

Untersuchung des Einflusses des Kaposi Sarkom-assoziierten Herpesvirus auf Histonmodifikationsmuster der Wirtszelle

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Daniel Pohlmann

Hamburg, März 2018

Tag der Disputation: 29.06.2018

Gutachter:

Prof. Dr. Adam Grundhoff

Prof. Dr. Wolfgang Streit

Zusammenfassung

Das Kaposi-Sarkom-Herpesvirus ist das ätiologische Agens diverser humaner Tumorerkrankungen. Es besitzt einen biphasischen Lebenszyklus. Während der lytischen Phase wird das virale Genom vollständig exprimiert und neue Viruspartikel gebildet. In der latenten Phase hingegen wird nur eine kleine Teilmenge viraler Gene exprimiert, sodass das Virus unerkannt von der Immunantwort des Wirts persistieren kann. Epigenetische Mechanismen, insbesondere Histonmodifikationen, scheinen eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Transkription während der Latenz zu spielen. Mangels eigener Proteine zur Etablierung von Histonmodifikationen muss das Virus auf zelluläre Proteine zurückgreifen. Dies führt zu der Hypothese, dass diese Interaktionen die zellulären Histonmodifikationen und damit potentiell die Transkription beeinflussen können.

Die Untersuchung der Änderungen von Transkription und Histonmodifikationen in Folge einer *de novo* KSHV-Infektion wurde in HDF- sowie in MC116-Zellen durchgeführt. In HDFs zeigte sich, dass Differenzen in der Transkription im Wesentlichen auf zelluläre Reaktionen auf die Infektion zurückgehen und über die Zeit abnehmen. Auch für die Histonmodifikationen ließen sich nur wenige Änderungen feststellen. Interessantester Ansatzpunkt war die Anreicherung der H3K27me3 am TSHZ2-Gen, einem potentiellen Tumorsuppressor. Des Weiteren ließ sich trotz der Korrelation von Histonmodifikationen und Transkription keine Schnittmenge bei den jeweils detektierten Änderungen feststellen.

Wie in den HDF-Zellen zeigten sich auch für die MC116 nur wenige Änderungen in Transkription und Histonmodifikationen. Jedoch konnte hier für zwei Gene sowohl für die Transkription als auch die Histonmodifikationen signifikante Änderungen festgestellt werden. Die genauere Untersuchung eines dieser Gene (TNFRSF1b) ergab jedoch, dass daraus keine funktionalen Konsequenzen resultierten. Wie sich zeigte hatten die Veränderungen keinen Einfluss auf den Protein-Level. Dies legt den Schluss nahe, dass die Zelle die Änderungen der Transkription über regulatorische Mechanismen kompensiert. Weitere interessante Differenzen der Histonmodifikationen, jedoch ohne Änderung der Transkription, zeigten die Gene EGFR, FGF12 und IGF1R. Die Änderungen könnten Prädispositionen für spätere Expressionsänderungen darstellen und stellen somit interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen dar.

Abstract

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is the etiologic agent of several human tumors. It has a biphasic lifecycle, which is divided in the latent- and the lytic phase. During the latter the entire viral genome is expressed and new viral particles are produced. In contrast, during latency only a small subset of viral genes is expressed, such that the virus can persist without inducing the host's immune response. Epigenetic Modifications, especially histone-modifications, play an important role in the regulation of latent gene expression. Since the viral genome does not code for proteins which directly establish or erase these modifications, the virus must interact with cellular proteins to induce chromatin changes. These interactions could lead to changes in cellular histone-modification levels and potentially to changes in gene transcription.

For the investigation of the impact of *de novo* KSHV infection on transcription and histone-modifications, human dermal fibroblasts (HDF) and MC116 (B-cell-lymphoma) were used. In HDF-cells, changes in transcription seem to be primarily caused by the cellular reaction to the infection and diminish over time. Also, there were only few changes in the levels of histone-modifications. The most interesting of these differential genes is TSHZ2, which is a possible tumor-suppressor and showed enriched levels of H3K27me3. Furthermore, no correlation between changes in transcription and changes in histone-modifications could be detected, although in general transcription and histone modifications showed the expected correlation.

Like in HDF-cells, only few changes in transcription and histone modifications could be detected for the MC116-cells. However, significant changes of both transcription and histone-modifications could be detected for two genes. Investigation of one of these genes (TNFRSF1b) showed no functional consequences of the detected changes. Analysis of the protein levels showed no changes in TNFRSF1b-levels. Therefore the cells somehow seem to compensate the changes in transcription via other regulatory mechanisms. Further interesting genes which showed differential histone-modification-levels were EGFR, FGF12 and IGF1R. Although these did not show any changes in transcription, the changes in histone-modification-levels could act as a predisposition for later changes in transcription. Therefore these genes are of high interest for future investigations.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Herpesviridae	1
1.2	Das Kaposi-Sarkom-Herpesvirus	3
1.2.1	Geschichte	4
1.2.2	Morphologie und Genomstruktur	5
1.2.3	Viraler Lebenszyklus	7
1.2.4	Latenz	9
1.2.5	Lytischer Zyklus	12
1.3	KSHV-assoziierte Krankheiten	16
1.3.1	Kaposi-Sarkom	16
1.3.2	Primäres Effusionslymphom (PEL)	17
1.3.3	Multizentrischer Morbus Castleman (MCD)	18
1.4	Epigenetische Modifikationen	19
1.4.1	DNA-Methylierung	20
1.4.2	Histonmodifikationen	20
1.4.3	Epigenetische Modifikationen und KSHV	26
2	Zielsetzung	28
3	Material	29
3.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	29
3.2	Antikörper	29
3.2.1	Primärantikörper	29
3.2.2	Sekundärantikörper	29
3.3	Geräte	29
3.4	Oligonukleotide	30
3.5	Kits und kommerzielle Systeme	31
3.6	Software	31
3.7	Zelllinien	32
4	Methoden	33
4.1	Molekularbiologische Methoden	33
4.1.1	Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)	33
4.1.2	RNA-Isolation	36
4.1.3	cDNA-Synthese	37
4.1.4	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>quantitative real-time PCR</i>)	38
4.2	Biochemische Methoden	39
4.2.1	Isolation von Protein aus Zellen	39
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
4.2.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
4.2.4	Western Blot	40
4.2.5	Immunfluoreszenz	42

4.3	Zellbiologische Methoden	42
4.3.1	Kultivierung adhärenter eukaryotischer Zellen	42
4.3.2	Kultivierung von Suspensionszellen	42
4.3.3	Präparation von KSHV-haltigen Überständen	43
4.3.4	<i>De novo</i> KSHV-Infektion.....	43
4.3.5	Antibiotikaselektion rKSHV-infizierter MC116-Zellen.....	43
4.3.6	Apoptose-Assay	44
4.4	Hochdurchsatz-Sequenzierung.....	44
4.4.1	ChIP-Sequenzierung	45
4.4.2	RNA-Sequenzierung.....	46
5	Ergebnisse	47
5.1	Analyse humaner dermaler Fibroblasten	47
5.1.1	<i>De novo</i> Infektion humaner dermaler Fibroblasten.....	48
5.1.2	Transkriptomanalyse infizierter HDF-Zellen	50
5.1.3	Analyse der Histonmodifikationen infizierter HDF-Zellen	57
5.1.4	Korrelation der RNA-seq und ChIP-seq Daten der HDF-Zellen	67
5.1.5	Zusammenfassung	72
5.2	Analyse der B-Zelllinie MC116.....	74
5.2.1	<i>De novo</i> Infektion der humanen B-Zelllinie MC116	75
5.2.2	Kontrolle der Funktionalität des rKSHV in MC116-Zellen.....	76
5.2.3	Transkriptomanalyse infizierter MC116-Zellen	80
5.2.4	Analyse der Histonmodifikationen infizierter MC116-Zellen	84
5.2.5	Korrelation der RNA-seq und ChIP-seq Daten der MC116-Zellen	91
5.2.6	Analyse des TNFRSF1b in MC116-Zellen.....	95
5.2.7	Zusammenfassung	104
6	Diskussion.....	105
6.1	Interpretation der Transkriptionsanalyse <i>de novo</i> -infizierter HDF- und MC116-Zellen	106
6.2	Interpretation der Analyse der Histonmodifikationen <i>de novo</i> infizierter HDF- und MC116-Zellen	112
6.3	Einschätzung der Bedeutung der schwachen Korrelation differentieller Transkription und Histonmodifikationen.....	114
6.4	Funktionelle Analyse des differentiellen Gens TNFRSF1b	118
6.5	Einfluss der gewählten Zellsysteme und des Versuchsaufbaus auf die Ergebnisse.....	120
7	Schlussfolgerung und Ausblick	124
8	Abkürzungsverzeichnis	127
9	Literatur	130
10	Anhang.....	144
11	Danksagung	153
12	Eidesstattliche Versicherung.....	155

1 Einleitung

1.1 Herpesviridae

Die Mitglieder der Familie Herpesviridae sind große, membranumhüllte Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom (dsDNA). Die Familie wird in die Subfamilien alpha-, beta- und gamma-Herpesviren unterteilt, welche sich vor ungefähr 180-220 Millionen Jahren entwickelten (McGeoch et al. 1995). Die beiden anderen Familien, Alloherpesviridae und Malacoherpesviridae, eingeschlossen umfasst die Ordnung der Herpesvirales über 130 Spezies, welche Tiere und Menschen infizieren können (Brown & Newcomb 2011).

