht in der Lage, die Proteine in Lösung zu bringen.

Schließlich gelang es mit einem Lysozymverdau und starker Ultraschallbeschallung das Fragment F1 in Lösung zu bringen. Lysozym ist ein Enzym, das Bakterienwände aufspaltet. Damit konnte das Fragment F1 über die Ni-NTA Säulchen gereinigt werden. Das Elutionsprofil einer Ni-NTA-Säule ist in Abb.4.21 dargestellt.

Dieses Verfahren lieferte gut aufgereinigtes Protein in genügenden Mengen, das nun für weitere Versuche zur Verfügung stand.

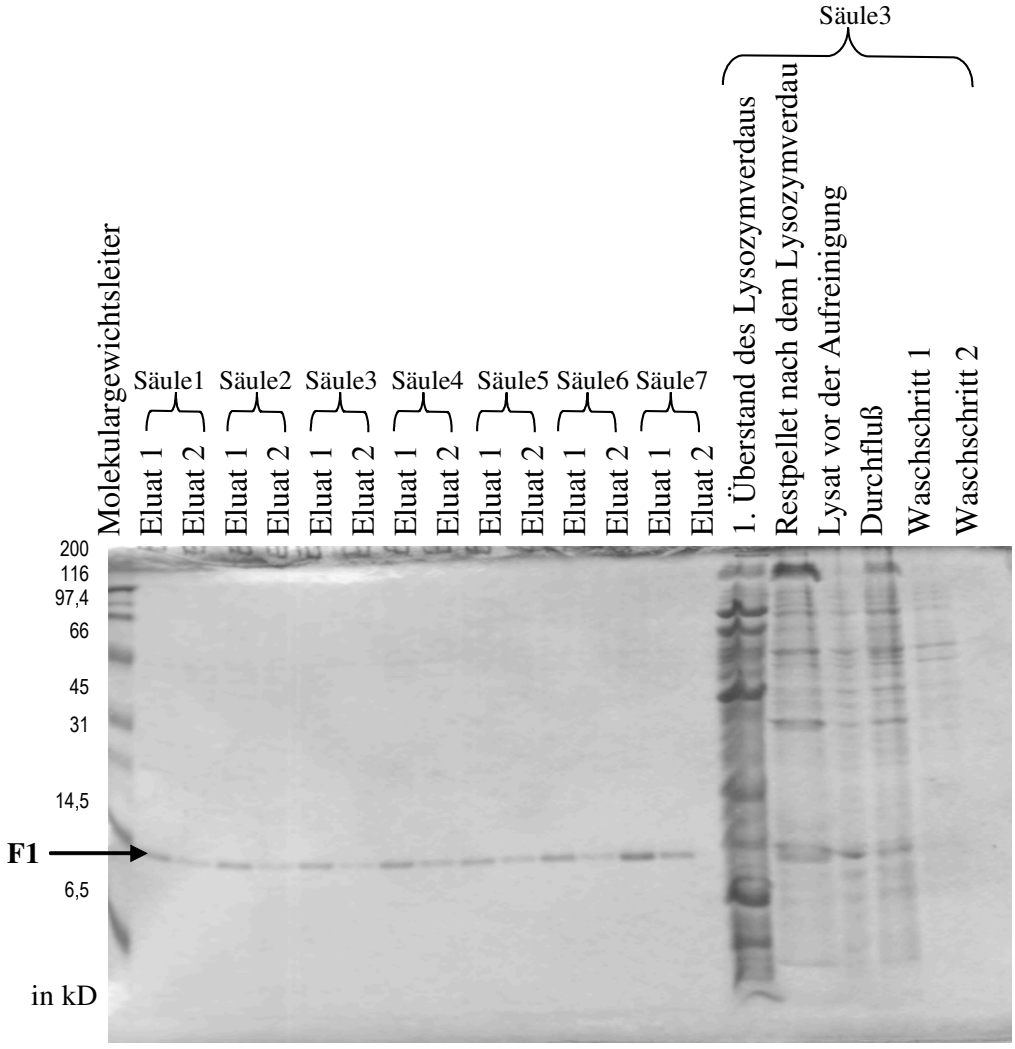


Abb.4.21: 15%iges Coomassie gefärbtes Proteingel zur Kontrolle der Aufreinigung des F1 Fragmentes über die Ni-NTA Säulchen der Firma Qiagen. Gewaschen wurde mit 20 mM Imidazol, eluiert mit 250 mM Imidazol.

4.5.2 Herstellung von Kaninchenantikörpern gegen das gH

Vor der Immunisierung der Kaninchen wurde mit 2,5 µl der Proteinaufbereitung eine semiquantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration vorgenommen. Eine Proteinbestimmung nach Bradford war wegen der nur sehr kleinen Menge an Protein nicht möglich. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die mit der Biotrap-Apparatur eluierten Proteine auf ein 15 % SDS-Proteingel aufgetragen. Zum Vergleich wurden definierte Mengen an Lysozym mit aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie gefärbt und die Banden miteinander verglichen. Es ergab sich für das B-E Fragment ein geschätzter Wert von 0,02 µg/µl, für das E-S Fragment ein Wert von 0,2 µg/µl. Um die Reaktivität des ausgeschnittenen und eluierten Proteins zu überprüfen, wurde zudem ein Western-Blot mit den Anti-RGS AK von QIAGEN durchgeführt, der ein klares und spezifisches Signal ergab.

Die Proteine wurden vor der Injektion in Kaninchen mit Adjuvans gemischt und den Kaninchen in je 2-wöchigen Abständen gespritzt. Nach 2 Boosterungen wurde das Serum gewonnen. Das Kaninchen, das Protein des Fragmentes F1 erhielt, produzierte im Western-Blot nachweisbare Antikörper, das mit dem Fragment F2 immunisierte Kaninchen dagegen nicht (Abb.4.22).

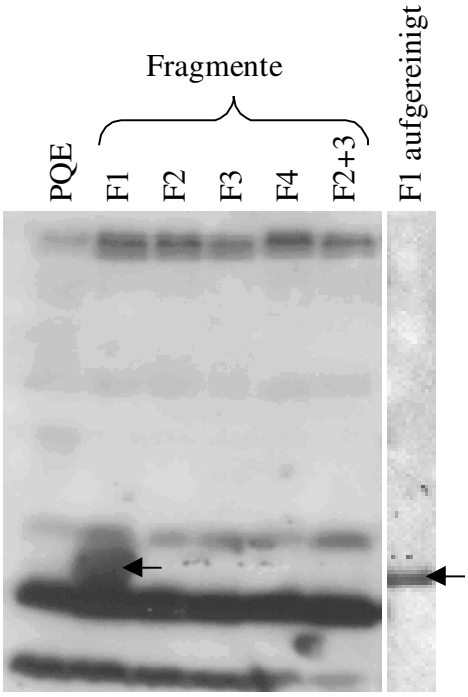


Abb.4.22: Western-Blot zur Kontrolle der in Kaninchen hergestellten Antikörper gegen das Fragment F1 des gH. Kaninchenserum 1:500 verdünnt, 2. Antikörper Anti-Kaninchen-IgG; Western-Blot nach Qiagen-Anleitung, 1% Casein geblockt, Waschpuffer mit 0,5% Triton.

Die Reaktion war spezifisch gegen das F1 Fragment gerichtet, eine Reaktivität des Antikörpers gegen den 6xHIS-tag konnte ausgeschlossen werden, da das Antiserum nicht mit den anderen, ebenfalls mit einem 6xHIS-tag versehenen, Teilproteinen des gH reagierte. Die Reaktivität des Antiserum war allerdings relativ niedrig, der Blot mußte lange exponiert werden um auf dem Film eine spezifische Schwärzung zu erreichen. Deshalb sind auch unspezifische Reaktionen zu sehen.

4.5.3 Reaktivität von gH-Teilproteinen im Western-Blot

In einem ersten Western-Blot mit Humanseren, bei dem das unaufgereinigte Bakterienpellet eingesetzt wurde, war die Reaktion gegen das Teilprotein F1 am stärksten ausgefallen (Abb.4.19). Zudem gelang es, gegen das gH-Protein F1 auch Kaninchenantikörper herzustellen.

Aus diesen Gründen konzentrierten sich die weiteren Versuche hauptsächlich auf dieses Fragment, welches die ersten 153 Aminosäuren des Gesamt-gH enthält.

Die unaufgereinigten Bakterienpellets und das aufgereinigte Fragment F1 wurden nun immunologisch im Western-Blot und ELISA charakterisiert. Die Reaktivität gegen HHV-8 positive Humanseren wurde mit Western-Blots und ELISAs überprüft. Alle 6 getesteten Patienten waren in der PCR positiv auf HHV-8 DNA getestet worden. Es lagen 11 Seren dieser 6 Patienten vor. Die Kontrollen stammten von Personen mit einem niedrigen Risiko für eine HHV-8 Infektion, 5 Kontrollseren waren von Kindern.

Bei diesen Western-Blots zeigte sich eine geringe Sensitivität und Spezifität der Humanseren gegen das F1-gH Fragment. Um eine Reaktion zu erhalten, mußten hohe Konzentrationen an Humanserum eingesetzt werden (1:100), was wiederum die Spezifität stark verminderte und ein hohes Maß an unspezifischen Reaktionen im Western-Blot verursachte. Mit Hilfe verschiedenener Wasch- und Blockpuffer wurde versucht, die Hintergründe zu reduzieren. Dies gelang aber nur unzufriedenstellend. Dabei wurden beim Waschpuffer Kochsalzkonzentrationen von 1-2 M und Triton-Konzentrationen von 0,5-2% systematisch ausgetestet. Außerdem wurden Versuchsreihen mit verschiedenen Blocksubstanzen (1% Casein, 3% Gelatine, 3% BSA, 10% Milchpulver) durchgeführt.

Als am besten geeignet mit dem höchsten Kontrast erwies sich das Waschen mit 1 M NaCl + 0,5% Triton und das Blocken mit 3% Milchpulver. Außerdem wurden noch Versuche mit einer PVDF-Membran als Alternative zur Nitrozellulose durchgeführt, was aber nur eine geringe Verbesserung des Kontrastes ergab (Abb.4.23 und 4.24).

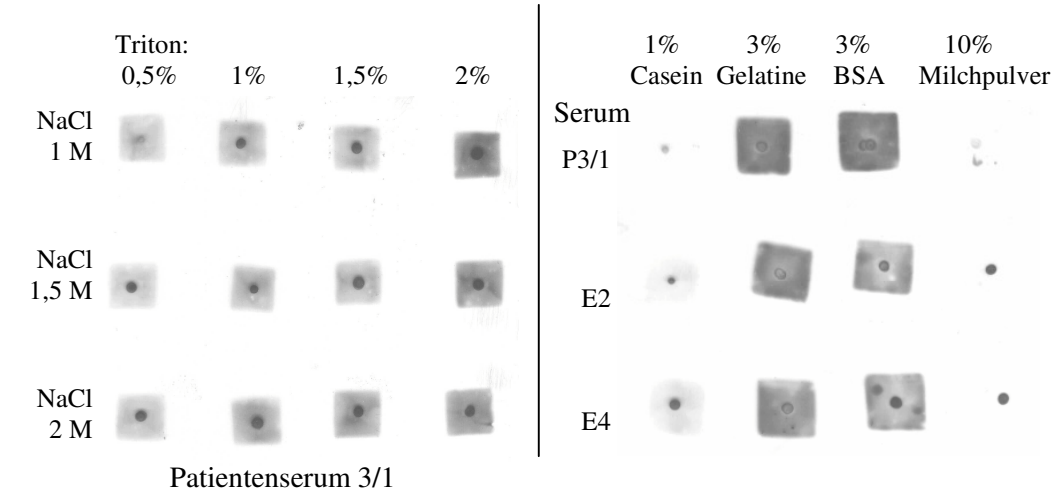


Abb 4.23: Austestung der Wasch- und Blocksubstanzen für den Western-Blot. 1. Antikörper Humanserum 1:100 verdünnt; 2. Antikörper Peroxidase-Conjugated F(ab')$_2$ Fragment of Rabbit Anti-Human IgG, Dako, Dänemark 1:500 verdünnt. Geblockt wurde links mit 1% Casein. Waschpuffer rechts: 1,5 M NaCl, 0,5 % Triton 20 mM Tris; pH 7,5.

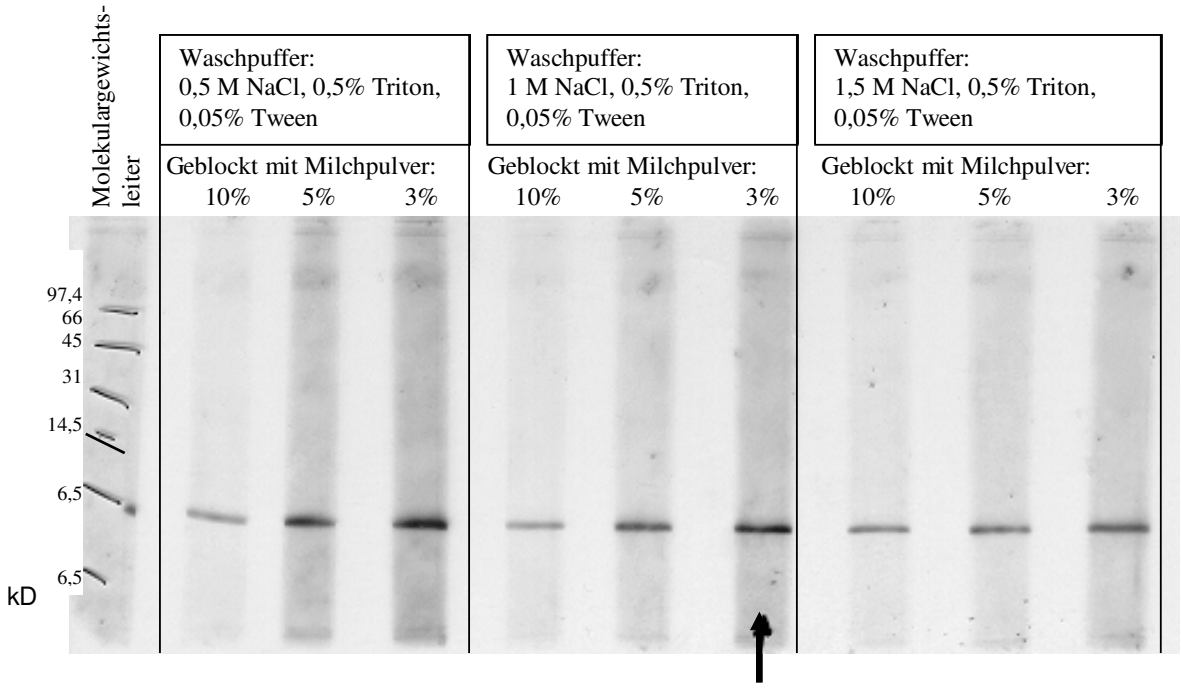


Abb.4.24: Western-Blot mit gereinigtem F1 Fragment zur Optimierung der Konditionen für den Western-Blot. Benutzt wurde eine Nitrozellulosemembran; Western-Blot nach Anleitung des Herstellers QIAGEN; 1. Antikörper Kaninchen-Antikörper gegen das B-E Fragment, 2. Antikörper 1:1500 verdünnter Anti-Kaninchen Antikörper; Pfeil: Markierung der ausgewählten optimalen Bedingungen; kD = Kilodalton.

Eine schematische Darstellung der verschiedenen ausgetesteten Bedingungen findet sich in Tab.4.8.

Tab.4.8: Systematische Aufstellung der durchgeführten Western-Blots mit Angabe der verschiedenen Konditionen.