Der Name Herpesviridae leitet sich von dem griechischen Wort *herpein* ("kriechen, schleichen") ab und bezieht sich auf eines der Kennzeichen der Herpesviren: Die lebenslange latente Infektion des Wirts. Diese verläuft zumeist asymptomatisch, da das Virus zu großen Teilen inaktiv ist. Die virale Genexpression beschränkt sich auf latenzassoziierte Proteine, welche beispielweise für den Erhalt des viralen Genoms oder die Manipulation der Wirtszelle (z.B. zur Immunevasion) verantwortlich sind. In dieser Phase findet somit keine virale Replikation statt und das Virus kann unerkannt vom Immunsystem des Wirts persistieren. Dabei liegt das Genom in Form eines zirkularisierten Episoms im Nukleus der Wirtszelle vor. Die meisten Herpesviren etablieren ein Reservoir latent infizierter Zellen in einem bestimmten Zelltyp, welcher sich jedoch von Virus zu Virus unterscheidet (z.B. Herpes-Simplex in Neuronen des Spinalganglions). Jedoch kann es jederzeit zu einer Reaktivierung und somit zum Übergang in die lytische Phase kommen. In dieser wird das gesamte virale Genom exprimiert und neue Viruspartikel gebildet, sodass die Dissemination des Virus im Wirt sowie die Transmission zum neuen Wirt ermöglicht werden. Letztendlich führt dieser lytische Zyklus zum Tod der Wirtszelle. In vielen Fällen ist die lytische Phase mit der Ausbildung spezifischer Krankheitsbilder assoziiert, wie z.B. Herpes Zoster ("Gürtelrose") oder Herpes labialis. Doch auch die latente Infektion kann zur Ausbildung von Krankheiten führen, wenngleich dies deutlich seltener vorkommt. Meist geschieht dies im Zusammenhang mit dem Verlust der Immunkompetenz. Als Folge kann es beispielsweise zur Entstehung von Tumoren kommen.

Neben der latenten Infektion teilen alle Herpesviren weitere Eigenschaften: Sie kodieren eine große Anzahl von Enzymen, die in den Nukleinsäuremetabolismus

involviert sind, die Synthese der viralen DNA und die Assemblierung der Kapside findet im Nukleus statt und die Produktion neuer viraler Partikel führt zum Tod der Wirtszelle.

Derzeit sind neun humanpathogene Herpesviren bekannt: Herpes-Simplex-Virus 1 und 2 (HSV-1 und HSV-2) und das Varizella-Zoster-Virus (VZV) gehören zur Subfamilie der Alphaherpesvirinae; Cytomegalovirus (HCMV); Humanes Herpesvirus 6A und 6B (HHV-6A und HHV-6B) und das Humane Herpesvirus 7 (HHV-7) zur Subfamilie der Betaherpesvirinae, Epstein-Barr-Virus (EBV) und Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) zur Subfamilie der Gammaherpesvirinae (Carter & Saunders 2013).

Gammaherpesviren werden weiterhin in die beiden Genera Lymphocryptovirus, welchem EBV zugeordnet wird, und Rhadinovirus, zu dem KSHV zählt, unterteilt. Diese sind mit unterschiedlichen Tumoren in ihrem natürlichen Wirt assoziiert und zählen somit zu den humanen Tumoviren. Derzeit sind sieben dieser Onkoviren bekannt und man geht davon aus, dass diese für 10-15% aller Krebserkrankungen des Menschen verantwortlich sind (Martin & Gutkind 2008).

Tabelle 1-1: Übersicht über humane Onkoviren und die assoziierten Tumore.

Name	Familie	Assoziierte Tumore
Epstein-Barr-Virus	Herpesviridae	Burkitt-, Hodgkin-Lymph., NPC
Hepatitis B Virus	Hepadnaviridae	Leberzellkarzinom
Hepatitis C Virus	Flaviviridae	Leberzellkarzinom
Humanes Papillomavirus	Papillomaviridae	Diverse u.a. Zervixkarzinom
Humanes T-lymphotropes Virus	Retroviridae	Adulte T-Zell Leukämie
Kaposi-Sarkom-Herpesvirus	Herpesviridae	KS, PEL, MCD
Merkelzell-Polyomavirus	Polyomaviridae	Merkelzellkarzinom

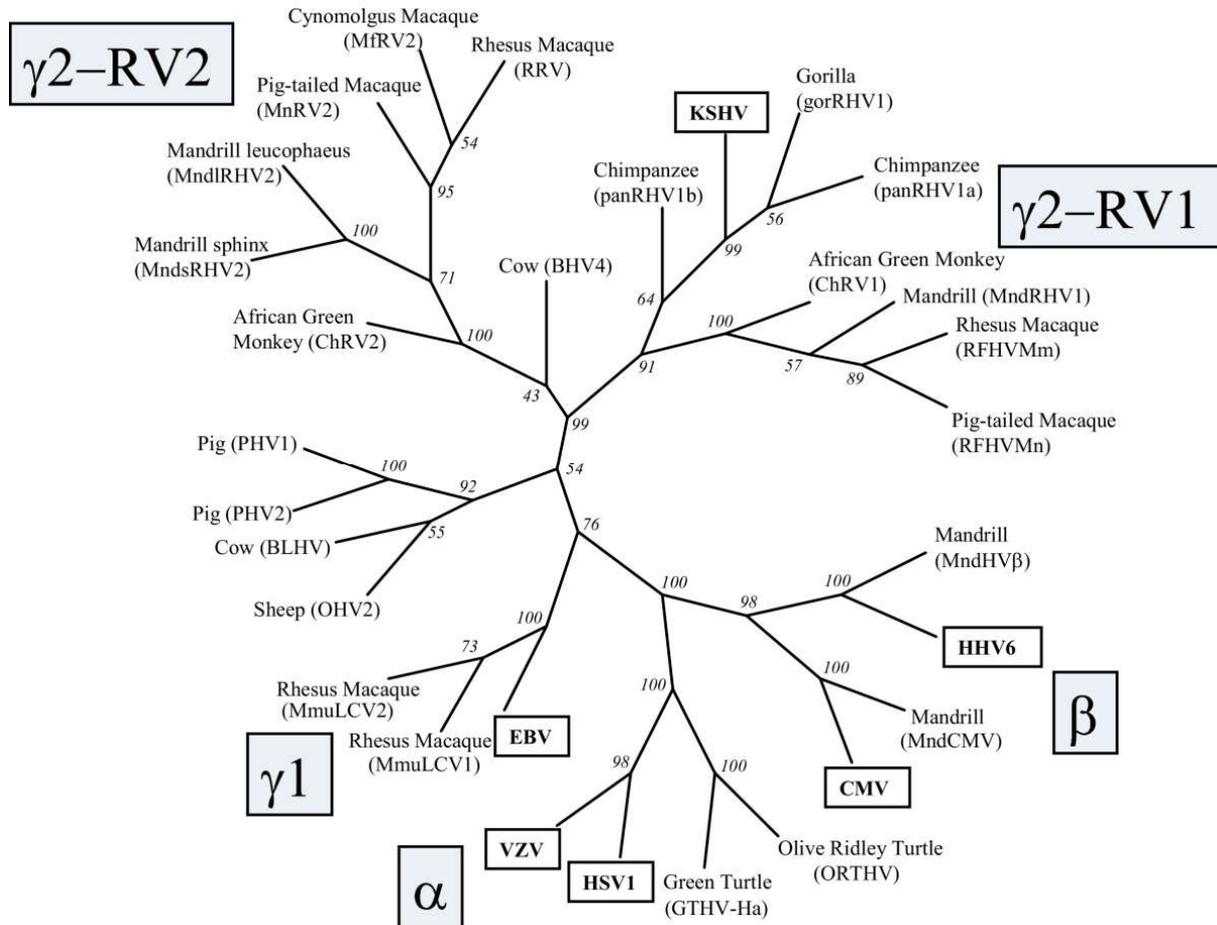


Abbildung 1-1: Phylogenetischer Baum der Familie Herpesviridae

Diese Grafik basiert auf der phylogenetischen Analyse der DNA-Polymerase Sequenzen unterschiedlicher Herpesviren. Humanpathogene Herpesviren sind mit einem Kästchen umrahmt (Rose, 2005).

1.2 Das Kaposi-Sarkom-Herpesvirus

Das Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) oder humane Herpesvirus 8 (HHV-8) ist ein großes, doppelsträngiges DNA-Virus, welches dem Genus Rhadinovirus in der Subfamilie der Gammaherpesviren angehört. Wie auch für andere Herpesviren charakteristisch etabliert KSHV eine lebenslange chronische Infektion. Das Virus etabliert ein Reservoir infizierter Zellen, in denen es in einem Zustand der Latenz vorliegt. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass der überwiegende Teil des viralen Genoms nicht transkribiert wird und lediglich die essentiellen Gene zum Erhalt des Virus in der Zelle exprimiert werden. Auf diesem Weg entgeht das Virus der Immunantwort und somit der Eradikation. Für die Infektion neuer Wirte ist jedoch die Produktion neuer viraler Partikel und somit der Eintritt in den lytischen Zyklus notwendig. In den folgenden Abschnitten wird ein detaillierter Blick auf Geschichte,

Struktur und Lebenszyklus des KSHV sowie auf die assoziierten Krankheiten geworfen.

1.2.1 Geschichte

Im Zuge der AIDS Pandemie kam es in westlichen Ländern zu einer stark erhöhten Inzidenz des Kaposi-Sarkoms (KS), einer entzündlichen, angioproliferativen kutanen Läsion, welche erstmals im Jahr 1872 durch Moritz Kaposi beschrieben wurde (Kaposi 1872). Ursprünglich trat diese Erkrankung vor allem im Mittelmeerraum bei älteren Männern sowie in Afrika auf, wohingegen sie in Amerika und Westeuropa sehr selten vorkam. Mit der Entwicklung von immunsuppressiven Therapien, beispielsweise zur Organtransplantation, trat eine weitere Form des KS in den 70ern auf (Penn 1979). Diese iatrogene Form zeichnete sich durch einen deutlich aggressiveren, häufig tödlichen Verlauf aus. Die geographische Verteilung und die epidemiologischen Daten legten nahe, dass es sich bei der Ursache des KS um ein Virus handeln könnte, welches besonders bei Immunsuppression Tumore verursachen kann.

Die starke Korrelation von HIV-Infektion und dem Auftreten des KS führte zu der ursprünglichen Annahme, dass HIV selbst das ätiologische Agens des KS sein könnte. Jedoch gab es diverse Hinweise, die einen anderen Erreger als HIV als Auslöser für das KS nahelegten. Zum einen wurde die Erkrankung bereits vor der AIDS-Pandemie und unabhängig von HIV beschrieben. Zum anderen zeigte sich, dass innerhalb der Population der HIV-Infizierten unterschiedliche Gruppen differierende Risiken für die Entwicklung des KS aufwiesen. So trat dies vor allem in Individuen auf, welche sich auf sexuellem Weg mit HIV infiziert hatten, hauptsächlich homo- oder bisexuelle Männer (Beral et al. 1990). Im Vergleich hierzu war die KS-Rate bei Individuen, die sich auf nicht-sexuellem Weg mit HIV infiziert hatten, beispielsweise bei Bluttransfusionen, jedoch gleichsam immunsupprimiert waren, sehr gering. Diese Erkenntnis legte nahe, dass es sich beim Auslöser um ein Virus handelt, welches auf sexuellem Weg übertragen wird (Beral et al. 1990). Entscheidende Merkmale des bisher unbekanntes Erregers waren die effektive Transmission auf (homo)sexuellem Weg und die geringe Übertragbarkeit über Blut sowie die nötige Immunsuppression zur Ausbildung des Krankheitsbildes.

Erst im Jahr 1994 gelang Chang und Moore der Nachweis von Fragmenten des KSHV-Genoms mittels repräsentativer Differenzanalyse (*representational difference analysis*, RDA). Hierzu verglichen sie DNA aus KS-Läsionen mit DNA aus gesundem Gewebe desselben Patienten. Nach diesem Durchbruch gelang es innerhalb von zwei Jahren das komplette virale Genom zu sequenzieren (Russo et al. 1996).

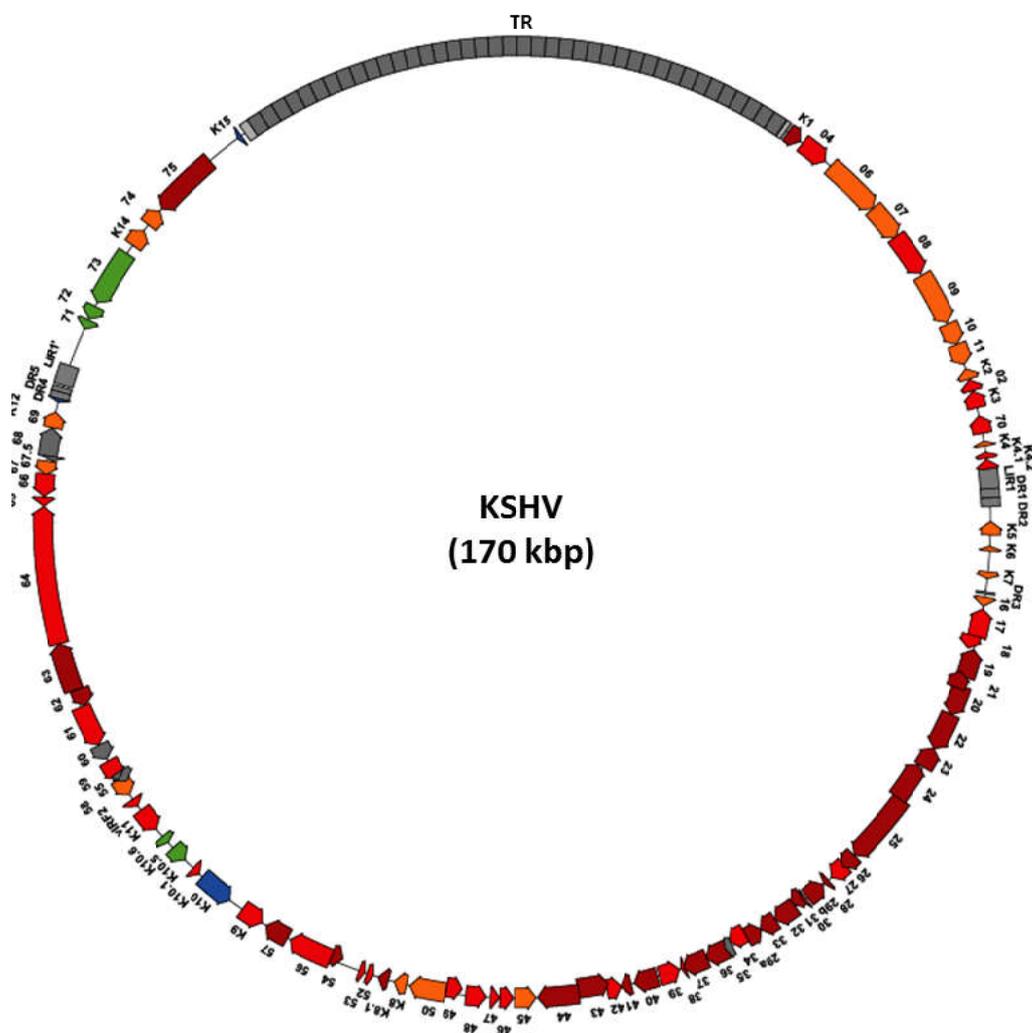
1.2.2 Morphologie und Genomstruktur

Das KSHV-Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA und umfasst ca. 165 - 170 kb (Renne, Lagunoff, et al. 1996). Dieses unterteilt sich in einen ca. 140 kb großen, codierenden Bereich, welcher sämtliche offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) enthält (Russo et al. 1996), und die diesen Bereich flankierenden terminalen Repetitionen (*terminal repeats*, TR). Letztere sind eine Aneinanderreihung einer 801 bp langen, GC-reichen Sequenz. Die TR umfassen ca. 20 - 25 kb des viralen Genoms, die genaue Anzahl der Wiederholungen variiert zwischen unterschiedlichen Isolaten (Lagunoff & Ganem 1997). Obwohl die TRs keine ORFs enthalten, erfüllen sie wichtige Funktionen im viralen Lebenszyklus. So dienen sie beispielsweise als Replikationsursprung (ORI) für die Replikation des viralen Genoms während der Mitose und als Bindungsstelle für das virale latenzassoziierte nukleäre Antigen (*latency associated nuclear antigen*, LANA), welches die Anheftung des viralen Episoms an die DNA der Wirtszelle während der Zellteilung vermittelt (Ballestas et al. 1999; Hu et al. 2002; Grundhoff & Ganem 2003; Verma et al. 2007). Die DNA liegt im Virion in einem nicht-chromatinisierten, epigenetisch naiven Zustand vor, sie enthält also weder Histone noch epigenetische Modifikationen der DNA wie z.B. DNA-Methylierungen (Zhu et al. 2005).

Die Annotation des KSHV-Genoms orientiert sich an der des Herpes-Virus-Saimiri (HVS), welches ein naher Verwandter des KSHV ist. Die ORFs des KSHV wurden entsprechend ihren HVS-Homologen durchnummeriert (ORF1 - ORF 75). Die KSHV-spezifischen ORFs wurden von links nach rechts durchnummeriert, zur Differenzierung jedoch mit dem Buchstaben "K" versehen (K1 - K15). Viele dieser spezifischen ORFs codieren für Signalmoleküle, welche virale Homologe zu zellulären Genen darstellen. Neben diesen Bereichen enthält das KSHV-Genom noch diverse nicht-codierende RNAs (ncRNAs). Dazu zählen die elf

latenzassoziierten micro-RNAs (miRNA), welche alle vom selben Gen-Locus in der Latenzkassette exprimiert werden (Cai et al. 2005; Samols et al. 2005), sowie die während der lytischen Phase transkribierte polyadenylierte nukleäre RNA (PAN-RNA; Sun et al. 1996; Zhong et al. 1996; Zhong & Ganem 1997).