Datum	Substanz	Wasch-puffer	Block-puffer	Membran	2.AK	Verdünnung 2.AK
04.02.98	Bakterien-lysat	0,5 M NaCl 0,2 %Triton, 0,05 %Tween	1% Casein	Nitro.	Anti-Human IgG Dako	1:1000
01.04.98	F1	0,5 M NaCl 0,2 %Triton, 0,05 %Tween	1% Casein	Nitro.	Anti-Human IgG Dako	1:1000
03.04.98	F1	0,5 M NaCl 0,5%Triton, 0,05%Tween	1% Casein	Nitro.	Anti-Human IgG Jackson	1:5000
19.05.98	F1	1,5 M NaCl, 0,5%Triton	10% Milch-pulver	Nitro.	Anti Human $F(ab')_2$ Dako	1:500
05.06.98	F1	1,5 M NaCl, 0,5%Triton	10% Milch-pulver	PVDF	Anti Human $F(ab')_2$ Dako	1:300
09.06.98	F1	0,5 M NaCl, 0,5%Triton, 0,05% Tween	1% Casein	PVDF	Anti Human $F(ab')_2$ Dako	1:300
19.06.98	F1	1 M NaCl, 0,5%Triton, 0,05% Tween	1% Casein	PVDF	Anti Human $F(ab')_2$ Dako	1:300
22.07.98	F1	1 M NaCl 0,5%Triton, 0,05% Tween	3% Milch-pulver	Nitro	Anti-Human IgG Jackson	1:1000
Grundpuffer für den Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5						

Erläuterungen zur Tabelle 4.8: *Verwendete 1. Antikörper: Humanseren 1:100 verdünnt oder spezifisches Kaninchenserum 1:500 verdünnt, 2. Antikörper: Anti-Human IgG Dako: Kaninchen-Anti-Human IgG, HRP-gekoppelt (Dako, Dänemark) oder Goat-Anti-Rabbit IgG, HRP-gekoppelt (Dako, Dänemark); Anti Human $F(ab')_2$ Dako: Peroxidase-Conjugated $F(ab')_2$ Fragment of Rabbit Anti-Human IgG (Dako, Dänemark); Anti-Human IgG Jackson: POD-gekoppelter Anti-Human Antikörper (Jackson Immuno Research, Baltimore, bezogen über Dianova, Hamburg).* ***Abkürzungen****: Nitro. = Nitrozellulosemembran; PVDF = PVDF Protein Sequencing Membrane (Biorad); NaCl = Kochsalz; F1 = über Ni-NTA-Spin Columns aufgereinigtes Protein des gH Fragmentes F1 (die vordersten 153 Aminosäuren des gH).*

Auch mit den optimierten Bedingungen ließen sich keine klaren Signale im Western-Blot abgrenzen. Die Unterschiede zwischen Patienten mit Kaposi-Sarkom und gesunden Kontrollpersonen ließen sich nicht sicher darstellen. Zum großen Teil waren Patienten, die sicher eine HHV-8 Infektion haben, negativ oder zumindest nur fraglich positiv oder

viele Kontrollen positiv. Die Ergebnisse ließen sich außerdem, wie aus Tabelle 4.9 ersichtlich, schlecht reproduzieren. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse der verschiedenen Western-Blots findet sich in Tab.4.9.

Tab.4.9: Auswertung der durchgeführten Western-Blots auf das F1 Fragment.

Datum	04.02.98	01.04.98	03.04.98	19.05.98	05.06.98	09.06.98	19.06.98	22.07.98
Seren								
E1	-	-	?	-				
E2	-	-	-			+?		?
E3				?	-	-		?
E4				-	-	+?		?
K1					+?	+	?	+
K2					-	+		-
K3								?
K4					-	+	+?	?
K5					-	-		?
P1/1	++	-	+			+		?
P1/2				?	-			
P2/1								?
P3/1	+	-	+	-		+		
P3/2								?
P4/1								?
P5/1				++	+	+	?	?
P6/1			++			-		?
Kanin.						+	++	++
Praek.							-	?
Ø 1. AK		-						-
RGS			++			+	-	

Abkürzungen: P = Seren von Patienten mit Kaposi-Sarkom; E = Seren von Erwachsenen ohne Kaposi-Sarkom und ohne HIV-Infektion; K = Kinderseren; Ø 1. AK= Western nur mit Zweiantikörper; Kanin. = Kaninchenserum gegen das F1 Fragment; Praek.. = Vor der Immunisierung gewonnenes Kaninchenserum; RGS= Anti-RGS-Antikörper von QIAGEN, Hilden.

Auswertung: + = *schwach positive Bande;*

++ = *deutlich positive Bande,*

− = *keine Bande;*

? = fraglich

Bei der Austestung im ELISA fiel auf, daß manche Patientenseren auch auf „leeren“ ELISAplatten, die nicht mit F1-gH-Protein beschichtet waren, eine sehr hohe Extinktion erreichten. Im Vergleich dazu war die Reaktion auf Platten mit Proteinbeschichtung nicht signifikant höher. Der 2. Antikörper alleine bewirkte allerdings kaum einen Hintergrund. Um die Spezifität des ELISAs zu erhöhen, wurden auch vorbeschichtete ELISA-Platten eingesetzt. Es wurden mit dem Ni-NTA-Konjungat (Ni-NTA His·Sorb Strips) oder einem gegen die Histidin-Markierung gerichteten Antikörper (Anti-His Antikörper·Strips) beschichtete Platten getestet (beide von QIAGEN, Hilden). Auch auf diesen Platten erreichten manche Seren „leer“, das heißt ohne vorherige Proteininkubation mit dem F1-gH-Fragment, eine hohe Extinktion. Mit verschiedenen Proteinkonzentrationen und verschiedenen Blockpuffern wie BSA und Casein wurde versucht, diesen Hintergrund zu minimieren. Das gelang allerdings kaum. Im ELISA wurden Verdünnungen der Seren von 1:20 bis 1:2560 eingesetzt. Eine sichere Unterscheidung zwischen Kontrollseren und Patienten war bei keiner dieser Verdünnungen möglich.

Damit ließ sich ein sensitiver und spezifischer diagnostischer Test auf das rekombinante gH des HHV-8 nicht etablieren.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, die DNA des gH-Proteins des Humanen Herpesvirus 8 zu amplifizieren und in verschiedene Expressionsvektoren zu klonieren. Die Expression des Gesamtproteins gelang weder im Bakteriensystem noch in mit rekombinantem Vakziniavirus infizierten Säugetierzellen. Die Sequenz des gH wurde durch eine Sequenzierung überprüft. Die Expression des gH gelang in Teilfragmenten im Bakteriensystem. Dabei konnten 5 Fragmente exprimiert werden, die zusammen die gesamte Sequenz des gH abdeckten. Das am besten zu reinigende und vermutlich auch immundominanteste Protein F1, das die ersten 153 Aminosäuren des gH enthält, wurde aufgereinigt und für eine immunologische Charakterisierung eingesetzt. Es wurde in Western-Blots und ELISAs getestet. Die Patienten hatten kaum Antikörper gegen dieses Protein. Bei der Immunisierung von Kaninchen erhielt man eine ausreichende Immunantwort gegen dieses F1-gH-Fragment.

5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Glykoprotein H des Humanen Herpesvirus 8 kloniert und auf seine Eignung als diagnostisch relevantes Antigen überprüft werden.

1994 entdeckte Yuan Chang ein neues Herpesvirus, das HHV-8 oder Kaposi Sarkom assoziierte Herpesvirus (KSHV) [Chang et al. 1994]. In den veröffentlichten Sequenzen des HHV-8 von Moore et al. und Russo et al. ist unter anderem die Sequenz des Glykoprotein H (gH) enthalten [Moore et al. 1996a; Russo et al. 1996].

Die Diagnostik des HHV-8 basierte 1996, als mit dieser Arbeit begonnen wurde, vor allem auf der PCR. Als Antigen für den Western-Blot oder einen ELISA standen kaum Proteine zur Verfügung. Um eine zuverlässige Aussage zur Verbreitung einer Infektionskrankheit machen zu können, ist die Messung der Seroprävalenz aber unabdingbar. Epidemiologische Untersuchungen sind allein mit der PCR nicht möglich, da mit dieser Methode nur Patienten mit aktiver Erkrankung und einer Viruslast erkannt werden können. Mit der Bestimmung von Antikörpern gegen einen Krankheitserreger im Serum können auch Patienten erfasst werden, die früher mit dem Krankheitserreger in Kontakt kamen und ihn bereits im Rahmen einer Immunantwort eliminiert haben oder Patienten, die eine latente Infektion haben mit einer sehr geringen Viruslast.

Glykoproteine spielen in allen bisher erforschten Herpesviren eine wichtige Rolle. Sie sind in die Hüllmembran eingelagert und an der Induktion einer schützenden Immunantwort beteiligt [Modrow & Falke 1998].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die Eignung des gH des HHV-8 als diagnostisch relevantes Antigen überprüft werden.

5.1 Expression des gH

Die Sequenz des gH liegt im ORF22 des HHV-8. Das Gen kodiert für 730 Aminosäuren [Moore et al 1996]. Nach Optimierung der Bedingungen gelang es im Rahmen dieser Arbeit, das gesamte Gen des gH des HHV-8 aus einem Lymphknotenbiopsat zu amplifizieren. Dazu wurde eine nested-PCR verwendet. Das PCR-Produkt wurde nach seiner Umklonierung sequenziert. Dabei ergab sich eine Übereinstimmung mit der von Russo et al. 1994 veröffentlichten Sequenz von 99,9%. Es wurden 2 Punktmutationen gefunden, von denen nur eine zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führte, bei dieser wurde aus Leucin Prolin. Auch in der Literatur finden sich bei der Analyse der DNA verschiedener HHV-8 Viren aus unterschiedlichen Populationen nur geringe Veränderungen im gH Gen [Kasolo et al. 1998; Meng et al. 1999]. Daraus läßt sich schließen, daß die Sequenz des gH, wie auch bei den anderen Herpesviren, im HHV-8

gut konserviert ist. Das gH würde sich deshalb gut für die Diagnostik der HHV-8 Infektion eignen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das gH in Bakterien und in Vakziniaviren rekombiniert werden. Die Rekombination in Vakziniaviren hat gegenüber der Rekombination in Bakterien den Vorteil, daß sie eine korrekte Glykosilierung eukaryontischer Proteine, eine weitere Modifikation und den Transport an die Oberfläche ermöglicht. Demgegenüber ist die Rekombination in Bakterien einfacher, schneller und ermöglicht es, große Mengen an rekombinantem Protein herzustellen.

Einige Konstrukte wurden mit einer Histidin-Markierung versehen. Diese Markierung mit einer Folge von sechsmal der Aminosäure Histidin (6xHIS-tag) ermöglicht eine Aufreinigung von Proteinen über eine Interaktion mit Nickelionen und den Nachweis der rekombinanten Proteine mit spezifischen Antikörpern.

Zur Rekombination in Vakziniaviren wurden die verschiedenen Konstrukte des Gesamt-gH in das Plasmid p7,5K131A kloniert. In Vakziniaviren wurden vier verschiedene Konstrukte des gesamten gH rekombiniert: ein gH-Protein ohne Markierung, ein gH mit 6xHis-tag und, um eine Interaktion mit dem Promoter oder dem 6xHis-tag auszuschließen, ein Konstrukt mit einem HIS-Tag am 3‘ Ende sowie ein Konstrukt ohne den Bakterienpromoter. Die PCR, die zur Überprüfung der Rekombination im Vakziniavirussystem durchgeführt wurde, zeigte die korrekten Banden an. Außerdem wurden einzelne Konstrukte sequenziert, um einen Fehler im Leseraster als Ursache für die nicht oder falsch erfolgte Translation auszuschließen. Der Übergang vom Promotor zur DNA-Sequenz erwies sich dabei als korrekt.

Zur Überprüfung der Expression dienten Proteinauftrennungen mit SDS-PAGE-Gelen, Western-Blots mit Humanseren und mit Antikörpern gegen den 6xHIS-tag sowie Immunfluoreszenztestungen mit Humanseren. In keinem dieser Systeme ließ sich eine Expression des gH nachweisen. Auch die TCA-Fällung zur Aufreinigung und Ankonzentration des Proteins machte eine Detektion des gH nicht möglich.

Außer dem gesamten Gen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Teilfragmente des gH in Bakterienvektoren kloniert (pQE-Plasmide (QIAGEN GmbH, Hilden)). Dazu wurde das gH-Gen in 4 Teilsequenzen kloniert (F1-F4), die zwischen 460 und 630 Basenpaare lang waren. Zusammen deckten diese Teile die gesamte Gensequenz des gH ab. Diese Teilfragmente wurden in Bakterien rekombiniert. Auf eine Rekombination in Vakzinia wurde verzichtet, da bei Teilproteinen nicht von einer Faltung und Glykosilierung, die der des Gesamtproteins entspricht, ausgegangen werden kann. Die Bakterienplasmide wurden alle mit Restriktionsenzymanalysen kontrolliert. Diese Analysen zeigten die

passenden Ergebnisse und lieferten geschnittene DNA-Stücke in der vorhergesagten Länge. Einzelne Konstrukte wurden zudem sequenziert. Hier zeigte sich der richtige Übergang vom Plasmid zum Virus und eine korrekte Sequenz des gH.

Es gelang, alle vier Teilfragmente des gH und zudem das aus den beiden mittleren Teilsequenzen bestehende Protein (F2+3) in Bakterien zu exprimieren. Die Expression der Proteine wurde mit Coomassie und Silbergelen sowie spezifisch im Western-Blot mit Anti-HIS-Tag-Antikörpern kontrolliert. Die Proteine konnten gut nachgewiesen werden und standen damit für die Aufreinigung und weitere Charakterisierung bereit.

5.2 Lösung und Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Bei der Aufreinigung der Teilproteine des gH zeigte sich eine schlechte Löslichkeit dieser Proteine. Sie lagen in der unlöslichen Fraktion im Bakterienpellet vor und ließen sich nur schwer und unter denaturierenden Konditionen in einem Puffer lösen. Nach umfangreichen Versuchen konnte eine Methode etabliert werden, die ermöglichte, das Protein des F1 Fragments in eine lösliche und damit aufreinigbare Form zu bringen. Das gelang mit Hilfe eines Lysozymverdaus, Ultraschallbeschallung und Lösung in 6M GuHCl. Diese Methode, die auch für andere schwerlösliche Proteine geeignet scheint, ermöglichte die gute Aufreinigung des Proteins F1 über Ni-NTA Säulen.

Auch in HSV-1 und EBV ist das gH vorwiegend in der unlöslichen Fraktion vorhanden. Beim HSV-1 kann eine lösliche Form des gH-gL Komplexes mit einer verkürzten Form des gH (gHt = Aminosäuren 1-792) in Säugetierzellen oder durch rekombinante Baculoviren auf Insektenzellen exprimiert werden. Aber auch hier sind gH und das verkürzte gHt vorwiegend in der unlöslichen Fraktion vorhanden [Peng et al. 1998; Westra et al. 1997]. Im EBV kann ebenfalls durch die Deletion von 27 Aminosäuren am carboxyterminalen Ende des Proteins eine Form des gH exprimiert werden, die in den Überstand abgegeben wird. Konformationsabhängige Antikörper erkennen dieses Protein. Ein Erklärungsansatz wäre, daß die deletierten Aminosäuren ein Signal enthalten, welches das Protein im endoplasmatischen Retikulum zurückbehält. Die Hauptmenge des synthetisierten rekombinanten gH wird auch in dieser Veröffentlichung in der unlöslichen Proteinfraktion gefunden [Pulford et al. 1995]. Diese Untersuchungen zeigen, daß auch die gH-Proteine anderer Herpesviren schwer löslich sind.