Die Replikation der viralen DNA während der lytischen Phase hat einen anderen Ursprungsort als während der Mitose. Sie beginnt an den lytischen Replikationsursprüngen (ORI-lyt), zwei nahezu identischen Elementen, die sich in nicht-codierenden Bereichen des Genoms außerhalb der LTRs befinden. Diese bestehen aus einer ca. 1,2 kb langen, nahezu identischen Sequenz sowie 600 bp an GC-reichen Wiederholungen strangabwärts (Lin et al. 2003).



Das virale Genom ist in ein ikosaedrisches Kapsid mit 20 dreieckigen Oberflächen eingebettet. Die einzelnen Einheiten des Kapsids werden als Kapsomere bezeichnet und bestehen aus Pentameren (Pentons) bzw. Hexameren (Hexons) des viralen Strukturproteins ORF25. Jedes Kapsid besteht aus 150 Hexons, welche die Flächen bilden, und 12 Pentons, die an den Schnittpunkten der Flächen sitzen. Diese werden durch heterotrimere Komplexe, bestehend aus einer Kopie des ORF62 und zwei Kopien des ORF26, miteinander verbunden. Insgesamt enthält das Kapsid 320 dieser als Triplete bezeichneten Proteinkomplexe (Nealon et al. 2001; Trus et al. 2001; Wu et al. 2000).

Das Kapsid wird von einer Lipid-Doppelschicht umhüllt. Sie enthält auf ihrer Oberfläche diverse virale Glykoproteine, die für die Anlagerung und Fusion mit der Membran der Wirtszelle verantwortlich sind. Da die virale Membran durch den Vorgang der Knospung aus der Zellmembran entsteht, enthält sie neben den viralen Proteinen auch Proteine der Wirtszelle (siehe 1.2.5). Zwischen Kapsid und Membran befindet sich das Tegument, welches vor allem aus verschiedenen viralen Proteinen besteht, jedoch auch mRNAs und einige zelluläre Proteine enthält. Da das Tegument im Anschluss an die Fusion mit der Zellmembran in der Wirtszelle freigesetzt wird, stehen die hier enthaltenen Proteine und mRNAs bereits früh nach der Infektion zur Verfügung, bevor die virale Transkription einsetzt. Die genaue Funktion der Tegument-Proteine ist zumeist nicht abschließend geklärt, jedoch geht man, auch auf Grund der Homologie zu Tegument-Proteinen anderer Herpesviren mit bekannten Funktionen, von einem breiten Funktionsspektrum aus, das unter anderem die Assemblierung viraler Partikel, den Eintritt in die Wirtszelle und regulatorische Funktionen einschließt. Für genauere Informationen siehe Sathish et al. 2012.

1.2.3 Viraler Lebenszyklus

Zu Beginn des viralen Lebenszyklus steht die Infektion der Wirtszelle. Die hierin involvierten viralen Proteine sind die Glykoproteine, vor allem K8.1, gB, gL und gH (Wang et al. 2003; Pertel 2002). Die initiale Anlagerung an die Wirtszelle findet über die Interaktion der viralen Glykoproteine K8.1 und gB mit auf der Zelloberfläche präsentem Heparansulfat statt (S M Akula et al. 2001; Birkmann et al. 2001; Shaw M Akula et al. 2001). Jedoch handelt es sich hierbei nicht um den eigentlichen

Rezeptor, da das Entfernen von Heparansulfat von der Zelloberfläche oder auch der knockout von K8.1 zwar zu einer Reduktion, jedoch keinem vollständigen Verlust der Infektiosität von KSHV führte (Luna et al. 2004; Shaw M Akula et al. 2001). Vielmehr geht man davon aus, dass durch die Anlagerung die Bindung an die eigentlichen Rezeptoren erleichtert wird.

Abhängig vom Zelltyp gelangt das Virus über Endozytose, Clathrin-medierte Endozytose oder Makropinozytose in die Zelle (Inoue et al. 2003; Rappocciolo et al. 2008; Raghu et al. 2009; Akula et al. 2003). Nach der Anlagerung erfolgt, je nach Aufnahmemechanismus, die Bindung an die Integrine $\alpha 3\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$, DC-SIGN, die Rezeptortyrosinkinase EphA2 und den Cystin/Glutamat-Transporter xCT (Akula et al. 2002; Veettil et al. 2008; Kaleeba & Berger 2006; Hahn et al. 2012). Die Bindung an die Rezeptoren löst zusätzlich Signalkaskaden in der Zelle aus, welche die Infektion begünstigen. Unter Anderem induziert KSHV FAK, src, PI3-K und Rho-GTPasen (Sharma-Walia et al. 2004; Veettil et al. 2006; Naranatt et al. 2003). Als Folge der Bindung und der ausgelösten Signalkaskaden kommt es durch die oben erwähnten Mechanismen letztendlich zur Fusion der viralen Membran mit der Membran der Wirtszelle, bzw. des Endosoms. Für eine detailliertere Beschreibung des Eintritts in die Wirtszelle siehe Kumar & Chandran 2016.

Nach Abschluss der Membranfusion werden das Kapsid und das umgebende Tegument in das Zytosol freigesetzt. Für den Transport des Kapsids zum Zellkern verwendet das Virus das zelluläre Mikrotubuli-Netzwerk. Dieses wird vom Virus z.B. über die Manipulation von Rho-GTPasen beeinflusst. Über das Motorprotein Dynein wird das Kapsid entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Naranatt et al. 2005). Nahe des nukleären Porenkomplexes (*nuclear pore complex*, NPC) kommt es zur Disassemblierung des Kapsids und das freigesetzte Genom gelangt über die Kernporen in den Zellkern. Der genaue Ablauf dieses Vorganges ist noch nicht bekannt.

Im Zellkern wird das lineare KSHV-Genom zirkularisiert. Des Weiteren wird die epigenetisch naive DNA chromatinisiert, d.h. sie wird, wie das zelluläre Genom, mit Histonen besetzt und durch histonmodifizierende Proteine mit epigenetischen Modifikationen versehen. Diese Vorgänge haben folgende Funktionen: Der Schutz des viralen Genoms vor der "DNA damage response", die Sicherung von Replikation

und Erhalt des Episoms bei der Zellteilung und die Regulation der viralen Genexpression (Uppal et al. 2014).

Wie alle Herpesviren besitzt KSHV einen dualen Lebenszyklus. Das Virus kann entweder latent in der Zelle vorliegen oder den lytischen Zyklus einleiten, sich replizieren und so weitere Zellen bzw. einen weiteren Wirt infizieren (siehe 1.1). Nach Abschluss der oben beschriebenen Vorgänge und mit dem Einsatz der viralen Genexpression entscheidet sich nun ob das Virus in die Latenz oder die lytische Phase eintritt.

1.2.4 Latenz

Die Latenz ist das transkriptionelle Standardprogramm des KSHV nach der Infektion einer Zelle. Sie muss gewährleisten, dass die virale Genexpression, mit Ausnahme der Latenzproteine, reprimiert wird und dennoch das virale Genom erhalten bleibt sowie Replikation und Segregation auf die Tochterzellen während der Mitose erfolgt. Außerdem muss das Überleben der Wirtszelle gesichert werden. Nahezu alle im Laborversuch infizierten Zellen weisen ein latentes Expressionsprofil nach der Infektion auf. Jedoch muss dieses erst etabliert werden. So kommt es unmittelbar nach der Infektion auch zur vorübergehenden Expression lytischer Gene (Krishnan et al. 2004). Im Gegensatz zur realen lytischen Phase, in der alle viralen Gene in einer sequentiell regulierten Kaskade exprimiert werden, erfolgt diese initiale Expression nicht für alle Gene und scheint nicht strukturiert. Folgerichtig werden bei dieser auch keine neuen Viruspartikel gebildet. Nach etwa 24 h ist die Latenz etabliert und die transiente Expression lytischer Gene endet. Ursache und Funktion dieser anfänglichen Expression lytischer Gene sind nicht abschließend geklärt. Da viele dieser Gene eine immunmodulierende oder antiapoptotische Funktion aufweisen ist es möglich, dass auf diesem Weg eine zusätzliche Manipulation der Wirtszelle stattfindet um die Infektion zu begünstigen (Krishnan et al. 2004). Außerdem könnte die Präsenz geringer Mengen des lytischen Schalterproteins RTA (Replikations- und Transkriptionsaktivator, *replication and transcription activator*), welches teilweise in den Viruspartikeln vorliegt, die Expression auslösen (J. T. Bechtel et al. 2005; Lan et al. 2005). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass mRNAs viraler lytischer Proteine, die während der Bildung neuer viraler Partikel in diese inkorporiert werden

und bei Infektion in der Wirtszelle freigesetzt werden, verantwortlich sind (J. Bechtel et al. 2005). Jedoch wurden nicht für alle detektierten Proteine die entsprechenden mRNAs in viralen Partikeln nachgewiesen, sodass dies nicht die alleinige Ursache sein kann. Schließlich könnte auch die fehlende bzw. sich erst etablierende Chromatinisierung des viralen Genoms die Ursache sein. So könnte beispielsweise das Fehlen repressiver Histonmodifikationen kurz nach Infektion zur Transkription lytischer Gene führen.

Während der Latenz werden vor allem drei virale Proteine exprimiert: LANA (ORF73), v-Cyclin (ORF72) und v-FLIP (ORF71). Die Transkription erfolgt von einem gemeinsamen Promotor, auch als LANA-Promotor bezeichnet. Aus den polycistronischen Transkripten entstehen über unterschiedliche Mechanismen die oben genannten Proteine, auf deren Funktionen in den nächsten Absätzen genauer eingegangen wird (Dittmer et al. 1998). Neben diesen Proteinen werden noch einige weitere latenzassoziierte Proteine transkribiert, die Kaposine (Sadler et al. 1999) und K10.5 (v-IRF3/LANA-2, Rivas et al. 2001), sowie einige latenzassoziierte miRNAs (Cai et al. 2005; Samols et al. 2005). Das genaue Muster der latenten Transkription unterscheidet sich je nach Wirtszelle (Rivas et al. 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass es, ähnlich wie bei EBV, nicht ein Latenzprogramm, sondern unterschiedliche, kontextabhängige Programme gibt, zwischen denen jedoch viele Gemeinsamkeiten herrschen.

Das virale Protein LANA (ORF73) lässt sich in drei Domänen unterteilen: Eine N-terminale Domäne, über die LANA an Chromatin binden kann (Pilot et al. 2001), eine zentrale Domäne mit zahlreichen sich wiederholenden Sequenzen saurer Aminosäuren und eine C-terminale, basische Domäne, über die LANA an die TR-Segmente des viralen Genoms binden kann (Ballestas & Kaye 2001; Cotter et al. 2001; Garber et al. 2002). Außerdem enthält es zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS), da LANA zur Ausübung seiner Funktionen im Zellkern vorliegen muss. Bei diesen Funktionen handelt es sich zum einen um die Rekrutierung der DNA-Replikationsmaschinerie der Wirtszelle zu den TRs des viralen Genoms um die semikonservative Replikation des viralen Genoms zu gewährleisten (Grundhoff & Ganem 2003; Hu et al. 2002; Lim et al. 2002). Andernfalls käme es zu einer Ausdünnung viraler Genome im Rahmen der Teilung der Wirtszelle. Zum anderen gewährleistet LANA während der Mitose den Erhalt und die gleichmäßige Verteilung

des viralen Episoms auf die Tochterzellen. Hierzu bindet es sowohl zelluläres Chromatin, genauer die Histone H2A und H2B, über den N-Terminus, als auch das virale Episom über den C-Terminus und koppelt diese somit aneinander. Somit wird durch die zellulären Mechanismen, welche für eine gleichmäßige Chromosomenverteilung sorgen, auch die Verteilung der Episome gewährleistet. Des Weiteren interagiert LANA mit zellulären Tumorsuppressor-Proteinen. So bindet es p53 und das Retinoblastom-Protein (Rb) und verhindert oder erschwert die auf diesen Wegen ausgelöste Apoptose (Radkov et al. 2000; Friborg et al. 1999). Darüber hinaus kann LANA die Expression zellulärer Gene auf unterschiedliche Weise beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von LANA an spezifische DNA-Elemente zur Repression assoziierter Gene führen kann (Schwam et al. 2000). Auch Transkriptionsfaktoren können durch LANA gebunden und so inhibiert werden (Lim et al. 2000). Neben diesen direkten Manipulationen der Genexpression der Wirtszelle kann LANA auch Proteine beeinflussen, welche für die Etablierung oder Entfernung epigenetischer Modifikationen verantwortlich sind (siehe 1.4.3 Epigenetische Modifikationen und KSHV).

V-Cyclin (ORF72) ist ein virales Homolog des zellulären Proteins Cyclin D. Es kann CDK6 binden und somit die Phosphorylierung von Rb bewirken (Chang et al. 1996; Godden-Kent et al. 1997). Auf diesem Weg wird die Zellproliferation begünstigt bzw. die Blockierung dieser durch CDK-Inhibitoren wie p27, p21 oder p16 überwunden (Swanton et al. 1997).

Das virale Protein v-FLIP (ORF71) ist ebenfalls ein Homolog eines zellulären Proteins. Das zelluläre Protein interagiert mit dem Fas-induzierten Apoptoseweg, im speziellen mit Caspase 8, und verhindert bzw. verringert das apoptotische Signal. Die Funktion des viralen Homologs ist deutlich unklarer. So gibt es bezüglich der homologen Funktion, der Inhibition der Fas-induzierten Apoptose, widersprüchliche Ergebnisse (Bélanger et al. 2001; Chugh et al. 2005). Jedoch konnte eindeutig eine Stimulation der Expression von NF- κ B (*nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells*) durch v-FLIP nachgewiesen werden (Chaudhary et al. 1999; Sun et al. 2003; Matta et al. 2003). Gleichzeitig konnte eine durch v-FLIP verursachte Phosphorylierung und damit Inaktivierung des NF- κ B Inhibitors I κ B gezeigt werden (L. Liu et al. 2002; Field et al. 2003). Diese Manipulationen führen zu einem NF- κ B-vermittelten anti-apoptotischen Signal. Auch Versuche in PEL-Zelllinien bestätigten

dies, da ein knockdown von v-FLIP in diesen zu einer Verringerung der NF- κ B-Aktivität und einer erhöhten Apoptoserate führte (Godfrey et al. 2005; Guasparri et al. 2004). Eine weitere mögliche Funktion einer erhöhten NF- κ B-Aktivität könnte der Erhalt der Latenz durch Repression lytischer Gene sein (Brown et al. 2003).

Ein Reservoir an KSHV-infizierten Zellen mit etablierter Latenz gewährleistet eine lebenslange Infektion des Wirts. Jedoch ist eine Verbreitung mangels Bildung neuer Viruspartikel nicht möglich. Hierfür muss das Virus aus seiner Latenz reaktiviert werden und in die lytische Phase übergehen.

1.2.5 Lytischer Zyklus

Der Eintritt in den lytischen Zyklus kann entweder direkt nach der Infektion erfolgen oder aber durch Reaktivierung aus der Latenz. Die genauen Ursachen für die *in vivo* Reaktivierung sind unklar. *In vitro* wird diese zumeist durch Phorbol-Ester und Histon-Deacetylase-Inhibitoren ausgelöst (Chen et al. 2001a; Lu et al. 2003). Auch wenn der genaue Mechanismus der Reaktivierung nicht bekannt ist, so ist bemerkenswert, dass Inhibitoren von Histonmodifikationen und DNA-Methyltransferasen den lytischen Zyklus auslösen können, was eine mögliche Bedeutung dieser epigenetischen Modifikationen für die Latenzerhaltung nahelegt. In Folge des aktivierenden Stimulus kommt es zu einer hochgradig geordneten Expressionskaskade viraler Gene. Zunächst werden die unmittelbaren frühen Gene (IE, *immediate early*), dann die verzögerten frühen Gene (DE, *delayed early*) und schließlich die späten Gene (L, *late*) exprimiert. Letztendlich kommt es zur Bildung und Freisetzung neuer viraler Partikel und zum Tod der Wirtszelle.

Der erste Schritt im lytischen Zyklus ist die Expression des Schalterproteins RTA (ORF50). Es agiert als transkriptioneller Aktivator für die lytische Kaskade und ist essentiell notwendig um diese auszulösen (Lukac et al. 1999). Gleichzeitig genügt die Expression von RTA auch in Abwesenheit anderer Faktoren zur Reaktivierung (Sun et al. 1998; Gradoville et al. 2000; Lukac et al. 1998). Interessant ist, dass es in Folge des aktivierenden Stimulus zu einer Remodulierung des Chromatin am ORF50-Promotor kommt, was einen zumindest zum Teil epigenetisch gesteuerten Mechanismus der Reaktivierung nahelegt (Lu et al. 2003). Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass sich am ORF50-Promotor sowohl aktivierende wie auch

reprimierende Histonmodifikationen befinden (Günther & Grundhoff 2010). Vermutlich kann durch dieses bivalente Chromatin eine schnelle Induktion von ORF50 durch Entfernen repressiver Modifikationen vermittelt werden, da das aktivierende Signal bereits vorhanden ist.