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode gelang es, genügend große Mengen Protein des F1 Fragmentes des gH (Aminosäuren 1-153) für die Charakterisierung als diagnostisch relevantes Antigen im Bakteriensystem herzustellen und aufzureinigen.

5.3 Immunologische Untersuchung des gH

Für die immunologische Charakterisierung des gH stand das in Teilproteinen exprimierte gH zur Verfügung. In einem Teilprojekt wurden Kaninchenantikörper hergestellt. Dafür wurden die Fragmente F1 (AA 1-153) und F2 (AA 154-357) benutzt. Diese wurden ausgewählt, weil sie im Western-Blot die beste Reaktion mit dem Humanserum eines HHV-8 positiven Patienten zeigten. Das mit dem Fragment F1 geimpfte Kaninchen bildete spezifische Antikörper. Diese waren bei einer Verdünnung des Kaninchenserums von 1:500 im Immunoblot nachweisbar. Im Serum des mit dem F2-Protein immunisierten Kaninchens ließen sich keine spezifischen Antikörper gegen das F2-Protein nachweisen. Dieses Ergebnis gibt einen ersten Hinweis darauf, daß das gH ein wenig immunogenes Protein sein könnte. Da das Fragment F1 seine Immunogenität bei der Herstellung von Kaninchenantikörpern bewiesen hatte und auch in einem ersten Blot mit Patientenseren spezifische Banden in der erwarteten Größe zeigte und sich zudem gut aufreinigen ließ, wurde die folgende Charakterisierung hauptsächlich mit diesem Teilprotein durchgeführt.

Umfangreiche Versuche mit Humanseren im ELISA und Western-Blot folgten. Dabei zeigte sich, daß gegen das denaturierte, aufgereinigte F1-Fragment nur wenig Antikörper vorhanden waren. Bei Patienten mit Kaposi-Sarkom ließen sich nicht zuverlässig spezifische Antikörper nachweisen und bei der Kontrollpopulation gab es unspezifische Reaktionen. Auch umfangreiche Versuche zur Optimierung der Blotbedingungen änderten an diesem Ergebnis nichts. Gegen das Bakterienlysat gab es eine schwache Reaktion bei einzelnen Patienten mit Kaposi-Sarkom.

Für diese Tests wurden Seren von sechs HIV positiven Patienten mit Kaposi-Sarkom verwendet. Bei diesen Patienten war in einer vorausgehenden Arbeit in den Biopsien aus Kaposi-Sarkomen HHV-8 DNA durch eine PCR nachgewiesen worden [Pranghofer 2002]. Als Negativkontrolle dienten in der vorliegenden Arbeit Seren von vier gesunden Spendern und fünf Seren von Kindern (0-3 Jahre alt), die aufgrund ihres Alters mit hoher Wahrscheinlichkeit noch nicht mit dem HHV-8 in Berührung gekommen waren.

Es wurde ebenfalls versucht, einen ELISA zu etablieren. Hier waren die unspezifischen Reaktionen so stark, daß keine Aussage zum Immunstatus möglich war.

5.4 Weshalb läßt sich das Gesamt-gH nicht exprimieren und warum ist das gH in Fragmenten kaum immunogen?

Auch in der Literatur finden sich Veröffentlichungen, bei denen es Schwierigkeiten mit der Expression des gH von anderen Herpesviren gab. So gelang es Qian et al. nicht, das

gesamte gH des HHV-6 in Bakterien zu exprimieren. Die Autoren vermuteten, daß die hydrophoben Regionen am N-terminalen und C-terminalen Ende mit der Expression von Fusionproteinen interagieren oder daß das unglykosilierte Produkt instabil ist und zerfällt. Sie konnten nur ein 454 Aminosäuren langes Protein aus der Mitte des Gens (AA 15-469) synthetisieren, aber nicht die beiden Endstücke [Qian et al. 1993]. Liu et al. und Takeda et al. dagegen gelang es, das gH des HHV-6 zu exprimieren, beide benutzten dabei ein Vakziniasystem [Takeda et al. 1997; Liu et al. 1993].
Auch Klupp et al. beschränkten sich beim Nachweis des gH des Pseudorabies Virus auf die mRNA Ebene [Klupp und Mettenleitner 1991; Klupp et al. 1999].
Gompels et al. konnten nicht permanent größere Mengen des gH des HSV-1 in einem System herstellen [Gompels und Minson 1989].

Für die fehlende Exprimierbarkeit des Gesamt-gH und die schwache Immunogenität der Fragmente des gH des HHV-8 im Rahmen dieser Arbeiten können verschiedene Gründe diskutiert werden.

These 1: Das gH braucht die Komplexbildung mit anderen viralen Proteinen, um richtig prozessiert zu werden und um eine Immunantwort auszulösen.

These 2: Das gH ist beim HHV-8 kein wichtiges Antigen.

These 3: Wichtige konformationsabhängige Epitope werden duch die Denaturierung und Aufreinigung des gH zerstört.

These 4: Die fehlende Glykosilierung der in Bakterien rekombinierten Proteine setzt die Immunogenität des gH herab.

These 1: Das gH braucht die Komplexbildung mit anderen viralen Proteinen, um richtig prozessiert zu werden und um eine Immunantwort auszulösen.

Ein Erklärungsansatz für die Nichtexpression des gH ist die Komplexbildung dieses Proteins in anderen Herpesviren. Es wäre möglich, daß das gH, wenn es nicht durch die Komplexbildung mit anderen viralen Proteinen geschützt wird, durch Proteasen abgebaut wird oder instabil ist und zerfällt.

Bei der Herstellung von rekombinantem Glykoprotein gH des Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) mit Hilfe von Rekombination in Vakziniaviren oder in einem induzierbaren Säugetiersystem fiel auf, das dieses nicht wie normal prozessiert und an die Zelloberfläche transportiert wurde, sondern sich im endoplasmatischen Retikulum anreicherte. Nicht alle monoklonalen Antikörper gegen das gH erkannten auch das rekombinante gH. Das rekombinante gH unterschied sich in der Größe, der Antigenität

und der Lokalisation in der Zelle vom „normalen“ gH. Wurde das induzierbare Säugetiersystem mit HSV superinfiziert, so entstand das „normale“ gH. Das läßt den Schluß zu, daß gH andere Virusprodukte für seine normale Modifikation und Weiterverarbeitung benötigt. Es wurde festgestellt, daß das gH einen Komplex mit dem Glykoprotein L (gL, ORF UL1) bildet und nur in der Anwesenheit dieses Proteins richtig prozessiert und transportiert wird [Foa-Tomasi et al. 1991; Forrester et al. 1991; Gompels und Minson 1989; Hutchinson et al. 1992; Roberts et al. 1991; Westra et al. 1997; Westra et al. 1999].
Auch zeigt es nur in der Komplexbildung mit gL eine normale Antigenität. Mit dem gH-gL Komplex läßt sich in Mäusen eine gute Immunantwort erzielen. Die mit dem Komplex immunisierten Mäuse produzieren bei T. Peng gute Titer virus-neutralisierender Antikörper und eine Impfung mit gH-gL schützt Mäuse vor der zosteriformen Ausbreitung einer HSV-1 Infektion [Peng et al. 1998]. Zu einem etwas anderen Schluß kommt die Arbeitsgruppe um H. Browne. Sie findet selbst bei Induktion im Komplex mit gL für gH nur niedrige Level von Antikörpern. Der Komplex schützt bei ihnen auch nur mäßig vor einer HSV-1-Infektion [Browne et al. 1993].

Für das Epstein-Barr-Virus gilt ähnliches. Wird gp85, das gH-Analogon, allein exprimiert, wird es nicht richtig prozessiert und nicht an die Zelloberfläche transportiert. Es verläßt wahrscheinlich nicht das endoplasmatische Retikulum und wird nicht über den Golgiapparat glykosiliert und an die Zelloberfläche gebracht. Ein Effekt der Vakziniaviren ist unwahrscheinlich, da andere Glykoproteine normal exprimiert werden. Im EBV ist eine Komplexbildung des gH-Analogon gp85 mit dem Genprodukt des ORF BKRF2 nötig, um eine normale Expression zu gewährleisten. Bei Koexpression von gp85 und BKRF2 wird gp85 an die Zelloberfläche transportiert. An dieser Komplexbildung ist auch noch ein drittes Protein beteiligt, das gp42 (BZLF2). Dieses gp42 ist notwendig, um Lymphozyten zu infizieren. Es bindet an HLA Klasse II an der Oberfläche von B-Lymphozyten. Zur Infektion von epithelialen Zellen wird es nicht benötigt. Wahrscheinlich bildet das Protein gp42 nicht immer einen Bestandteil des gp85-BKRF2 (gH-gL)-Komplexes [Yaswen et al. 1993; Pulford et al. 1995; Wang et al. 1998].
Auch beim Glykoprotein H des Zytomegalievirus (HCMV) besteht eine Diskrepanz zwischen in Vakziniavirus rekombiniertem gH und dem "normalen" gH. Die rekombinante Form reichert sich hauptsächlich in der Kernhülle an und konnte an der Zelloberfläche nicht nachgewiesen werden, während sich die "normale" Form in Kernmembranen und zytoplasmatischen Membranen befindet. Das gH des HCMV

bildet einen Komplex mit gL, dem Produkt des UL115 Gens. Im Komplex wird gH normal verarbeitet und an die Zelloberfläche transportiert [Kaye et al 1992]. L. Li fand 1997 ein drittes Protein als Bestandteil des CIII-Komplexes. Dieser Komplex bildet einen wichtigen Teil der Virushülle des HCMV [Li et al. 1997].

Auch im Varizella-Zoster-Virus (VZV) bildet sich ein nicht kovalenter gH/gL-Komplex. Die Interaktion der Proteine im VZV ist erforderlich für die vollständige Prozessierung des gH und für seinen Transport an die Zelloberfläche. Die Koinfektion mit rekombinanten Vakziniaviren für gH und gL führte zu einer ausgereiften Form des gH, das an die Zelloberfläche transportiert wird. Die Impfung von Mäusen mit gH oder gL allein führte zu keinem Schutz vor einer Infektion. Dagegen führte die Impfung mit beiden Glykoproteinen zu einer Reduktion der infektiösen Partikel, also zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern [Nemecková et al. 1996; Forghani et al. 1994].

Das gH von HHV-6 bildet ebenfalls einen Verbund, den gp100 Komplex, mit einem gL-Äquivalent und gQ, dem Produkt des U100 Gens. Dieser Komplex spielt vermutlich eine wichtige Rolle beim Eindringen des Virus in die Wirtszelle. Auch hier wurden neutralisierende Antikörper entdeckt, allerdings auch nicht auf die rekombinanten Proteine [Takeda et al. 1997; Liu et al. 1993; Mori et al 2003].

In all diesen Herpesviren bildet das gH einen Komplex mit einem oder mehreren viralen Proteinen. Nur in der Komplexform wird es richtig prozessiert und an die Oberfläche transportiert. Dieses könnte durchaus auch für das HHV-8 gelten.

Im Jahr 2002 veröffentlichten Naranatt et al. eine Charakterisierung der Glykoproteine gH und gL des HHV-8. Ihnen gelang es, das gH als GST-Fusionsprotein und als einzelnes Protein zu exprimieren und mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Sie zeigten, daß das gH auch im HHV-8 eine Komplexbildung mit dem gL-Analogon benötigt, um korrekt prozessiert und an der Zelloberfläche exprimiert zu werden. Damit bestätigen sie in ihrem Artikel die Hypothese, daß das gH auch im HHV-8 einen Komplex bildet. Naranatt et al. benutzten für ihre Experimente ein gH-GST-Fusionsprotein und ein gH Protein ohne Markierung. Das von ihnen entdeckte gL-Analogon wird durch den ORF 47 kodiert und zeigt kaum Ähnlichkeit mit dem gL anderer Herpesviren, nur mit den eng verwandten Herpesviren der γ-2 Gruppe. Hier besteht eine Übereinstimmung von 30%, vorzugsweise im Bereich der Cystein-Bausteine. Das exprimierte gH zeigt eine Größe von ca. 80 kD, welche sich bei Glykosilierung auf 120 kD vergrößert. Das Protein konnte mit den entsprechenden Antikörpern auf der Oberfläche infizierter Zellen nachgewiesen werden. Zusammen mit gL bildet es einenVerbund und ist ein Bestandteil der Virushülle. Im HHV-8 sind gH

und gL nicht durch Disulfid-Brücken verbunden. Ohne das gL wird das gH nicht vom endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat transportiert und damit auch nicht ausgeschleust und korrekt prozessiert. Mit Antikörpern gegen das gH und das gL ließ sich die Infektiosität des HHV-8 senken. Bei der Zugabe beider Antikörper ergab sich ein additiver Effekt auf die Hemmung der Infektiosität [Naranatt et al. 2002].

P. E. Pertel exprimierte die Glykoproteine gH und gL in CHO-Zellen (Ovarzellen des chinesischen Hamsters) und benutzte sie zur Fusionsanalyse mit verschiedenen Empfängerzellen. Er konnte seine Proteine mit einem Antikörper gegen den gH/gL-Komplex nachweisen. Sein gH-Protein hat eine Größe von 120 kD. Versuche mit dem rekombinanten gH und gL, bei denen eine Beteiligung der Glykoproteine bei der Fusionierung von Zellen nachgewiesen werden konnte, lassen eine Beteiligung des gH/gL Komplexes beim Viruseintritt in die Zelle vermuten [Pertel P.E. 2002].

In all diesen Herpesviren bildet das gH einen Komplex mit einem oder mehreren viralen Proteinen. In vielen Viren induziert nur die Komplexform eine gute Antikörperbildung. Eine Übersicht über die humanpathogenen Herpesviren und ihre Komplexbildung gibt die folgende Tabelle:

Tab. 5.1: Vergleich der gH-Proteine verschiedener Herpesviren.

Glykoprotein H (gH)				Eigenschaften			Homologie		
Virus	Typ	ORF	Name	AS	MW	N-Gly	Identität	Ähnlichkeit	Komplex mit
HHV-8	γ	22	gH	730	81,3	15	100 %	--	gL
EBV	γ	BXLF2	gp85	706	78,3	5	25 %	19 %	BKLF2 + gp42
HSV-1	α	UL22	gH	837	90,2	8	21 %	14 %	gL
VZV	α	37	gH	841	93,6	10	19 %	14 %	gL
HCMV	β	UL75	gH	743	84,5	6	20 %	17 %	gL (UL115)
HHV-6	β	U48	gH	694	79,6	14	19%	21 %	gL
HHV-7	β	U48	gH	690	80,5	11	18 %	20 %	gL

Abkürzungen: HHV 8 = Humanes Herpesvirus 8, EBV = Epstein-Barr-Virus, HSV-1 = Herpes-simplex-Virus Typ I, VZV = Varizella-Zoster-Virus, HCMV = Humanes Zytomegalievirus, HHV 6 = Humanes Herpesvirus 6, HHV 7 = Humanes Herpesvirus 7, ORF= Open Reading Frame, AS = Aminosäuren, MW = Molekulargewicht in Kilodalton, N-Gly = potentielle Glykosilierungsstellen, g = Glykoprotein.

Die Expression des Gesamt-gH des HHV-8 war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich und das rekombinante Teilprotein war nur gering immunogen. Eine mögliche Ursache könnte sein, daß das gH auch beim HHV-8 einen Komplex bildet. Vielleicht wäre das gL-Analogon von HHV-8 notwendig, um den gH/gL Komplex als Antigen zu nutzen. Zum Zeitpunkt des experimentellen Teils dieser Arbeit war das gL Analogon des

HHV-8 noch nicht bekannt und eine Koexpression mit dem gH nicht möglich. Vielleicht würde es mit einer Doppelinfektion mit einem rekombinanten gL-Vakziniavirus und den in dieser Arbeit veröffentlichten gH-Vakziniarekombinanten gelingen, das gH korrekt zu exprimieren und mit Antikörpern nachzuweisen.

These 2: Das gH ist beim HHV-8 kein wichtiges Antigen.

Bei den anderen Herpesviren ist die Rolle des gH bereits besser erforscht. Aber auch hier finden sich in der Literatur Angaben, nach denen das gH kein Hauptantigen darstellt. So erzeugte beim HSV-1 in Vakzinia rekombiniertes gH keine neutralisierende Antikörperantwort [Blacklaws et al. 1990]. Bei Peng et al. führte die Immunisierung mit dem gH des HSV-1 alleine ebenfalls zu keiner oder zu geringer Bildung neutralisierender Antikörper [Peng et al. 1998]. Forrester et al. gelang es nicht, mit im Vakziniavirussystem rekombiniertem gH eine protektive Immunantwort in Mäusen zu erzielen. Dagegen schützen monoklonale Antikörper gegen das gH Mäuse vor der zosteriformen Ausbreitung einer HSV-1 Infektion [Forrester et al. 1991].

Beim HCMV werden in der Literatur sehr unterschiedliche Daten zur Seroprävalenz und Immunogenität des gH gefunden. So finden Rasmussen et al. nur in ca. 10% immunkompetenter HCMV-Patienten Antikörper gegen das gH. Sie benutzten für ihre Immunoblots gereinigte Proteine aus einer HCMV-infizierten Zelllinie. Für die Immunopräzipitation verwendeten sie eine verkürzte Form des gH, rekombiniert in CHO-Zellen. Sie fanden Antikörper gegen das gH vor allem bei chronisch rezidivierenden Infektionen mit HCMV [Rasmussen et al. 1997]. Dagegen beschrieben Urban et al. das gH als wichtiges Antigen für die neutralisierende humorale Immunantwort. Diese Arbeitsgruppe benutzte in Baculoviren rekombiniertes gH. Dieses wurde im Unterschied zu dem in Vakziniaviren rekombiniertem gH an die Zelloberfläche transportiert. Sie fanden in 96% der HCMV Patienten Antikörper gegen das gH, unter denaturierenden Bedingungen allerdings nur bei 38%. Daraus schließen sie auf einen Konformationswechsel in wichtigen Regionen des gH-Gens abhängig von der Nachweismethode, der zu einem Verlust von wichtigen Antigenbindungsstellen führt. Die durchschnittliche neutralisierende Kapazität von gH beträgt in diesen Versuchen 29% [Urban et al. 1996]. Auch die Gruppe von Martin P. Cranage konnte eine Neutralisierung der Infektiosität des HCMV mit Antikörpern gegen das gH nachweisen [Cranage et al. 1988].

Naranatt et al. machen in ihrer Charakterisierung des gH des HHV-8 keine Aussagen zur Seroprävalenz gH-spezifischer Antikörper. Aber es gelang ihnen mit Kaninchen-Antikörpern gegen das gH die Infektiosität des HHV-8 zu beeinträchtigten [Naranatt et

al. 2002]. Das läßt vermuten, daß das gH eine wichtige Rolle bei der Infektion von Zellen spielt. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch P. E. Pertel. Ihm gelang es mit rekombinanten Glykoproteinen des HHV-8, unter ihnen auch gH und gL, eine Fusionierung von Zellen zur erreichen. Die Anzahl fusionierender Zellen war am höchsten, wenn die Proteine gH und gL sowie eine Mutante des gB Proteins zusammen exprimiert wurden. Das spricht für eine Rolle des gH beim Viruseintritt in Zellen [Pertel 2002].

Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist nicht viel über die Mengen des in der Virenhülle enthaltenen gH bekannt. Chandran et al. untersuchten Antikörperantworten anhand der Reaktivität von Patientenseren auf HHV-8 infizierte Zelllinien. Er identifizierte 12 ORFs, die für immunreaktive Proteine kodieren. Davon waren zwar einige Glykoproteine, so zum Beispiel das Glykoprotein B, kodiert durch den ORF 8, und ein bisher unbekanntes Glykoprotein, kodiert durch den ORF K8.1. Eine Beteiligung des gH an der Antikörperantwort konnte aber nicht nachgewiesen werden [Chandran et al. 1998].

Vielleicht spielt das gH aber eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Immunantwort. 2001 veröffentlichten Wang et al. eine Arbeit, in der sie rekombinant mit Vakziniaviren hergestelltes gH zur Stimulation von T-Zellen verwendeten. Dabei fand sich eine Stimulation spezifischer T-Zellen bei einer HHV-8-Infektion um etwa den Faktor 4. Zur Stimulation von T-Zellen sind aber nicht unbedingt vollständige Proteine erforderlich, es genügen bereits Bruchstücke und Peptide und auch die Konformation spielt keine große Rolle. So gelang der Arbeitsgruppe um Fabiola Micheletti eine Stimulation von zytotoxischen T-Lymphozyten auch mit synthetisch hergestellten Peptiden aus dem gH-Gen [Micheletti et al. 2002].

Das von Qiong Wang hergestellte gH hatte eine Proteingröße von 74 kD. Nach den Berechnungen dieser Arbeit ergibt sich für das glykosilierte gH eine Gesamtgröße von etwa 100 kD. Es könnte sein, daß das von Wang benutzte gH nicht vollständig ist oder nicht glykosiliert und transformiert wurde. Das von Wang et al. hergestellte gH wurde mit Antikörpern nachgewiesen, die durch eine Immunisierung von Kaninchen mit dem rekombinanten Protein hergestellt wurden. Leider gibt es keine Aussagen zur Reaktivität dieser Proteine mit HHV-8 positiven Humanseren. Eventuell könnte sich mit diesem Antikörper auch das von uns im Vakziniavirussystem rekombinierte gH nachweisen lassen. Um diese Ergebnisse richtig zu interpretieren, müßte bekannt sein, wie die in dieser Arbeit hergestellten Teilproteine des gH mit diesem Antikörper reagieren und wie das von Wang produzierte gH mit den von uns getesteten Seren reagiert. [Wang et al. 2001].

These 3: Wichtige konformationsabhängige Epitope werden duch die Zerlegung des Proteins in Teilfragmente und durch die Denaturierung und Aufreinigung der Fragmente des gH zerstört.

These 4: Die fehlende Glykosilierung der in Bakterien rekombinierten Proteine vermindert die Immunogenität.

Da diese beiden Thesen sehr ähnliche Erklärungen für die schwache Immunogenität der gH-Teilfragmente haben, sollen sie hier gemeinsam diskutiert werden. Beiden liegt eine Konformationsänderung des gH entweder durch die Zerlegung in Teilfragmente oder duch die fehlende Glykosilierung im Bakteriensystem zugrunde. Zudem waren für die Aufreinigung der Proteine der Teilfragmente stark denaturierende Maßnahmen nötig. All das kann durch Veränderung der Konformation oder durch das Fehlen von Antigenbindungsstellen zu einer verminderten Immunogenität führen.

Auch für diese Thesen gibt es Hinweise in der Literatur. So erkennen zum Beispiel monoklonale Antikörper gegen das gH des HSV-1 Konformationsepitope nur unter nicht denaturierenden Bedingungen [Browne et al. 1993]. Urban et al. finden in 96% der HCMV Patienten Antikörper gegen gH, unter denaturierenden Konditionen allerdings nur bei 38%. Daraus schließt er auf einen Konformationswechsel in wichtigen Regionen des gH-Gens abhängig von der Nachweismethode, der zu einem Verlust von wichtigen Antigenbindungsstellen führt [Urban et al. 1996]. Auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführen Versuchen wurde eine bessere Immunantwort mit unaufgereinigtem Bakterienlysat erreicht. Hier stören aber natürlich die Kreuzreaktionen gegen die E. coli Bakterien. Wenn es möglich wäre, die Teilproteine unter nicht denaturierenden Konditionen aufzureinigen, könnte das zu einer deutlich besseren Immunantwort führen. Dies gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht.

Fazit

Zur Expression des Gesamt-gH und zur Immunogenität von Fragmenten des gH des HHV-8 läßt sich aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sagen, daß

1. das gH sich in seiner Gesamtlänge weder im Vakziniavirussystem noch im Bakteriensystem exprimieren ließ.
2. das gH des HHV-8 zumindest in dieser Form kein immundominantes Antigen darstellt und sein Einsatz als diagnostisches Antigen zumindest fraglich erscheint.

Eventuell liegt der Grund für die Nichtexpression an der fehlenden Komplexbildung in diesem System. Vielleicht wäre das gH im Komplex mit gL exprimierbar und ein

besseres Antigen. Es wäre möglich, daß nur der Komplex gH/gL richtig verarbeitet und prozessiert wird und nur dann eine Rolle bei der Immunantwort spielt.

5.5 Die Diagnostik der HHV-8 Infektion

Zur Diagnostik der HHV-8 Infektion wurden seit der Entdeckung des Virus verschiedene Tests entwickelt. Am weitesten verbreitet ist bis heute der Immunfluoreszenz-Test (IFT) mit HHV-8 infizierten Zellen. Dazu wurden mehrere Zelllinien aus lymphoblastoiden B-Zellen etabliert, die mit HHV-8 infiziert sind. BC-1, HBL6 und BCBL-2 enthalten HHV-8 und EBV [Cesarman et al. 1995; Renne et al.1996; Moore et al. 1996], BCBL-1 und BCP-1 Zellen enthalten nur HHV-8 [Renne et al. 1996; Gao et al. 1996 a+b]. Fast alle diese Zelllinien stammen aus Lymphomen der Körperhöhlen (Body Cavity-Based Lymphomas = BCBL), nur BCP-1 wurde aus peripheren Blutzellen eines BCBL-Patienten isoliert.

Die BCBL-1 Zellen lassen sich durch Induktion mit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) von einem latenten in einen lytischen Zyklus überführen. In ihnen konnte das Virus auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden [Renne et al. 1996].

Bei den meisten dieser Tests wurden die Antikörper auf HHV-8 im Immunfluoreszenztest direkt auf infizierten Zellen nachgewiesen. Einige Autoren benutzten aus den Zellen aufgereinigte Proteine, um Antikörper im Immunoblot nachzuweisen. Bei diesen Tests erreichen Patienten mit Kaposi-Sarkom eine Seropositivität von 67-100%. Die Prozentzahlen liegen höher, bei 93-100%, wenn latente und lytische Antigene in einem Test kombiniert werden (nur latente Antigene: 67-90%). Aber auch bei diesen Verfahren gibt es Sensitivitäts- und Spezifitätsprobleme. Das zeigt sich an den relativ stark differierenden Zahlen. Vor allem in Gruppen mit sehr niedriger Durchseuchung kann das zu größeren Abweichungen vom tatsächlichen Durchseuchungsgrad führen. Dementsprechend vorsichtig müssen die Zahlen zur Seroprävalenz des HHV-8 in der Normalbevölkerung interpretiert werden. Dukers und Rezza veröffentlichten 2003 eine Zusammenfassung zur Epidemiologie des HHV-8, in der sie zu dem Schluß kamen, daß mit den derzeit verfügbaren Tests noch keine optimale Lösung gefunden ist [Dukers und Rezza 2003].

Die meisten Immunfluorezenztestungen erfolgten in den USA. Je nach Kollektiv und Testmethode bewegen sich hier die Zahlen für die Seroprävalenz in der Normalbevölkerung zwischen 0-19%. Fasst man die Daten zusammen erhält, man eine wahrscheinliche Durchseuchung von 0-6% der Bevölkerung [Chandran et al. 1998a; Gao et al. 1996a; Gao et al. 1996b; Kedes et al. 1996; Lennette et al. 1996; Martro et al. 2004; Simpson et al. 1996; Smith et al. 1997; Zhu et al. 1999]. Bei HIV-positiven

Männern liegen die Zahlen deutlich höher, in San Francisco bei ca. 48% [Martin et al. 1998], bei HIV-positiven Soldaten bei etwa 32% [Crum et al. 2003]. Für HIV-positive Frauen entsprechen die Zahlen eher denen der Normalbevölkerung mit ca. 4% [Kedes et al. 1997]. Bei den Kaposi-Sarkom Patienten sind zwischen 67-100% positiv. Aus den starken Abweichungen läßt sich schon erkennen, daß es hier doch noch starke Schwankungen in der Zuverlässigkeit der Testmethoden gibt. Einer der größten veröffentlichten Tests ist der von Pellett et al. In diesem Test wurden die Seren von 1000 Blutspendern aus den USA mit verschiedenen Testmethoden in 6 verschiedenen Laboren ausgewertet. Von allen Proben war nur 1 Spender bei allen 6 Laboren positiv, 893 waren bei allen Laboren negativ. Wenn man diejenigen Patienten als positiv bewertet, die in mind. 2 Laboren positiv getestet wurden, kommt man auf eine Seroprävalenz von 3.3% [Pellett et al. 2003]. Bei Caspar et al. wurde bei den nicht sicher einstufbaren Seren ein Bestätigungstest durchgeführt. Sie kamen auf eine Seroprävalenz von etwa 3% [Caspar et al. 2002]. Bei Hudnall et al. zeigte sich je nach Verdünnung der Seren eine Seroprävalenz von 5-23%. [Hudnall et al. 2003] An diesen Beispielen wird deutlich, daß noch kein wirklich standardisierter Test für die Diagnostik des HHV-8-Infektion zur Verfügung steht. Viel hängt davon ab, ob latente oder lytische Antigene verwendet werden und welche Serumverdünnung einsetzt wird.

Bei den zuverlässigsten Testmethoden bewegen sich die Zahlen um die 3% für die Normalbevölkerung in den USA.

Für Asien liegen bisher nur wenig Daten vor. In Japan sind nur etwa 0.2% der Bevölkerung positiv auf HHV-8. Allerdings erfolgten die Testungen von Fujii et al. mit dem weniger sensitiven latenten Testsystem [Fujii et al. 1999]. Für Südostasien liegen die Zahlen bei ca. 4% der Normalbevölkerung, trotz der hohen Durchseuchung mit HIV [Ablashi et al. 1999].

Die Daten zur Seroprävalenz in Mitteleuropa zeigen ebenfalls eine sehr niedrige Durchseuchung von unter 5% [Martro et al. 2004; Simpson et al. 1996; Suchanovka et al. 2003]. Im Mittelmeerraum liegt die Seroprävalenz deutlich höher, bei ca. 17.6%, hier kommt das Kaposi-Sarkom auch endemisch vor. In Italien liegt die Durchseuchung bei etwa bei 4-19%, in Malta, gemessen mit dem Immunfluorezenztest, bei 16% [Cattani et al. 2003; Engels et al. 2000; Gao et al. 1996b; Masini et al. 2000; Serraino et al. 2002; Serraino et al. 2003].

Ähnliche Daten liegen auch für Südamerika vor. Hier liegen die meisten Länder bei unter 5% [Ferreira et al. 2003; Perez et al. 2004; Souza et al. 2004]. Nur in Bevölkerungsgruppen mit einem hohen Anteil an Personen afrikanischer Abstammung

ist hier der Prozentsatz höher, z.B. 22.9% in Tobago, 11.8% in Französisch-Guyana [Hoffmann et al. 2004; Plancoulaine et al. 2002].

In Afrika liegt die Seroprävalenz sehr viel höher. So sind im Kongo und in Botswana ungefähr 76% der Bevölkerung seropositiv, auch in Zambia, Uganda, Kamerun und Ägypten ist etwa die Hälfte der Bevölkerung Antikörper-positiv auf HHV-8. In Nigeria sind es schon bei den Kindern 14% [Ablashi et al. 1999; Engels et al. 2000; Gao et al. 1996b; Lennette et al. 1998; Martro et al. 2004; Olsen et al. 1998; Serraino et al. 2002]. Das läßt eine ausschließlich sexuelle Übertragung als unwahrscheinlich erscheinen.