RTA besteht aus einer N-terminalen Domäne, welche an DNA binden kann und einer C-terminalen Effektor-Domäne, welche zu einer Aktivierung gebundener Genbereiche führt. Die Aktivierung der lytischen IE- und DE-Gene kann zum einen allein durch die Bindung von RTA in den Promotorbereichen erfolgen (Deng et al. 2002; Lukac et al. 2001), zum anderen kann RTA an das zelluläre Protein RBP-Jk binden (Liang et al. 2002). Dieser Komplex könnte für die Aktivierung von lytischen Genen verantwortlich sein, die nur eine schwache Aktivierung durch RTA alleine zeigen. Ein Hinweis hierfür ist, dass RBP-Jk-Bindestellen in Promotoren solcher Gene gefunden wurde und ein knockout dieses Proteins die Reaktivierung und Bildung neuer viraler Partikel stark beeinträchtigt (Liang et al. 2002; Liang & Ganem 2003). Neben RBP-Jk kann RTA noch mit zahlreichen weiteren zellulären Proteinen interagieren (z.B. C/EBP- α , Oct-1 oder STAT3) und seine Rekrutierung zu bestimmten Promotoren modulieren (Gwack et al. 2002; Sakakibara et al. 2001; Carroll et al. 2007). Des Weiteren kann es auch mit chromatin-modulierenden Proteinen wie CBP sowie SWI/SNF interagieren. Die Epigenetik scheint also, ähnlich wie in der Latenz durch LANA-vermittelte Interaktionen, auch für die lytische Reaktivierung von Bedeutung zu sein. Neben RTA gibt es noch weitere IE-Gene, z.B. ORF45 und K4.2.

In Folge der Expression des IE-Gens RTA wird die Expression der nächsten Stufe der lytischen Kaskade, der DE-Gene eingeleitet. Die Proteine dieser Klasse umfassen diverse Funktionen: Proteine mit enzymatischer oder akzessorischer Funktion bereiten die Zelle auf die virale DNA-Replikation vor. Weitere Proteine manipulieren die Wirtszelle indem sie die Immunantwort modulieren, die zelluläre Genexpression inhibieren (*host shutoff*) und die Signaltransduktion beeinflussen. Neben den Proteinen werden noch ncRNAs transkribiert, allen voran die PAN-RNA (Sun et al. 1996; Zhong et al. 1996; Zhong & Ganem 1997). Für einen detaillierten Überblick über die lytischen DE-Proteine und ihre Funktionen siehe Purushothaman et al. 2015.

In Folge der durch RTA initiierten Expression akkumulieren die DE-Proteine in der Wirtszelle. Es kommt zur Bildung von großen, multi-Proteinkomplexen im Nukleus, den sogenannten Replikationskomplexen (RC, *replication complexes*), in denen die lytische Replikation des DNA-Genoms stattfindet. Diese Komplexe binden an die lytischen Replikationsursprünge (siehe 1.2.2) auf dem viralen Genom (AuCoin et al. 2002). Die Replikation der DNA erfolgt nach dem *rolling-circle*-Prinzip. Hierbei wird der eine Strang des zirkulären Episoms geschnitten und fungiert als Primer während der ungeschnittene Strang als Vorlage für die Replikation dient. Die Polymerase kann die zirkuläre DNA dabei mehrfach umlaufen, sodass ein Strang konkatermerer viraler Genome entsteht. Dieser wird in späteren Schritten an den TR in einzelne virale Genome gespalten.

Mit Einsetzen der lytischen DNA-Replikation beginnt auch die Expression der L-Gene. Bei diesen handelt es sich zumeist um strukturelle Proteine, die für den Aufbau des Kapsids notwendig bzw. Teil der Membranhülle sind. Der genaue Mechanismus der Aktivierung der L-Gene ist nicht bekannt, jedoch scheint die aktive Replikation der zu transkribierenden Bereiche eine wichtige Rolle zu spielen. So konnten Chang und Ganem zeigen, dass Plasmide mit späten Promotoren, jedoch ohne ORI-lyt und damit ohne virale lytische Replikation, keine geordnete Expression der Reporter zeigten (Chang & Ganem 2000). Mit ORI-lyt Elementen hingegen zeigte sich eine deutlich höhere Reporter-Expression (Tang et al. 2004).

Nach der Translation werden die Kapsidproteine in den Nukleus transportiert. Dort werden sie zu Kapsiden assembliert, in die anschließend das virale Genom integriert wird. Der genaue Ablauf der Freisetzung der DNA-haltigen Kapside und der fertigen Partikel aus der Wirtszelle ist nicht vollständig erforscht. Vermutlich können die Partikel auf Grund ihrer Größe nicht über die NPCs exportiert werden. Stattdessen lagern sie sich an die Innenseite der Kernmembran an und werden via Knospung in die perinukleären Zwischenräume freigesetzt. Dabei werden sie von der inneren nukleären Membran umhüllt und erhalten so eine transiente Membranhülle. Es folgt die Translokation in das ER wo die transiente Virusmembran mit der Membran des ER fusioniert und das Kapsid in das Zytoplasma freigesetzt wird. In einem alternativen Modell erfolgt die Freisetzung ohne Beteiligung des ER. Nach Fusion mit der inneren Kernmembran wird das Partikel direkt in das Zytoplasma freigesetzt. Das nun unbehüllte Kapsid wird zum trans-Golgi-Netzwerk transportiert, in dessen

Membran die viralen Glykoproteine nach ihrer Expression akkumulieren. An den zytoplasmatischen Enden der Glykoproteine lagern sich die Tegument-Proteine an, die mit den Kapsiden interagieren. Es folgt die Umhüllung des Kapsids durch die Tegument-Proteine und die Golgi-Membran mit den viralen Glykoproteinen. Dies geschieht entweder direkt am trans-Golgi-netzwerk oder aber an vom Golgi-Apparat freigesetzten Vesikeln. Die membranumhüllten viralen Partikel werden über die Vesikel des trans-Golgi-Netzwerkes zur Plasmamembran transportiert und via Exozytose freigesetzt (Fields et al. 2001).

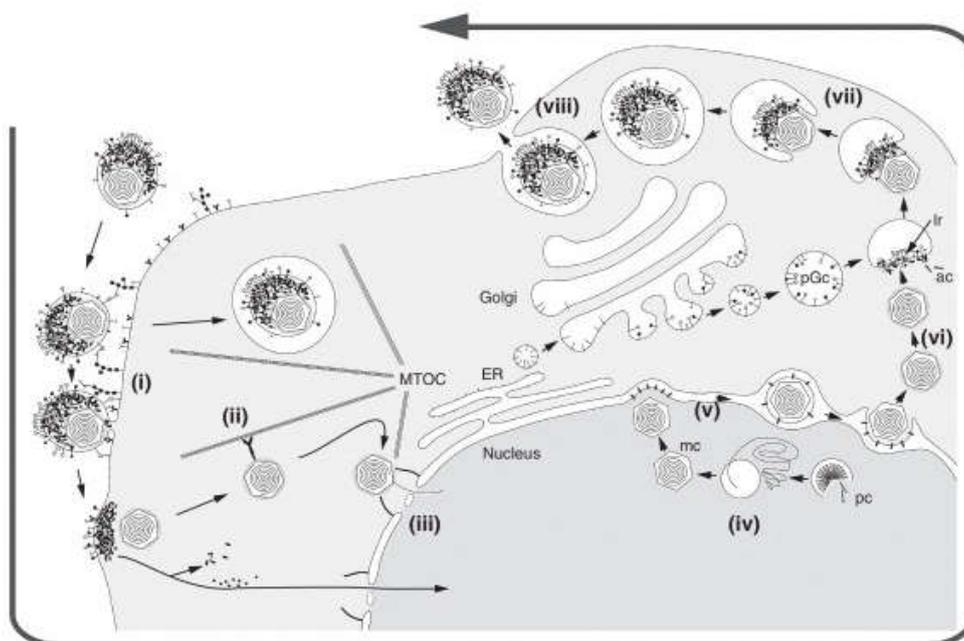


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des viralen Lebenszyklus mit lytischer Replikation (modifiziert nach Zeev-Ben-Mordehai et al. 2014)

I: Anlagerung des Virions an die Plasmamembran und Eintritt in die Wirtszelle via Membranfusion. Kapsid und Tegument werden in der Wirtszelle freigesetzt. **II:** Transport des Kapsids zum Nucleus entlang der Mikrotubuli. **III:** Freisetzung des viralen Genoms und Import in den Zellkern über die NPCs. Anschließend erfolgt die Zirkularisierung und Chromatinisierung des Genoms (nicht dargestellt). **IV:** DNA-Replikation und Assemblierung der Kapside. **V:** Austritt aus dem Nucleus durch Knospung in den perinukleären Raum. Freisetzung in das Zytoplasma durch Fusion der transienten Membranhülle mit der ER-Membran bzw. mit der äußeren Kernmembran. **VI:** Transport des unbehüllten Kapsids zum trans-Golgi-Netzwerk. **VII:** Akquisition von Tegument und Membranhülle am trans-Golgi-Netzwerk bzw. an freigesetzten Partikeln des trans-Golgi-Netzwerk sowie anschließender Transport zur Plasmamembran. **VIII:** Freisetzung des Virions durch Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran.