Beim systematischen Vergleich fallen starke Schwankungen in den veröffentlichten Zahlen auf. Caspar fasst die Problematik recht gut zusammen. *Zitat nach Caspar: "Die Entwicklung von guten serologischen Test auf HHV 8 ist erschwert von einer Vielzahl von Faktoren, z.B. weil die viralen Proteine, die dafür verwendet werden, erst unvollständig charakterisiert sind, weil gut definierte Positiv- und Negativkontrollen fehlen und weil die Prävalenz einer HHV-8 Infektion einer großen demographischen und geographischen Streuung unterliegt" [Caspar et al. 2002].*

Zudem ist der Immunfluoreszenztest nicht optimal standardisierbar, da die Auswertung mit dem Mikroskop erfolgt und deshalb auch eine deutliche Abhängigkeit vom jeweiligen Untersucher zeigt.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die oben erwähnten Publikationen mit ihren Ergebnissen:

Tab. 5.2: Immunfluoreszenztestungen auf HHV-8:
Verzeichnis einiger veröffentlichter Tests

Autor	**Jahr**	**Test**	**Zelltyp**	**KS+ HIV+**		**KS- HIV+**		**KS- HIV-**		**Land**
				ges.	**pos.%**	**ges.**	**pos.%**	**ges.**	**pos.%**	
Caspar	2002	ELISA + IFT	Whole Virus	92	88%			192	3%	USA
Cattani	2003	IFT	BC3 lytic					1083	17.6%	Mittelmeer-region
Chandran	1998a	IFT	BCBL-1 lytic and latent	44	93-98%	47	34-60%	120	3-8%	USA
Crum	2003	Whole Virus lytic IgG ELISA				342	32%			USA
Delorme	2003	Whole Virus lytic IgG ELISA+ORF 73 ELISA			92%			150	0%	Kanada

Engels	2000	IFT EIA	BCP-1 latent K8.1 und ORF 65					637 200	76% 16%	Kongo, Botswana Malta
Ferreira	2003	IFT	BCP-1 lytic und latent					400	4%	Brasilien
Fujii	1999	IFT	BCBL-1 latent	10	90%	276	11,5%	1000	0,2%	Japan
Gao	1996a	IFT + Western	BC-1 p 226 und 234	40	80%	60	12%	122	0%	USA
Gao	1996b	IFT	BCP-1 latent und LANA Immunoblot	84	85%	95	32%	276	10%	USA,Italien und Uganda
Hladik	2203	IFT ORF 65 + K8.1 ELISA	BCBL lytic	72	63%			203	39%	Uganda
Hudnall	2003	IFT	BCBL-1 lytic					100	5-23%	Texas, USA
Kedes	1996	IFT	BCBL-1 latent (LANA)			523	30%	100	1%	USA
Lennette	1996	IFT	BCBL-1 lytic and latent	119	97%	140	14-69%	188	0-26%	USA und Afrika
Martin	1998	IFT	BCBL-1 latent			396	47,4%	393	8.7%	USA, San Francisco, Männer
Martro	2004	IFT	lytic				Gesamt	971 787 184	4-14% 5% 14%	Kinder auf USA, BRD, Nigeria
Masini	2000	IFT	BC3 lytic					248	16%	Italien
Miller	1996	IFT + Western	BC-1 p 40	48	67%	54	13%			USA
Olsen	1998	IFT	BCP-1 latent + ORF 65 Elisa	3	100%	211Seren (18.5% HIV+) 58% pos auf HHV 8 keine Abhängigkeit vom HIV-Status				Zambia
Pellett	2003	IFT + andere Tests im Vergleich						1000	3.5%	USA, Blutspender
Perez	2004	IFT	BCBL-1 lytic	57	100%			2470	3.7%	Argentinien, Brasilien, Chile

Plancoulaine	2002	IFT	Kommerziell lytic					1819	11.8%	Französisch-Guyana
Serraino	2002	IFT	BCBL-1 lytic und latent					315	44.8%	Uganda
								236	42.4%	Ägypten
								293	50.5%	Kamerun
						424	39.9%	134	18.7%	Italien
Serraino	2003	IFT	BCBL-1 lytic					200	7.5%	Italien
Simpson	1996	IFT	BCP-1 latent	103	81,5%	112	11,6%	267	1,5%	USA, UK, Uganda; Griechenland
Smith	1997	IFT	BCBL-1 lytic und latent	7	100%	18	33%	52	0%	USA
Souza	2004	IFT	BCBL-1 lytic und latent	78	98.7%	130	39.2%	643	2.5%	Brasilien Kinder
Spira	2000	IFT	BCBL-1 lytic	30	97%	25	64%	20	10%	USA
		IFT	" latent		83%		20%		10%	
		EIA	BC-lytic (käuflich)		80%		16%		0%	
Suchanovka	2003	IFT	BCP-1 lytic und latent			129	34.9%	666	2.4%	Tschechien
Zhu	1999	IFT	BCBL-1 lytic und latent	104	84-99%	77	56-78%	84	8-12%	USA

Erläuterungen zur Tabelle 5.2: *Erste Spalte: Erstautor; zweite Spalte: Jahr der Veröffentlichung; dritte Spalte: verwendeter Test; vierte Spalte: verwendeter Zelltyp bzw. Protein; letzte Spalte: Herkunft der Untersuchungspopulation.* ***Abkürzungen:*** *ges. =Gesamtzahl getesteter Proben; pos. = Prozentzahl der positiven Proben (in %); KS+(-) = Patienten mit (ohne) Kaposi-Sarkom, HIV+(-) = HIV positive (negative) Patienten, UK= Großbritannien. IFT = Immunfluoreszenz-test, EIA = Enzym-Immunassay, ELISA = Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest, ORF = Open Reading Frame*

Seit der Entdeckung des Human Herpesvirus 8 im Jahre 1994 wurden viele Proteine des HHV-8 auf ihre diagnostischen Eigenschaften hin untersucht. Folgend ein Überblick über die bisher rekombinant hergestellten Proteine:

- **ORF 65 – Kapsid Protein** [Angeloni et al. 1998; Katano et al. 2000; Lang et al. 1999; Lin et al. 1997; Mayama et al. 1998; Pau et al. 1998; Regamey et al. 1998; Renwick et al. 1998; Simpson et al. 1996; Tedeschi et al. 1999 ; Zhu et al. 1999]
- **ORF 59 – DNA Replication Protein** [Katano et al. 1999b; Katano et al. 2000].
- **ORF 26 – Kapsid Protein** [André et al. 1997; Davis et al. 1997].

- **ORF 52 - schlechte Reaktivität** [Simpson et al. 1996; Lang et al. 1999].
- **ORF K8.1 – Glykoprotein** [Chandran et al. 1998b; Katano et al. 2000; Lang et al. 1999; Raab et al. 1998; Zhu et al. 1999, Juhasz et al. 2001].
- **ORF 25 – Major Capsid Protein (Hauptkapsidprotein) ⇒ Kreuzreaktivität mit EBV** [André et al. 1997].
- **ORF 73 – Immediate Early Protein** [Katano et al. 2000; Renwick et al. 1998; Zhu et al. 1999]
- **K12 – Kaposin** [Lang et al. 1999]

Bei Tests mit diesen rekombinanten Proteinen ergibt sich eine Seroprävalenz von 30-100% bei Patienten mit Kaposi-Sarkom. In der Normalbevölkerung der USA sind 0-20% positiv auf HHV-8. Schon an der großen Abweichung dieser Prozentzahlen läßt sich die meist mangelnde Eignung dieser serologischen Tests erkennen. Als diagnostisch wertvolle Proteine sind vor allem das Glykoprotein K8.1 und das Kapsidprotein (ORF65) für diagnostische Tests geeignet, wie Zhu et al. im direkten Vergleich feststellten [Zhu et al. 1999]. Von all den Tests mit rekombinanten Proteinen zeigt nur der nach Abschluß des experimentellen Teils dieser Doktorarbeit im April 2000 veröffentlichte Test von Katano et al. eine nachweislich gute Sensitivität. Dabei wurde ein Mix von 5 rekombinanten Proteinen verwendet.

Das zeigt auch die Veröffentlichung von Corchero et al. Sie untersuchten die verschiedenen Proteine und IFTs im direkten Vergleich: *ORF 73 Elisa und IFT,* **ORF K8.1 Elisa und IFT, ORF 65 IFT** (alle Semliki forest virus system exprimiert), käuflicher **Whole Virions ELISA**, *latent IFT* und **lytic IFT** (BCBL-1), *ORF 73 ELISA* (Bakteriell exprimiert), **ORF K.8.1 Oligopeptid-ELISA**, **ORF 65 Oligopeptid ELISA** (Die kursiv gedruckten Tests sind mit latenten Antigenen durchgeführt, die fett gedruckten mit lytischen).

ORF 65 zeigte sich mit nur 41% Sensitivität als ungeeignet, auf gB reagierten 52% der Seren von Kaposi-Sarkom Patienten und 60% der Gesunden, so daß dieser Test nicht spezifisch ist. Bei den latenten Testsystemen wurden nur Sensitiviäten von 50-64% gefunden, so daß diese Tests nur sehr unsichere Aussagen zulassen. Von den rekombinanten Tests war nur der K8.1 IFT eine gute Alternative zum IFT mit induzierten Zellen (Sensitivität von 94.4 und 96.6%, alle anderen Tests unter 90%). Die IFTs zeigten sich insgesamt den ELISAs in der Sensitivität überlegen [Corchero et al. 2001].

Ähnliche Ergebnisse veröffentlichten auch Spira et al. Sie verglichen einen IFT mit induzierten Zellen (lytic) mit einem ORF K8.1 Peptid EIA, einem ORF 65 Peptid EIA,

einem IFT mit nicht induzierten Zellen, dem käuflichen EIA mit aufgereinigten Virionen (Advanced Biotechnologies,Inc., Columbia) und einem ORF65 Immunoblot Assay. Die höchste Sensitivität erreichte der IFT mit induzierten Zellen (97%), die anderen Tests lagen mit einer Sensitivität von 80-87% deutlich darunter [Spira et al. 2000].

Hier zeigen sich deutlich die bisherigen Schwierigkeiten mit rekombinanten Tests, so daß bis heute der Immunfluoreszenztest mit HHV-8 infizierten Zellen, trotz der aufwändigen Methode, die gebräuchlichste Untersuchung ist und von den meisten Autoren für serologische Tests verwendet wird (Siehe Tab.5.2).

Zu diesem Schluß kommt auch Rabkin bei einem Vergleich von 7 verschiedenen Tests zur Seroprävalenz des HHV-8. Er bestätigt zwar 6 von 7 Tests eine Eignung zur Erhebung von epidemiologischen Daten, aber keiner der Tests ist seiner Ansicht nach spezifisch und sensitiv genug für die serologische Diagnostik der HHV-8 Infektion [Rabkin et al. 1998]. Daher ist die Forschung immer noch auf der Suche nach einem sensitiven und spezifischen Antigen für das HHV-8.

Eine Übersicht über veröffentlichte Tests mit rekombinanten Proteinen gibt die folgende Tabelle:

Tab.5.3: Verzeichnis veröffentlichter Tests mit Proteinen des HHV-8.

Erst-autor	Jahr	Test	ORF	Länge in AA	ges. KS+	pos HIV+	ges. KS-	pos. HIV+	ges. Gesunde	Pos.	Land
André	1997	ELISA	26 25	305 ? 1376 ?	69	30% Kreuzreakivität mit EBV	30		106	3%	BRD
Chandran	1998b	Western	K8.1A K8.1B	228 167	62	97% nicht getestet	38	61%	120	8%	USA
Chatlynne	1998	Gesamtvirus-ELISA			134	92,5%	43	26%	91	11%	USA
Davis	1997	ELISA	26	18	35	60%	33	27%	30	20%	USA
Juhász	2001	ELISA	K8.1	155			10	80%	180	2,8%	Ungarn
Katano	1999a	Western	59	247	22	32%			263	2%	Japan
Katano	2000	ELISA mit Mix aus 5 Proteinen	K 8.1 59 65 73 N 73 C	137 247 172 257 208	24	100%	2	100%	1004	1,4%	Japan
Lang	1999	Western	52 65 K8.1 K12	132 170 168 60	7	29% 71% 71% 29%					BRD
		ELISA	52 65 K8.1 K12	132 170 168 60	49	37% 37% 67% 6%			135	6% 3% 4% 3%	
Lin	1997	Western	65	170	47	89%	54	20%	28	11%	
Pau	1998	ELISA	65	14	20	90%	20	20%	20	0%	USA

Raab	1998	Western	K8.1	228	19	90%					BRD
Regamey	1998	ELISA	65.2	76	26	92%	87	24%	178	7%	Schweiz
Simpson	1996	Western	65	76	92	84%	82	8,5%	291	3%	USA, UK. Uganda; Greek
			65	589	nicht getestet						
			52	170	Keine Reaktivität						
Spira	2000	EIA	K8.1	Peptid	30	87%	25	28%	20	0%	USA
		EIA	65	Peptid	30	87%	25	32%	20	0%	
		Western	65	88	30	80%	25	52%	20	5%	
Tedeschi	1999	ELISA	65	20	44	50%			534	1%	Schweden, Gesunde nur Frauen
Zhu	1999	Western	73	1162	104	89%	77	60%	84	10%	USA,
			65	170		95%		73%		13%	Homo-
			K8.1A	228		93%		69%		11%	sexuelle
			K8.1B	167		94%		60%		8%	

Erläuterungen zur Tabelle 5.3: *Erste Spalte: Erstautor; zweite Spalte: Jahr der Veröffentlichung; dritte Spalte: verwendeter Test; vierte Spalte: ORF, der für das verwendete Protein kodiert; fünfte Spalte: Länge des Proteins in Aminosäuren; letzte Spalte: Herkunft der Untersuchungspopulation.* ***Abkürzungen:*** *ges. = Gesamtzahl getesteter Proben; pos. = Prozentzahl der positiven Proben (in %); KS+(-) = Patienten mit (ohne) Kaposi-Sarkom, HIV+(-) = HIV positive (negative) Patienten; AA = Aminosäuren; EIA = Enzym-Immunassay, ELISA = Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest; IFT = Immunfluoreszenztest; Western = Testung im Western-Blot Verfahren; ORF = Open Reading Frame, UK= Großbritannien.*

Bis heute ist die serologische Detektion einer Infektion mit HHV-8 schwierig. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, daß ein Mix aus mehreren Proteinen benötigt wird, um einen Test mit einer ausreichenden Sensitivität und Spezifität zu entwickeln, um sich auch zum Screening größerer Bevölkerungsgruppen zu eignen.

Wie dargelegt, scheint auch das gH des HHV-8 kein geeignetes Protein für die serologische Diagnostik der HHV-8 Infektion zu sein. Zur Immunogenität des gH des HHV-8 läßt sich aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sagen, daß das gH des HHV-8 zumindest in dieser Form kein immundominantes Antigen darstellt und sein Einsatz als diagnostisches Antigen zumindest fraglich erscheint. Eventuell wäre das gH im Komplex mit gL ein besseres Antigen. Bisher gibt es dazu aber in den Veröffentlichungen keine Daten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die Klonierung des Glykoprotein H (gH) des humanen Herpesvirus 8 (HHV-8), seine Expression und die Überprüfung seiner Eignung als diagnostisch relevantes Antigen. Das HHV-8 ist ein erst 1994 entdecktes humanpathogenes Herpesvirus.