1.3 KSHV-assoziierte Krankheiten

1.3.1 Kaposi-Sarkom

Das Kaposi-Sarkom ist ein durch KSHV verursachter Tumor, der sich in Form von multifokalen blau-violetten Läsionen der Haut zeigt. Es ist kein klassischer Tumor, denn im Gegensatz zu diesen geht das KS nicht aus einem einzelnen Zelltyp bzw. einer einzelnen Zelle hervor, sondern besteht aus diversen Zelltypen (Herndier & Ganem 2001). Das KS ist abnorm stark mit Gefäßen durchsetzt, über die Blutzellen in das umgebende Gewebe austreten. Aus der Extravasation von Erythrozyten resultiert die charakteristische Farbe der Läsionen. Außerdem handelt es sich um einen Tumor mit einem stark inflammatorischen Milieu, woraus Schwellungen und Schmerz resultieren können. Wichtigster Bestandteil ist die Spindelzelle, deren Name von ihrer veränderten länglichen Form herrührt. Untersuchungen deuten darauf hin, dass sie endothelialen Ursprungs ist, wobei dies nicht abschließend geklärt ist. Sie ist der Zelltyp im KS, der stets eine KSHV-Infektion aufweist (Boshoff et al. 1995; Stürzl et al. 1997). Die Spindelzelle hat einen großen Anteil an dem oben erwähnten inflammatorischen Milieu, da sie proinflammatorische und angiogene Signale freisetzt (Ensoli et al. 1989).

Man unterscheidet vier unterschiedliche Formen des KS:

- Die klassische Form, welche ursprünglich durch Moritz Kaposi beschrieben wurde (siehe 1.2.1). Sie tritt häufig bei älteren Männern im Mittelmeerraum auf und zeigt einen chronischen, meist schmerzfreien Verlauf mit langsamer Progression. Häufig genügt die Exzision oder Radiatio der zumeist an den Füßen auftretenden Läsionen als Therapie. Unbehandelt kann es zur Metastasierung zunächst in die Lymphknoten und später weiter zu inneren Organen wie Leber und Lunge kommen (Fenig et al. 1998).
- Die endemische Form, die einen deutlich aggressiveren Verlauf als die klassische aufweist und nicht mit HIV assoziiert ist. Sie kommt vor allem im äquatorialen Afrika vor, wo das KS eine der häufigsten Tumorarten darstellt. Das endemische KS bricht deutlich früher als das klassische KS aus, wobei zwei Arten unterschieden werden: Das lymphadenopathische KS tritt meist bei Kindern bis zehn Jahren auf, und befällt direkt das Lymphsystem. Entsprechend schnell ist die Progression, sodass die Erkrankung meist innerhalb von drei Jahren zum Tod führt. Die kutane Form hingegen tritt

hauptsächlich bei Männern zwischen 20 und 50 Jahren auf (Cook-Mozaffari et al. 1998; Olsen et al. 1998; Friedman-Dann & Saltzman 1990).

- Die iatrogene Form kann durch die Einnahme von Immunsuppressiva z.B. in Folge einer Organtransplantation entstehen, sofern das transplantierte Organ oder der Patient bereits zuvor KSHV positiv ist (Luppi et al. 2000). Bei Einstellung der immunsuppressiven Therapie kommt es meist zu einer Regression des Tumors (Brooks 1986).
- Die AIDS-assoziierte Form, deren Ursache wie bei der iatrogenen Form die Immunsuppression ist, welche in diesem Fall jedoch durch das HI-Virus und den folgenden Verlust der CD4-T-Zellen verursacht wird. Auf Grund der häufigen Co-Übertragung zeigt sie ein epidemiologisches Muster und tritt unabhängig vom Alter auf. Durch die HIV-Therapie mittels cART (antiretrovirale Kombinationstherapie, *combined anti-retroviral therapy*) kommt es häufig zu einer Stagnation des Wachstums oder zur Rückbildung des KS ohne zusätzliche Chemotherapie (Lebbe et al. 1998; Gill et al. 2002; Cattelan et al. 2001).

Die KSHV-Infektion ist essentiell für die Entstehung des KS, jedoch als alleiniger Faktor nicht ausreichend. So liegt die KS-Rate in KSHV-Infizierten in Westeuropa und den USA bei lediglich ca. 0,01% pro Jahr (Hjalgrim et al. 1996; Iscovich et al. 2000; Geddes et al. 1994; Grulich et al. 1992). Um welche Co-Faktoren es sich dabei handelt ist, mit Ausnahme der iatrogenen und der AIDS-assoziierten Form, unklar, jedoch scheint das Immunsystem bzw. beeinflussende Faktoren häufig eine Rolle zu spielen.

1.3.2 Primäres Effusionslymphom (PEL)

Das PEL ist ein seltenes B-Zell-Lymphom, welches zumeist bei AIDS-Patienten im Endstadium auftritt. Die Proliferation der aberranten B-Zellen findet in den serösen Körperhöhlen wie der Pleura- oder Perikardhöhle statt, weswegen die Erkrankung auch als Lymphom der serösen Körperhöhlen bezeichnet wird (BCBL, *body cavity based lymphoma*). Im Gegensatz zum KS handelt es sich um eine klonale Expansion. Das KSHV-Genom ist in allen PEL-Zellen als zirkuläres Episom vorhanden (Cesarman, Chang, et al. 1995), häufig liegt auch eine Co-Infektion mit

EBV vor. Nur äußerst selten tritt die Erkrankung in Abwesenheit von KSHV und HIV auf (Youngster et al. 2006). Die Prognose für das PEL ist äußerst schlecht und die mittlere Überlebenszeit nach Diagnose liegt bei nur 2 Monaten (Komanduri et al. 1996). Erschwerend für die Therapie ist vor allem der gesundheitlich Zustand der Patienten im Endstadium von AIDS. Außerdem spricht das Lymphom nur schlecht auf übliche Chemotherapeutika zur Behandlung von Lymphomen an.

PEL-Zellen sind vollständig immortalisiert und bilden Tumoren bei der Transplantation in immundefiziente Mäuse (Picchio et al. 1997). Des Weiteren lassen sie sich relativ gut *in vitro* kultivieren und spielen somit eine wichtige Rolle in der Erforschung der Erkrankung und auch des verursachenden KSHV (Boshoff et al. 1998; Cesarman, Moore, et al. 1995). Der überwiegende Teil der Tumorzellen weist ein latentes Transkriptionsprofil auf, wobei jedoch ein geringer Anteil der Zellen spontane lytische Reaktivierung aufweist. Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von KSHV für das PEL ist die Tatsache, dass die Tumorzellen zum Überleben auf die Expression latenter KSHV-Gene angewiesen sind (Godfrey et al. 2005; Guasparri et al. 2004).

1.3.3 Multizentrischer Morbus Castleman (MCD)

Morbus Castleman ist eine seltene Erkrankung der Lymphknoten, welche eine Hypertrophie durch aberrante Zellproliferation aufweisen. Sie wurde zuerst im Jahre 1956 durch Benjamin Castleman beschrieben (Castleman et al. 1956). Die Entstehung der Tumore wird vermutlich durch die gesteigerte Sekretion von Zytokinen wie IL-6 verursacht (Ahmed et al. 2007).

Man unterscheidet zwischen der lokalisierten Form, bei der lediglich ein einzelner Lymphknoten befallen ist und der multizentrischen Form, bei der es sich um eine systemische Erkrankung von Lymphknoten an unterschiedlichen Stellen handelt. Die lokalisierte Form ist zumeist idiopathisch und zeichnet sich durch eine gute Prognose aus. Die Erkrankung weist keine oder nur wenige Symptome auf und meist ist die operative Entfernung des betroffenen Lymphknotens als Therapie ausreichend. Diese Form des Morbus Castleman ist nicht mit KSHV oder HIV assoziiert.

Die multizentrische Form hingegen ist deutlich aggressiver und wird meist von starken Symptomen wie Fieber, Gewichtsverlust und Hepato- oder Splenomegalie begleitet. Sie tritt vermehrt, jedoch nicht ausschließlich, bei AIDS-Patienten auf und ist bei diesen sehr häufig mit einer KSHV-Infektion verbunden (Soulier et al. 1995). Vermutlich führt die fehlende Immunregulation zur Reaktivierung von KSHV und somit zur Produktion von viralen Proteinen, die die Tumorentstehung begünstigen. Besonders das virale IL-6-Homolog steht im Verdacht eine wichtige Rolle zu spielen (Parravicini et al. 2000; Molden et al. 1997; Osborne et al. 1999). Bei der MCD handelt es sich um eine polyklonale Läsion. Die KSHV-infizierten Zellen sind die in den sogenannten Mantelzonen befindlichen B-Zellen, deren Infektionsrate bei ca. 30% liegt. In HIV-negativen MCD-Fällen ist die Assoziation mit KSHV deutlich geringer (20-40%). Die Ursache der Erkrankung in Abwesenheit von KSHV ist unklar. Die Therapie der multizentrischen Form erfolgt durch die Therapie der zumeist zu Grunde liegenden viralen Erkrankung, sowie mit Hilfe von Steroiden und Antikörpern.