6.1 Klonierung und Expression des gH

Das 2200 Basenpaare lange Glykoprotein H (gH)-Gen des humanen Herpesvirus 8 (HHV-8) konnte mit Hilfe einer doppelten Polymerase-Ketten Reaktion (nested-PCR) vollständig amplifiziert werden. Dieses Gen wurde durch verschiedene Umklonierungsschritte in prokaryontische und eukaryontische Expressionsvektoren kloniert.

Dabei sollte einerseits das Gesamtgen in Vakziniaviren exprimiert werden. Dieses eukaryontische System hat den Vorteil, das mit ihm die Expression glykosilierter Proteine möglich ist. Dazu wurden verschiedene Konstrukte angefertigt, die teilweise eine Markierung mit einem 6x Histidin Peptid enthielten. Dieses Polypeptid ermöglicht durch seine Interaktion mit Nickel-Ionen eine spätere Aufreinigung des Proteins mittels vorgefertigter Systeme. Alle diese Konstrukte wurden in mit Vakziniaviren infizierten Zellen rekombiniert. Die Korrektheit der Konstrukte wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt und die Rekombination mit einer PCR überprüft und nachgewiesen. Trotzdem gelang der Nachweis einer eukaryontischen Expression des Gesamtproteins nicht.

Parallel wurde versucht, das gH im Ganzen und in Teilfragmenten in E. coli Bakterien zu rekombinieren und zu exprimieren. Auch hier wurde mit der Markierung mit den 6x Histidin Peptid gearbeitet. Das gH wurde in ganzer Länge und in vier ungefähr gleich langen Teilstücken in den Bakterien rekombiniert. Die Teilfragmente wurden F1 – F4 genannt und deckten das gesamte Gen ab. Das Fragment F1 enthält die ersten 153 Aminosäuren, die Fragmente F2 (204 Aminosäuren), F3 (213 Aminosäuren) und F4 (160 Aminosäuren) schließen jeweils lückenlos an das vorherige an. Das gH-Protein konnte in Form von allen Teilproteinen prokaryontisch exprimiert werden, jedoch gelang auch hier die Expression des Gesamt-gH nicht.

6.2 Immunologische Charakterisierung des gH

Zur immunologischen Charakterisierung des gH wurden Antikörper gegen das F1-Fragment des gH in Kaninchen hergestellt. Die Immunreaktion der Kaninchen war

schwach, was die Vermutung nahelegt, daß gH in dieser Form nicht stark immunogen ist. Das mit dem F2-Fragment geimpfte Kaninchen produzierte keine nachweisbaren Antikörper.

Im Bakterienlysat mit den rekombinanten Teilproteinen ließ sich mit einem HHV-8 positiven Serum im Western-Blot eine Reaktivität auf die Teilproteine nachweisen. Die beste Reaktivität zeigte sich auf das F1-Fragment. Diese positive Immunantwort war aber durch die Bakterienverunreinigung schlecht auswertbar. Auch die Aufreinigung der Teilproteine gelang am besten mit dem F1-Fragment, aber nur unter stark denaturierenden Konditionen. Mit diesem gut aufgereinigten F1-Fragment ließ sich aber auch nach Optimierung der Bedingungen kein sensitiver und spezifischer Western-Blot oder ELISA etablieren. Die erzielten Reaktionen waren zu schwach und unspezifisch.

6.3 Fazit

Das gH ließ sich in Teilproteinen in Bakterien exprimieren.

Das gH des HHV-8 stellt zumindest bei der Expression in Teilproteinen kein dominantes Immunogen des Virus dar.

Ein Nachweis von gH-spezifischen Antikörpern ist, wenn überhaupt, nur mit geringer Sensitivität möglich.

Eine diagnostische Verwendung des gH als ELISA-Antigen erscheint zumindest fragwürdig.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ablashi D, Chatlynne L, Cooper H, Thomas D, Yadav M, Norhanom A W, Chandana A K, Churdboonchart V, Kulpradist S A, Patnaik M, Liegmann K, Masood R, Reitz M, Cleghorn F, Manns A, Levine P H, Rabkin C, Biggar R, Jensen F, Gill P, Jack N, Edwards J, Whitman J, Boshoff C; **Seroprevalence of human herpesvirus-8 (HHV-8) in countries of Southeast Asia compared to the USA, the Caribbean and Africa;** British Journal of Cancer; 811; 893-7; (1999)
2. Ambroziak J A, Blackbourn D J, Herndier B G, Glogau R G, Gullett J H, McDonald A R, Lennette E T, Levy J A; **Herpes-Like Sequences in HIV-Infected and Uninfected Kaposi's Sarcoma Patients;** Science; 268; 582-583; (1995)
3. André S, Schatz O, Bogner J R, Zeichhardt H, Stöffler-Meilicke M, Jahn H -U, Ullrich R, Sonntag A -K, Kehm R, Haas J; **Detection of antibodies against viral capsid Proteins of human herpesvirus 8 in AIDS-associated Kaposi's sarcoma;** Journal of Molecular Medicine; 75; 145-152; (1997)
4. Angeloni A, Heston L, Uccini S, Sirianni M C, Cottoni F, Masala M V, Cerimele D, Lin S -F, Sun R, Rigsby M, Faggioni A und Miller G; **High Prevalence of Antibodies to Human Herpesvirus 8 in Relatives of patients with Classic Kaposi's Sarcoma from Sardinia;** Journal of Infectious Diseases; 177; 1715-1718; (1998)
5. Bigoni B, Dolcetti R, de Lellis L, Carbone A, Boiocchi M, Cassai E und Di Luca D; **HHV8 Is Present in the Lymphoid System of Healthy Persons and Can Reactivate in the Course of AIDS;** Journal of Infectious Diseases; 173; 542-549; (1996)
6. Blacklaws B A, Krishna S, Minson A C und Nash A A; **Immunogenicity of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoproteins Expressed in Vaccinia Virus Recombinants;** Virology; 177; 727-736; (1990)
7. Boshoff C, Schulz T F, Kennedy M M, Graham A K, Fisher C, Thomas A, McGee J O, Weiss R A, O'Leary J J; **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells;** Nature Medicine; 1; 1274-8; (1995)
8. Browne H, Baxter V und Minson T; **Analysis of protective immune responses to the glycoprotein H-glycoprotein L complex of herpes simplex virus type 1;** Journal of General Virology; 74; 2813-2817; (1993)

9. Campadelli-Fiume G; **(Herpes Simplex) Virus Glycoproteins;** Encyclopedia of Virology; Hrsg. Robert G. Webster und Allan Granoff, Academic Press; Vol. 2, S. 603-609; (1994)

10. Casper C, Krantz E, Taylor H, Dalessio J, Carrell D, Wald A, Corey L, Ashley R; **Assessment of a combined testing strategy for detection of antibodies to human herpesvirus 8 (HHV-8) in persons with Kaposi's sarcoma, persons with asymptomatic HHV-8 infection, and persons at low risk for HHV-8 infection.;** Journal of Clinical Microbiology; 40; 3822-3825; (2002)

11. Cathomas G, McGandy C E, Terracciano L M, Itin P H, De Rosa G, Gudat F; **Detection of herpesvirus-like DNA by nested PCR on archival skin biopsy specimens of various forms of Kaposi Sarcoma;** Journal of Clinical Pathology; 49; 631-633; (1996)

12. Cattani P, Cerimele F, Porta D, Graffeo R, Ranno S, Marchetti S, Ricci R, Capodicasa N, Fuga L, Amico R, Cherchi G, Gazzilli M, Zanetti S,Fadda G; **Age-specific seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in Mediterranean regions;** Clinical Microbiology and Infection; 9; 274-279; (2003)

13. Cesarman E, Moore P S, Rao P H, Inghirami G, Knowles D M und Chang Y; **In vitro Establishment and Characterization of Two Acquired Immundeficiency Syndrome-Related Lymphoma Cell Lines (BC-1 and BC-2) Containing Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Like (KSHV) DNA Sequences;** Blood; 86; 2708-2714; (1998)

14. Cesarman E, Nador R G, Aozasa K, Delsol G, Said J W und Knowles D M; **Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus in Non-AIDS-Related Lymphomas Occuring in Body Cavities;** American Journal of Pathology; 149; 53-57; (1996)

15. Chandran B, Smith M S, Koelle D M, Corey L, Horvat R und Goldstein E; **Reactivities of Human Sera with Human Herpesvirus-8-Infected BCBL-1 Cells and Identification of HHV-8-Specific Proteins and Glycoproteins and the Encoding cDNAs;** Virology; 243; 208-217; (1998)

16. Chandran B; Bloomer C, Chan S R, Zhu L, Goldstein E und Horvat R; **Human Herpesvirus-8 ORF K8.1 Gene Encodes Immunogenic Glycoproteins Generated by Spliced Transcripts;** Virology; 249; 140-149; (1998)

17. Chang Y, Cesarman E, Pessin M S, Lee F, Culpepper J, Knowles D M und Moore P S; **Identification of Herpesvirus-Like DNA Sequences in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma;** Science; 265; 1865-1869; (1994)

18. Chatlynne L G, Lapps W, Handy M, Huang Y Q, Masood R, Hamilton A S, Said J W, Koeffler H P, Kaplan M H, Fiedman-Kien A, Gill P S, Whitman J E und Ablashi D V; **Detection and Titration of Human Herpesvirus-8-Specific Antibodies in Sera From Blood Donors, Acquired Immundeficiency Syndrome Patients, and Kaposi's Sarcoma Patients Using a Whole Virus Enzyme-Linked Immunsorbent Assey;** Blood; 92; 53-58; (1998)

19. Clements J B, Timbury M C, Griffiths P; **Herpesviridae;** Topley &Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity; 8. Ausgabe; Vol. 4, S. 416-428; (1990)

20. Corchero J L, Mar E -C, Spira T J, Pellett P E and Inoue N; **Comparison of serologic assays for detection of antibodies against human herpesvirus 8.;** Clinical and Diagnostic Laboratoy Immunology; 8; 913-921; (2001)

21. Cranage M P, Smith G L, Bell S E, Hart H, Brown C, Bankier A T, Tomlinson P, Barrell B G und Minson T; **Identification and Expression of a Human Cytomegalovirus Glycoprotein with homology to the Epstein-Barr Virus BXLF2 Product, Varicella-Zoster Virus gpIII, and Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein H;** Journal of Virology; 62; 1416-1422; (1988)

22. Crum N F, Wallace M R, Stephan K, Blazes D L, Aronson N, Tasker S A, Thomas A G, Wegner S, Casper C, Wald A, Corey L, Brodine S K; **Correlates of human herpesvirus-8 seropositivity among U.S. military members recently infected with human immunodeficiency virus.;** Sexually Transmitted Diseases; 30; 713-718; (2003)

23. Damania B, Choi J -K und Jung J U; **Signaling Activities of Gammaherpesvirus Membrane Proteins;** Journal of Virology; 74; 1593-16001; (2000)

24. Davis D A, Humphrey R W, Newcomb F M, O'Brien T R, Goedert J J, Straus S E und Yarchoan R; **Detection of Serum Antibodies to a Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Specific Peptide;** The Journal of Infectios Diseases; 175; 1071-1079; (1997)

25. Decker L L, Shankar P, Khan G, Freeman R B, Dezube B J, Lieberman J und Thorley-Lawson D A; **The Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) is Present as an Intact Latent Genome in KS Tissue but Replicates in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of KS Patients;** Journal of Experimental Medicine; 184; 283-288; (1996)

26. Delorme S, Houde I, Deschenes L; **Seroprevalence of antibodies against human herpesvirus 8 in a population of renal transplant recipients at Hotel-Dieu de Quebec Hospital.;** Journal of Clinical Microbiology; 41; 5207-5208; (2003)

27. Desai P J, Schaffer P A und Minson A C; **Excretion of Non-Infectious Virus Particles Lacking Glycoprotein H by a Temperature-sensitive Mutantn of Herpes Simplex Virus Type 1: Evidence that gH Is Essential for Virion Infectivity;** Journal of general Virology; 69; 1147-1156; (1988)

28. Desrosiers R C, Sasseville V G, Czajak S C, Hang X, Mansfield K G, Kaur A Johnson R P, Lackner A A und Jung J U; **A Herpesvirus of Rhesus Monkeys Related to the Human Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus;** Journal of Virology; 71; 9764-9769; (1997)

29. Dictor M, Rambech E, Way D, Witte M und Bendsöe N; **Human Herpesvirus 8 (Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus) DNA in Kaposi's Sarcoma Lesions, AIDS Kaposi's Sarcoma Cell Lines, Endothelial Kaposi's Sarcoma Simulators, and the Skin of Immunosuppressed Patients;** American Journal of Pathology; 148; 2009-2016; (1996)

30. Dittmer D P, Gonzalez C M, Vahrson W, DeWire S M, Hines-Boykin R, Damania B; **Whole-Genome Transcription Profiling of Rhesus Monkey Rhadinovirus;** Journal of Virology; 79; 8637-8650; (2005)

31. Dukers N, Rezza G; **Human herpesvirus 8 epidemiology: what we do and do not know;** AIDS; 17; 1717-1730; (2003)

32. Engels E A, Sinclair M D, Biggar R J, Whitby D, Ebbesen P, Goedert J J, Gastwirth J L; **Latent class analysis of human herpesvirus 8 assay performance and infection prevalence in sub-saharan Africa and Malta;** International Jounal of Cancer; 88; 1003-8; (2000)

33. Falke D; **Allgemeine Virologie;** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie; Hrsg. Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann; Springer Verlag; 3. Auflage; S. 465-470; (1999)

34. Ferreira S, Sanabani S, Reis A D, Chamone D F, Sabino E C; **Human herpesvirus type 8 among Brazilian blood donors.;** Transfusion; 43; 1764-1765; (2003)

35. Foà-Tomasi L, Avitabile E, Boscaro A, Brandimarti R, Gualandri R, Manservigi R, Dall'Olio F Serafini-Cessi F und Campadelli Fiume G; **Herpes Simplex Virus (HSV) Glycoprotein H is Partially Processed in a Cell Line that Expresses the Glycoprotein and Fully Processed in Cells Infected with Deletion or ts Mutants in the Known HSV Glycoproteins;** Virology; 180; 474-482; (1991)

36. Forghani B, Ni L und Grose C; **Neutralization Epitope of the Varicella-Zoster Virus gH:gL Glycoprotein Complex;** Virology; 199; 458-462; (1994)

37. Forrester A J, Sullivan V, Simmons A, Blacklaws B A, Smith G L, Nash A A und Minson A C; **Induction of protective immunity with antibody to herpes simplex virus type 1 glycoprotein H (gH) and analysis of the immune response to gH expresses in recombinant vaccinia virus;** Journal of general Virology; 72; 369-375; (1991)

38. Fujii T, Taguchi H, Katano H, Mori S, Nakamura T, Nojiri N, Nakajima K, Tadokoro K, Juji T und Iwamoto A; **Seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in Human Immundeficiency Virus 1-Positive and Human Immundeficiency Virus 1-Negative Populations in Japan;** Journal of Medical Virology; 57; 159-162; (1999)

39. Fuller A O, Santos R E und Spear P G; **Neutralizing Antibodies Specific for Glycoprotein H of Herpes Simplex Virus Permit Viral Attachment to Cells but Prevent Penetration;** Journal of Virology; 63; 4435-3443; (1989)

40. Gaidano G, Pastore C, Gloghini A, Cusini M, Nomdedéu J, Volpe G, Capello D, Vaccher E, Bordes R, Tirelli U, Saglio G und Carbone A; **Distribution of human herpesvirus-8 sequences throughout the spectrum of AIDS-related neoplasia;** AIDS; 10; 941-949; (1996)

41. Gao S -J, Kingsley L, Hoover D R, Spira T J, Rinaldo C R, Saah A, Phair J, Detels R, Parry P, Chang Y und Moore P S; **Seroconversion to Antibodies against Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Related Latent Nuclear Antigens before the Development of Kaposi's Sarcoma;** New England Journal of Medicine; 335; 233-241; (1996)

42. Gao S -J, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J, Newton R, Rinaldo C R, Saah A, Phair J, Detels R, Chang Y und Moore P S; **KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma;** Nature Medicine; 2; 925-928; (1996)

43. Gompels U A und Minson A C; **Antigenic Properties and Cellular Localization of Herpes Simplex Virus Glycoprotein H Synthesized in a Mammalian Cell Expression System;** Journal of Virology; 63; 4744-4755; (1989)

44. Gompels U A, Craxton M A, Honess R W; **Conservation of glycoprotein H (gH) in herpesviruses: nucleotide sequence of the gH gene from herpesvirus saimiri.;** Journal of General Virology; 69; 2819-29; (1988)

45. Graham F L, van der Eb A J; **A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA;** Virology; 52; 456-467; (1973)

46. Heuschmid M A; **Charakterisierung resistenzvermittelnder UL97-Mutationen des humanen Zytomegalievirus (HCMV) mit Hilfe rekombinanter Vakzinia-Viren;** Dissertation der Medizinischen Fakultät, Universität Ulm; (1998)

47. Hladik W, Dollard S C, Downing R G, Kataaha P, Pellett P E, Karon J M, Mermin J, Lackritz E M; **Kaposi's Sarcoma in Uganda: Risk Factors for Human Herpesvirus 8 Infection Among Blood Donors;** Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes; 33; 206-210; (2003)

48. Hoffman L J, Bunker C H, Pellett P E, Trump D L, Patrick A L, Dollard S C, Keenan H A, Jenkins F J; **Elevated seroprevalence of human herpesvirus 8 among men with prostate cancer.;** Journal of Infectios Diseases; 189; 15-20; (2004)

49. Hudnall S D, Chen T, Rady P, Tyring S, Allison P; **Human herpesvirus 8 seroprevalence and viral load in healthy adult blood donors;** Transfusion; 43; 85-90; (2003)

50. Humphrey R W, O'Brian T R, Newcomb F M, Nishihara H, Wyvill K M, Ramos G A, Saville M W, Goedert J J, Straus S E und Yarchoan R; **Kaposi's Sarcoma (KS) - Associated Herpesvirus-Like DNA Sequences in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Association With KS and Persistence in Patients Receiving Anti-Herpesvirus Drugs;** Blood; 8; 297-301; (1996)

51. Hutchinson L, Browne H, Wargent V, Davis-Poynter N, Primorac S, Goldsmith K, Minson A C und Johnson D C; **A Novel Herpes Simplex Virus Glycoprotein, gL, Forms a Complex with Glycoprotein H (gH) and Affects Normal Folding and Surface Expression of gH;** Journal of Virology; 66; 2240-2250; (1992)

52. Jin Y -T, Tsai S -T, Yan J -J, Hsiao J -H, Lee Y -Y und Su I -J; **Detection of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-like DNA Sequence in Vascular Lesions;** American Journal of Pathology; 105; 360-363; (1996)

53. Juhasz A, Konya J, Beck Z, Remenyik E, Veress G, Begany A, Medgyessy I, Hunyadi J, Gergely L; **HHV-8 ELISA based on a one-step affinity capture of biotinylated K8.1 antigen;** Journal of Virological Methods; 94; 163-72; (2001)

54. Kasolo F C, Monze M, Obel N, Anderson R A, French C Gompels U A; **Sequence analyses of human herpesvirus-8 strains from both African human immundeficiency virus-negative and -positive childhood endemic Kaposi's sarcoma show a close relationship with strains identified in febrile children and high variation in the K1 glycoprotein;** Journal of General Virology; 79; 305-3065; (1998)

55. Katano H, Iwasaki T, Baba N, Terai M, Mori S, Iwamoto A, Kurata T und Sata T; **Identification of Antigenic Proteins Encoded by Human Herpesvirus 8 and Seroprevalence in the General Population and among Patients with and without Kaposi's Sarcoma;** Journal of Virology; 74; 3478-3485; (2000)

56. Katano H, Sata T, Suda T, Nakamura T, Tachikawa N, Nishizumi H, Sakurada S, Hayashi Y, Koike M, Iwamoto A, Kurata T und Mori S; **Expression and Antigenicity of Human Herpesvirus 8 Encoded ORF59 Protein in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma;** Journal of Medical Virology; 59; 346-355; (1999)

57. Katano H, Sato Y, Kurata T, Mori S und Sata T; **High Expression of HHV-8-Encoded ORF73 Protein in Spindle-Shaped Cells of Kaposi's Sarcoma;** American Journal of Pathology; 155; 47-52; (1999)

58. Kaye J F, Gompels U A und Minson A C; **Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with the HCMV UL115 gene product;** Journal of general Virology; 73; 2693-2698; (1992)

59. Kedes D H, Ganem D, Ameli N, Bacchetti P, Greenblatt R; **The Prevalence of Serum Antibody to Human Herpesvirus 8 (Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus) Among HIV-Seropositive and High-Risk HIV-Seronegative Women;** JAMA; 277; 478-481; (1997)

60. Kedes D H, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D; **The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): Distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission;** Nature Medicine; 2; 918-924; (1996)

61. Klupp B G und Mettenleiter T C; **Sequence and Expression of the Glycoprotein gH Gene of Pseudorabies Virus;** Virology; 182; 732-741; (1991)

62. Klupp B G, Visser N und Mettenleiter T C; **Identification and Characterisation of Pseudorabies Virus Glycoprotein H;** Journal of Virology; 66; 3048-3055; (1999)

63. Lang D, Hinderer W, Rothe M, Sonneborn H -H, Neipel F, Raab M, Rabenau H, Masquelier B und Fleury H; **Comparison of the Immunoglobulin-G-Specific Seroreactivity of Different Recombinant Antigens of the Human Herpesvirus 8;** Virology; 260; 47-54; (1999)

64. Lefrère J J, Meyohas M C, Mariotti M, Meynard J L, Thauvin M und Frottier J; **Detection of Human Herpesvirus 8 DNA Sequences before the Appearance of Kaposi's Sarcoma in Human Immundeficiency Virus (HIV)-Positive Subjects**

with a Known Date of HIV Seroconversion; Journal of Infectios Diseases; 174; 283-287; (1996)

65. Lennette E T, Blackbourn D J, Levy J A; **Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients;** The Lancet; 348; 858-861; (1996)
66. Levy J A; **Three new human herpesviruses (HHV6, 7, and 8);** The Lancet; 349; 558-562; (1997)
67. Li L, Nelson J A und Britt W J; **Glycoprotein H-Related Complexes of Human Cytomegalovirus: Identification of a Third Protein in the gCIII Complex;** Journal of Virology; 71; 3090-3097; (1997)
68. Li M, MacKey J, Czajak S C, Desrosiers R C, Lackner A A und Jung J U; **Identification and Characterisation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K8.1 Virion Glycoprotein;** Journal of Virology; 73; 1341-1349; (1999)
69. Lin S -F, Sun R, Heston L, Gradoville L, Shedd D, Haglund K, Rigsby M und Miller G; **Identification, Expression and Immunogenicity of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Small Viral Capsid Antigen;** Journal of Virology; 71; 3069-3076; (1997)
70. Liu D X, Gompels U A, Foa-Tomasi L und Campadelli-Fiume G; **Human Herpesvirus-6 Glycoprotein H and L Homologs Are Components of the gp100 Complex and the gH External Domain is the Target for Neutralizing Monoclonal Antibodies;** Virology; 197; Dez 22; (1993)
71. Luppi M, Barozzi P, Maiorana A, Collina G, Ferrari M G, Marasca R, Morselli M, Rossi E, Ceccherini-Nelli L und Torelli G; **Frequency and Distribution of Herpesvirus-Like DNA Sequences (KSHV) in Different Stages of Classic Kaposi's Sarcoma and in Normal Tissues from an Italian Population;** International Journal of Cancer; 66; 427-431; (1996)
72. Martin J N, Ganem D E, Osmond D H, Page-Shafer K A, Macrae D, Kedes D H; **Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection.;** The New England Journal of Medicine; 338; 948-954; (1998)
73. Martro E, Bulterys M, Stewart J A, Spira T J, Cannon M J, Thacher T D, Bruns R, Pellett P E, Dollard S C; **Comparison of human herpesvirus 8 and Epstein-Barr virus seropositivity among children in areas endemic and non-endemic for Kaposi's sarcoma.;** Journal of Medical Virology; 72; 126-131; (2004)
74. Masini C, Abeni D D, Cattaruzza M S, Capuano M, Pedicelli C, Cerimele F, Pasquini P, Cerimele D, Fadda G, Cattani P; **Antibodies against human**

herpesvirus 8 in subjects with non-venereal dermatological conditions.; British Journal of Dermatology; 143; 484-490; (2000)

75. Mayama S, Cuevas L E, Sheldon J, Omar O H, Smith D H, Okong P, Silvel B, Hart C A und Schulz T F; **Prevalence and Transmission of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) in Ugandan Children and Adolescents;** International Journal of Cancer; 77; 817-820; (1998)
76. Meng Y -X, Spira T J,Ganapati J B, Birch C J, Druce J D, Edlin B R, Edwards R, Gunthel C, Newton R, Stamey F R, Wood C und Pellett P E; **Individuals from North America, Australasia, and Africa Are Infected with Four Different Genotypes of Human Herpesvirus 8;** Virology; 261; 106-119; (1999)
77. Micheletti F, Monini P, Fortini C, Rimessi P, Bazzaro M, Andreoni M, Giuliani M, Traniello S, Ensoli B, Gavioli R; **Identification of cytotoxic T lymphocyte epitopes of human herpesvirus 8.;** Immunology; 106; 395-403; (2002)
78. Miller G, Rigsby M O, Heston L, Grogan E, Sun R, Metroka C, Levy J A, Gao S -J, Chang Y und Moore P S; **Antibodies to Butyrate-Inducible Antigens of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus in Patients With HIV-1 Infection;** New England Journal of Medicine; 334; 1292-1297; (1996)
79. Modrow S, Falke D; **Herpesviren;** aus Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin, 1. korrigierter Nachdruck; 411-428; (1998)
80. Monini P, de Lellis L, Fabris M, Rigolin F, Cassai E; **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen;** New England Journal of Medicine; 334; 1168-72; (1996)
81. Moore P S, Gao S -J, Dominguez G, Cesarman E, Lungu O, Knowles D M, Garber R, Pellett P E, McGeoch D J und Chang Y; **Primary Characterization of a Herpesvirus Agent Associated with Kaposi's Sarcoma;** Journal of Virology; 70; 549-558; (1996)
82. Moore P S, Kingsley L A, Holmberg S D, Spira T, Gupta P, Hoover D R, Parry J P, Conley L J, Jaffe H W und Chang Y; **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma;** AIDS; 10; 175-180; (1996)
83. Morfeldt L, Torssander J; **Long-term remission of Kaposi's sarcoma following foscarnet treatment in HIV-infected patients;** Scandinavian Journal of Infectious Diseases; 26; 749-52; (1994)

84. Mori Y, Akkapaiboon P, Yang X, Yamanishi K; **The human herpesvirus 6 U100 gene product is the third component of the gH-gL glycoprotein complex on the viral envelope.;** Journal of Virology; 77; 2452-2458; (2003)

85. Naranatt P P, Akula S M and Chandran B; **Characterization of γ2-human herpesvirus-8 glycoproteins gH and gL;** Archives of Virology; 147; 1349-1370; (2002)

86. Némecková S, Ludíková V, Maresová L, Krystofová J, Hainz P und Kutinová L; **Induction of varicella-zoster virus-neutralizing antibodies in mice by coinfection with recombinant vaccinia viruses expressing the gH or gL gene;** Journal of General Virology; 77; 211-215; (1996)

87. Noel J C, Hermans P, Andre J, Fayt I, Simonart T, Verhest A, Haot J, Burny A; **Herpesvirus-like DNA sequences and Kaposi's sarcoma: relationship with epidemiology, clinical spectrum, and histologic features;** Cancer; 77; 2132-6; (1996)

88. Olsen S J, Chang Y, Moore P S, Biggar R J, Melbye M; **Increasing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus seroprevalence with age in a highly Kaposi's sarcoma endemic region, Zambia in 1985;** AIDS; 12; 1921-5; (1998)

89. O'Neill E, Douglas J L, Chien M -L und Garcia J V; **Opening Reading Frame 26 of Human Herpesvirus 8 Encodes a Tetradecanoyl Phorbol Acetate- and Butyrate-Inducible 32-Kilodalton Protein Expressed in a Body Cavity-Based Lymphoma Cell Line;** Journal of Virology; 71; 4791-4797; (1997)

90. Pau C -P, Lam L L, Spira T J, Black J B, Stewart J A, Pellett P E und Respess R A; **Mapping and Serodiagnostic Application of a Dominant Epitope within the HHV(ORF 65-Encoded Protein;** Journal of Clinical Microbiology; 36; 1574-1577; (1998)

91. Pellett P E, Wright D J, Engels E A, Ablashi D V, Dollard S C, Forghani B, Glynn S A, Goedert J J, Jenkins F J, Lee T -H, Neipel F, Todd D S, Whitby D, Nemo G J, Busch M P; **Multicenter comparison of serologic assays and estimation of human herpesvirus 8 seroprevalence among US blood donors;** Transfusion; 43; 1260-1268; (2003)

92. Peng T, Ponce-de-Leon M, Jiang H, Dubin G, Lubinski J M, Eisenberg R J und Cohen G H; **The gH-gL Complex of Herpes Simplex Virus (HSV) Stimulates Neutralizing Antibody and Protects Mice against HSV Type 1 Challenge;** Journal of Virology; 72; 65-72; (1998)

93. Pérez C, Tous M, Gallego S, Zala N, Rabinovich O, Garbiero S, Martinez M J, Cunha A M G, Camino S, Cámara A, Costa S C B, Larrondo M, Francalancia V,

Landreau F, Bartomioli M A; **Seroprevalence of Human Herpesvirus-8 in Blood Donors From Different Geographical Regions of Argentina, Brazil, and Chile;** Journal of Medical Virology; 72; 661-667; (2004)

94. Pertel P E; **Human Herpesvirus 8 Glycoprotein B (gB), gH, and gL Can Mediate Cell Fusion;** Journal of Virology; 76; 4390-4400; (2002)
95. Plancoulaine S, Abel L, van Beveren M, Gessain A; **High Titers of Anti-Human Herpesvirus 8 Antibodies in Elderly Males in an Endemic Population;** Journal of the National Cancer Institute; 94; 1333-1335; (2002)
96. Pranghofer S; **Untersuchungen zur Prävalenz und molekularen Epidemiologie des human Herpesvirus 8;** Dissertation der Medizinischen Fakultät, Universität Ulm; (2002)
97. Pulford D J, Lowrey P und Morgan A J; **Co-expression of the Epstein-Barr virus BXLF2 and BKRF2 genes with a recombinant baculovirus produces gp85 on the cell surface with antigenic similarity to the native protein;** Journal of General Virology; 76; 3145-3152; (1995)
98. QIAGEN GmbH, **Western und Colony Blot Protocols for use with RGS·His Antibody, Penta·His Antibody, and Tetra·His Antibody,** Protocol (1997)
99. Qian G, Wood C und Chandran B; **Identification and Characterisation of Glycoprotein gH of Human Herpesvirus-6;** Virology; 194; 380-386; (1993)
100. Raab M -S, Albrecht J -C, Birkmann A, Yaguboglu S, Lang D, Fleckenstein B und Neipel F; **The Immunogenic Glycoprotein gp35-37 of Human Herpesvirus 8 Is Encoded By Opening Reading Frame K8.1;** Journal of Virology; 72; 6725-6731; (1998)
101. Rabkin C S, Schulz T F, Whitby D, Lennette E T, Magpantay L I, Chatlynne L und Biggar R J; **Interassey Correlation of Human Herpesvirus 8 Serologic Tests;** Journal of Infectious Diseases; 178; 304-309; (1998)
102. Rasmussen L, Matkin C, Spaete R, Pachl C und Merigan T C; **Antibody Response To Human Cytomegalovirus Glycoprotein gB and gH after Natural Infection in Humans;** Journal of Infectious Diseases; 164; 835-842; (1991)
103. Regamey N, Cathomas G, Schwager M, Wernli M, Harr T und Erb P; **High Human Herpesvirus 8 Seroprevalence in the Homosexual Population in Switzerland;** Journal of Clinical Microbiology; 36; 1784-1786; (1998)
104. Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D und Ganem D; **Lytic groth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture;** Nature Medicine; 2; 341-346; (1996)

105. Renwick N, Halaby T, Weverling G J, Dukers N, Simpson G R, Coutinho R A, Lange J, Schulz T F und Goudsmit J; **Seroconversionfor human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's Sarcoma;** AIDS; 12; 2481-2488; (1998)

106. Roberts S R; Ponce de Leon M, Cohen G H und Eisenberg R J; **Analysis of the Intracellular Maturation of the Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein gH in Infected and Transfected Cells;** Virology; 184; 609-624; (1991)

107. Rüdliger R; **Aktueller Kommentar;** Hautarzt; 47; 91-95; (1996)

108. Russo J J, Bohenzky R A, Chien M -C, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry J P, Peruzzi D, Edelman I S, Chang Y und Moore P S; **Nucleotide sequence of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (HHV 8);** Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 93; 14862-14867; (1996)

109. Serraino D, Corona R M, Giuliani M, Farchi F, Sarmati L, Uccella I, Andreoni M, Rezza G; **Infection with human herpesvirus type 8 and kaposi's sarcoma in a central Italian area formerly endemic for malaria.;** Infection; 31; 47-50; (2003)

110. Serraino D, Toma L, Andreoni M, Buttò S, Tchangmena O, Sarmati L, Monini P, Franceschi S, Ensoli B, Rezza G; **A seroprevalence study of human herpesvirus type 8 (HHV8) in eastern and Central Africa and in the Mediterranean area;** European Journal of Epidemiology; 17; 871-876; (2001)

111. Simpson G R, Schulz T F, Whitby D, Cook P M, Boshoff C, Rainbow L, Howard M R, Gao S -J, Bohenzky R A, Simmonds P, Lee C, de Ruiter A, Hatzakis A, Tedder R S, Weller I V D, Weiss F A, Moore P S; **Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen;** The Lancet; 349; 1133-1138; (1996)

112. Smith M S, Bloomer C, Horvat R, Goldstein E, Casparian J M und Chandran B; **Detection of Human Herpesvirus 8 DNA in Kaposi's Sarcoma Lesions and Peripheral Blood of Human Immundeficiency Virus-Positive Patients and Correlation with Serologic Measurements;** Journal of Infectious Diseases; 176; 84-93; (1997)

113. Souza V A U F, Sumita L M, Freire W, Sato H K, Grandi J L, Pierotti L C, Nascimento M C, Pannuti C S; **Prevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in populations with and without risk for infection in Sao Paulo State;** Brazilian Journal of Medical and Biological Research; 37; 123-127; (2004)

114. Spira T J, Lam L, Dollard S C, Meng Y -X, Pau C P, Black J B, Burns D, Cooper B, Hamid M, Huong J, Kite-Powell D, Pellett P E; **Comparison of Serologic Assays and PCR for Diagnosis of Human Herpesvirus 8 Infection;** Journal of Clinical Microbiology; 38; 2174-2180; (2000)

115. Suchankova A, Stankova M, Roubalova K, Vandasova J, Bruckova M; **Seroprevalence of HHV 8 antibodies among the general population and HIV positive persons in the Czech Republic.;** Journal of Clinical Virology; 28; 70-76; (2003)

116. Takeda K, Haque M, Sunagawa T, Okuno T, Isegawa Y und Yamanishi K; **Identification of a variant B-specific neutralizing epitope on glycoprotein H of human herpesvirus-6;** Journal of General Virology; 78; 2171-2178; (1997)

117. Taylor M M, Chohan B, Lavreys L, Hassan W, Huang M L, Corey L, Ashley Morrow R, Richardson B A, Mandaliya K, Ndinya-Achola J, Bwayo J, Kreiss J; **Shedding of human herpesvirus 8 in oral and genital secretions from HIV-1-seropositive and -seronegative Kenyan women;** Journal of Infectios Diseases; 190; 484-8; (2004)

118. Tedeschi R, De Paoli P, Schulz T F und Dillner J; **Human Serum Antibodies to a Major Defined Epitope of Human Herpesvirus 8 Small Viral Capsid Antigen;** Journal of Infectious Diseases; 179; 1016-1020; (1999)

119. Urban M, Klein M, Britt W J, Haßfurther E und Mach M; **Glycoprotein H of human Cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response;** Journal of General Virology; 77; 1537-1547; (1996)

120. Wang Q J, Jenkins F J, Jacobson L P, Kingsley L A, Day R D, Zhang Z W, Meng Y X, Pellett P E, Kousoulas K G, Baghian A, Rinaldo C R Jr, Pellet P E; **Primary human herpesvirus 8 infection generates a broadly specific CD8(+) T-cell response to viral lytic cycle proteins.;** Blood; 97; 2366-2373; (2001)

121. Wang X, Kenyon W J,Li Q, Müllberg J und Hutt-Fletcher L M; **Epstein-Barr Virus Uses Different Complexes of Glycoproteins gH and gL To Infect B Lymphocytes and Epithelial Cells;** Journal of Virology; 72; 5552-5558; (1998)

122. Weiss R A; **Human herpesvirus 8 in lymphoma and Kaposi's sarcoma: Now the virus can be propagated;** Nature Medicine; 2; 277-278; (1996)

123. Westra D F, Glazenburg K L, Harmsen M C, Tiran A, Scheffer A J, Welling G W, The T H und Welling-Wester S; **Glycoprotein H of Herpes Simplex Virus Type 1 Requires Glycoprotein L for Transport to the Surface of Insect Cells;** Journal of Virology; 71; 2285-2291; (1997)

124. Westra D F, Kuiperij H B, Welling G W, Scheffer A J, The T H und Welling-Wester S; **Domains of Glycoprotein H of Herpes Simplex Virus Type 1 Involved in Complex Formation with Glycoprotein L;** Virology; 261; 96-105; (1999)

125. Yaswen L R, Stephens E B, Davenport L C und Hutt-Fletcher L M; **Epstein-Barr Virus Glycoprotein gp85 Associates with the BKRF2 Gene Product and Is Incompletely Processed as a Recombinant Protein;** Virology; 195; 387-396; (1993)

126. Zhu L, Wang R, Sweat A, Goldstein E, Horvat R und Chandran B; **Comparison of Human Sera Reactivities in Immunoblots with Recombinant Human Herpesvirus (HHV)-8 Proteins Associated with the Latent (ORF73) and Lytic (ORFs 65, K8.1A, and K8.1B)Replicative Cycles and in Immunofluorescence Asseys with HHV-8-Infected BCBL-1 Cells;** Virology; 256; 381-392; (1999)

8 ANHANG

Die Sequenz des Glykoprotein H des Humanen Herpesvirus 8

```
36961  gtagccgacg  cggataagtt  ccacgacgac  gtatgcggcc  tgtggaccga
37011  aatctacagg  cagatcctgt  ccaatccggc  tattaaaccc  agggccatca
37061  actggccagc  attagagagc  cagtctaaag  cagttaatca  cctagaggag
37111  acatgcaggg  tctagccttc  ttggcggccc  ttgcatgctg  gcgatgcata     1 -  48
        Start                              SphI
37161  tcgttgacat  gtggagccac  tggcgcgttg  ccgacaacgg  cgacgacaat    49 -  98
37211  aacccgctcc  gccacgcagc  tcatcaatgg  gagaaccaac  ctctccatag    99 -  148
37261  aactggaatt  caacggcact  agtttttttc  taaattggca  aaatctgttg   149 -  198
             EcoRI
37311  aatgtgatca  cggagccggc  cctgacagag  ttgtggacct  ccgccgaagt   199 -  248
37361  cgccgaggac  ctcagggtaa  ctctgaaaaa  gaggcaaagt  ctttttttcc   249 -  298
37411  ccaacaagac  agttgtgatc  tctggagacg  gccatcgcta  tacgtgcgag   299 -  348
37461  gtgccgacgt  cgtcgcaaac  ttataacatc  accaagggct  ttaactatag   349 -  398
37511  cgctctgccc  gggcaccttg  gcggatttgg  gatcaacgcg  cgtctggtac   399 -  448
               Sma
37561  tgggtgatat  cttcgcatca  aaatggtcgc  tattcgcgag  ggacacccca   449 -  498
             EcoRV
37611  gagtatcggg  tgttttaccc  aatgattgtc  atggccgtca  agttttccat   499 -  548
37661  atccattggc  aacaacgagt  ccggcgtagc  gctctatgga  gtggtgtcgg   549 -  598
37711  aagatttcgt  ggtcgtcacg  ctccacaaca  ggtccaaaga  ggctaacgag   599 -  648
37761  acggcgtccc  atcttctgtt  cggtctcccg  gattcactgc  catctctgaa   649 -  698
37811  gggccatgcc  acctatgatg  aactcacgtt  cgcccgaaac  gcaaaatatg   699 -  748
37861  cgctagtggc  gatcctgcct  aaagattctt  accagacact  ccttacagag   749    798
37911  aattacactc  gcatatttct  gaacatgacg  gagtcgacgc  ccctcgagtt   799 -  848
                                          SalI        XhoI
37961  cacgcggacg  atccagacta  ggatcgtatc  aatcgaggcc  aggcgcgcct   849 -  898
38011  gcgcagctca  agaggcggcg  ccggacatat  tcttggtgtt  gtttcagatg   899 -  948
38061  ttggtggcac  actttcttgt  tgcgcggggc  attaccgagc  accgatttgt   949 -  998
38111  ggaggtggac  tgcgtgtgtc  ggcagtatgc  ggaactgtat  tttctccgcc   999 -  1048
38161  gcatctcgcg  tctgtgcatg  ccccacgttca  ccactgtcgg  gtataaccac  1049 -  1098
                         SphI
38211  accacccttg  gcgctgtggc  cgccacacaa  atagctcgcg  tgtccgccac  1099 -  1148
38261  gaagttggcc  agtttgcccc  gctcttccca  ggaaacagtg  ctggccatgg  1149 -  1198
38311  tccagcttgg  cgcccgtgat  ggcgccgtcc  cttcctccat  tctggagggc  1199 -  1248
38361  attgctatgg  tcgtcgaaca  tatgtatacc  gcctacactt  atgtgtacac  1249 -  1298
38411  actcggcgat  actgaaagaa  aattaatgtt  ggacatacac  acggtcctca  1299 -  1348
38461  ccgacagctg  cccgcccaaa  gactccggag  tatcagaaaa  gctactgaga  1349 -  1398
38511  acatatttga  tgttcacatc  aatgtgtacc  aacatagagc  tgggcgaaat  1399 -  1448
38561  gatcgcccgc  ttttccaaac  cggacagcct  taacatctat  agggcattct  1449 -  1498
38611  ccccctgctt  tctaggacta  aggtacgatt  tgcatccagc  caagttgcgc  1499 -  1548
                              KpnI
38661  gccgaggcgc  cgcagtcgtc  cgctctgacg  cggactgccg  ttgccagagg  1549 -  1598
38711  aacatcggga  ttcgcagaat  tgctccacgc  gctgcacctc  gatagcttaa  1599 -  1648
38761  atttaattcc  ggcgattaac  tgttcaaaga  ttacagccga  caagataata  1649 -  1698
38811  gctacgg     ccttgcctca  cgtcacgtat  atcatcagtt  ccgaagcact  1699 -  1748
38861  ctcgaacgct  gttgtctacg  aggtgtcgga  gatcttcctc  aagagtgcca  1749 -  1798
                                       BglII
38911  tgtttatatc  tgctatcaaa  cccgattgct  ccggctttaa  cttttctcag  1799 -  1848
38961  attgataggc  acattcccat  agtctacaac  atcagcacac  caagaagagg  1849 -  1898
```

39011	ttgccccctt	tgtgactctg	taatcatgag	ctacgatgag	agcgatggc**c**	1899	-	1948
39061	**tgcag**tctct	catgtatgtc	actaatgaaa	gggtgcagac	caacctcttt	1949	-	1998
	PstI							
39111	ttagataagt	caccttctt	tgataataac	aacctacaca	ttcattattt	1999	-	2048
39161	gtggctgagg	gacaacggga	ccgtagtgga	gataaggggc	atgtatagaa	2049	-	2098
39211	gacgcgcagc	cagtgctttg	tttctaattc	tctcttttat	tgggttctcg	2099	-	2148
39261	ggggttatct	actttcttta	cagactgttt	tccatccttt	attagacggt	2149	-	2198
39311	caataaagcg	tagatttta	aaaggtttcc	tgtgc**att**ct	ttttgtatgg	2199	-	2248
				Stop				
39361	gcatatactt	ggcaagaaat	ccgagcacct	cagaaagtgg	attgccgtca			
39411	catatcagtt	cgaccacccc	tgcacctagc	catgcggcgc	tttgacggtc			
39461	tttggggcta	cacatcataa	agtacttttc	catggcttct	ataagcacct			

Abbildung Anhang: Die Sequenz des Glykoprotein H des Humanen Herpesvirus 8. In der ersten Spalte Angabe der Lage der DNA im Gesamtgenom. In den hinteren Spalten Angabe der Lage der DNA innerhalb des HHV 8. Fett gedruckt die Start- und Stopkodons und die in dieser Arbeit benutzten Restriktionsenzymschnittstellen. Dargestellt ist nur der 5‘-3‘ DNA-Strang.

Mein Dank gilt der ganzen Abteilung für Virologie.

Insbesondere natürlich Herrn Prof. Dr. Thomas Mertens. Er war wirklich ein toller Chef, hat meine Arbeit immer begleitet und mir mit Rat und Tat beigestanden wo er konnte.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. Albert Zimmermann danke ich für die interessante Themenstellung und für die gute Einarbeitung und Betreuung während des praktischen und des theoretischen Teils der Arbeit. Die Zusammenarbeit mit ihm war spitze. Er hat mir mit seinen Ideen und Vorschlägen bei der Lösung der schwierigsten Probleme geholfen und den größten Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Auch nach seinem Wechsel ans Robert-Koch-Institut hat er mich weiter betreut und mit vielen hilfreichen Vorschlägen den schriftlichen Teil der Arbeit unterstützt.

Außerdem danke ich Frau Dr. Heike Wilts für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ihre letzten Ratschläge und Verbesserungen waren gründlich, kritisch und konstruktiv.

Allen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für das hervorragende Betriebsklima und die nette und spaßige Zusammenarbeit. Ich bin immer gerne ins Labor gegangen. Und alle waren immer bereit, zu helfen und zu unterstützen.

Zum Schluß möchte ich noch meinen Eltern und meinem Mann danken. Sie haben diese Arbeit erst ermöglicht. Und am Ende haben sie noch Baby gesittet. Und Caroline danke ich für die Zeit, in der sie mich als liebes Baby arbeiten ließ.