1.4 Epigenetische Modifikationen

Epigenetische Modifikationen sind Modifikationen der DNA, welche nicht die Sequenz der DNA betreffen. Wie Mutationen sind diese via Mitose oder Meiose an Tochterzellen vererbbar (Berger et al. 2009). Epigenetische Modifikationen beeinflussen die Geneexpression und sind dynamisch, d.h. sie können durch spezielle Proteine etabliert und auch wieder entfernt werden. Somit stellen sie wichtige Mechanismen zur Regulation der Genexpression dar. Die Dysregulation dieser Mechanismen ist mit zahlreichen Krankheiten assoziiert, wie z.B. Krebs, neurologischen Erkrankungen, Defekten in der Entwicklung und Autoimmun-Erkrankungen (Portela & Esteller 2010). Des Weiteren wird ein Zusammenhang bestimmter Änderungen epigenetischer Modifikationen und dem Risiko der Entwicklung psychischer Störungen wie Depressionen, Angststörungen und Sucht vermutet.

Die Epigenetik spielt in diversen Prozessen eine wichtige Rolle, unter anderem bei Paramutation, Imprinting, der Zelldifferenzierung während der Embryogenese und der X-Chromosom-Inaktivierung, sowie allgemein bei der Genregulation und der Formation von Heterochromatin.

Es gibt unterschiedliche Formen von epigenetischen Modifikationen. Die bedeutendsten zwei sind die DNA-Methylierung und die Modifikation von Histonen, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird. Neben diesen gibt es auch noch die Nukleosom-Positionierung. Bei anderen Formen der Genregulation wie beispielsweise miRNAs ist die Zuordnung zum Bereich der Epigenetik strittig.

1.4.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist ein epigenetischer Mechanismus zur Repression der Genexpression. Methyl-Gruppen werden kovalent an die DNA gebunden, was vor allem in Promotorregionen zu einer geringeren Transkription der assoziierten Gene führt. Die Bindung der Methyl-Gruppen kann entweder an Adenin oder Cytosin erfolgen, wobei im Menschen vor allem die Methylierung von Cytosin relevant ist. Diese geschieht nahezu ausschließlich an Cytosin-Basen auf die ein Guanin folgt (CpG). Diese Basenfolge bildet in Genomen von Säugetieren häufig so genannte CpG-Inseln (*CpG-Islands*), also Bereiche mit hohem GC-Gehalt (>50%) in denen diese Abfolge gehäuft auftritt. Die Bedeutung der DNA-Methylierung konnte in Zusammenhang mit der X-Chromosom-Inaktivierung sowie während der Embryogenese und Entwicklungsprozessen nachgewiesen werden.

Die Etablierung der Modifikation erfolgt über sogenannte DNA-Methyltransferasen (DNMTs). Sie kann entweder *de novo* erfolgen, d.h. an bisher unmethylierten DNA-Abschnitten, oder bei hemi-methylierter DNA, z.B. nach der Mitose, an Hand des Musters des bereits modifizierten Stranges. Auf diesem Weg können Methylierungsmuster an die Tochterzelle weitergegeben werden. Für das Entfernen der Methylgruppen sind DNA-Demethylasen zuständig.

1.4.2 Histonmodifikationen

Histone sind basische, im Zellkern lokalisierte Proteine, die der Strukturierung der DNA dienen und mit ihr das Chromatin formen. Sie bilden Oktamere, welche aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bestehen. Um diese Komplexe ist die DNA mit 1,65 Windungen über eine Länge von ca. 150 bp aufgewickelt. Diese kleinste Einheit des Chromatins wird als Nukleosom bezeichnet (Luger et al. 1997).

Zwischen den Nukleosomen befindet sich die ca. 50 bp lange Linker-DNA. Neben den oben angesprochenen Histon-Proteinen existiert auch noch das H1-Histon, welches jedoch nicht Bestandteil des Oktamers ist. Es bindet außen an das Histon-Oktamer sowie mit einer weiteren Domäne an die Linker-DNA. Die Funktion des H1 ist nicht abschließend geklärt, jedoch wird vermutet, dass es die um das Oktamer gewundene DNA und somit das Nukleosom als Einheit stabilisiert. Außerdem könnte es für die Formation einer übergeordneten Struktur des Chromatins, der 30-nm-Faser, verantwortlich sein.

Das Histon-Oktamer formt eine globuläre Struktur, um die die DNA gewunden ist. Darüber hinaus besitzen die einzelnen Histon-Moleküle N-terminale Fortsätze (*histone tails*), welche für Modifikationen zugänglich sind. Bei diesen kann es sich um Acetylierungen, Phosphorylierungen, Citrullinierungen, Ubiquitylierungen, SUMOylierungen oder Methylierungen handeln. Sie werden durch zelluläre Enzyme an bestimmten Aminosäuren etabliert. Mit Ausnahme der Phosphorylierung, welche an Serin, Threonin oder Tyrosin stattfindet, finden die Modifikationen an den basischen Aminosäuren Lysin oder Arginin statt. Bei Methylierungen können die Aminosäuren zudem mono-, di- oder trimethyliert vorliegen.

Je nach Art und Position der Modifikation resultieren unterschiedliche Effekte, die zu einer Aktivierung oder Repression der Genexpression führen können: Zum einen kann es zu einer direkten Veränderung der Chromatinstruktur kommen. So schirmt die Acetylierung von Lysin dessen positive Ladung ab und verringert somit die Wechselwirkung mit der negativ geladenen DNA. Dadurch kommt es zu einer weniger dichten Strukturierung des Chromatins (Euchromatin) und somit einer besseren Zugänglichkeit, was die Transkription erleichtert. Umgekehrt erschwert dichtes, stark kondensiertes Chromatin die Transkription und wird als Heterochromatin bezeichnet. Zum anderen können die Modifikationen Bindestellen für Proteine darstellen, die ihrerseits einen aktivierenden oder reprimierenden Effekt auf die Transkription vermitteln.

Je nach Art der Histonmodifikation sind unterschiedliche Enzyme für die Etablierung oder das Entfernen zuständig:

- Acetylierung: Acetylierungen werden ausschließlich an Lysin über Histon-Acetyltransferasen (HAT) etabliert. Sie übertragen die Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoA und bilden ϵ -N-Acetyllysin. Acetylierungen sind generell mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität assoziiert. Für das Entfernen der Modifikation sind Histon-Deacetylasen (HDAC) verantwortlich.
- Ubiquitinylierung: Die Etablierung von Ubiquitin-Modifikationen geschieht durch einen dreiteiligen Prozess: Zunächst wird das Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion durch Ubiquitin-aktivierende-Enzyme (UBA) gebunden und aktiviert. Im nächsten Schritt kommt es zum Transfer des aktivierten Ubiquitin auf die Ubiquitin-konjugierenden-Enzyme (UBK). Abschließend erfolgt die Ligation des Ubiquitin an ein Lysin des Zielproteins. Hierzu bindet das UBK an eine Ubiquitin-Ligase, welche an das Substrat bindet und die Ligation katalysiert.
- SUMOylierung: Die SUMOylierung läuft analog zur Ubiquitinylierung in drei Schritten ab und wird durch SUMO-aktivierende-Enzyme, SUMO-konjugierende-Enzyme und SUMO-Ligasen vermittelt.
- Phosphorylierung: Phosphorylierungen werden durch Kinasen zumeist an den Hydroxyl-Gruppen von Serin, Threonin oder Tyrosin angeheftet. Durch Phosphatasen können die Phosphat-Reste wieder entfernt werden. Der Effekt der Phosphorylierungen ist sehr unterschiedlich, ähnlich wie bei den Methylierungen.
- Methylierung: Durch Histon-Methyltransferasen (HMT) können Methylgruppen an die basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin angehängt werden. Im Falle von Arginin können dies bis zu zwei, bei Lysin bis zu drei Methylgruppen pro Aminosäure sein. Das Entfernen der Modifikation wird durch Histon-Demethylasen (z.B. KDM) vermittelt. Die Effekte der Methylierungen sind stark von der Position abhängig, d.h. an welchem Lysin oder Arginin sich die Methylgruppe befindet, und auch von der Anzahl der Methylgruppen. Eine Übersicht über die Effekte der wichtigsten Histon-Modifikationen zeigt Tabelle 1-2 .

Tabelle 1-2: Übersicht über einige ausgewählte Histonmodifikationen sowie deren Funktion und die Enzyme, die für Etablierung oder Entfernen der Modifikation verantwortlich sind.

Die Modifikationen sind nach folgendem Muster abgekürzt: Histon-Protein + Aminosäure (Einbuchstabencode) + Position der Aminosäure + Modifikation + Anzahl der Modifikationen an dieser Position. Etablierende Enzyme sind in normaler, entfernende in kursiver Schrift dargestellt.

Modifikation	Funktion	Enzyme
H3K4me3	Aktivierung	HMTs (z.B.MLLs), <i>KDMs</i>
H3K9/K14ac	Aktivierung	HATs, <i>HDAC</i>
H3K9me3	Repression	SUV39h, <i>KDMs</i>
H3K27me3	Repression	PRC2 (EZH1/2), <i>KDMs</i>
H2AK119ub	Repression	PRC1

Viele der oben beschriebenen Modifikationen können parallel an einem Histon auftreten. So kann es sein, dass sowohl aktivierende wie auch reprimierende Signale gleichzeitig vorkommen. In diesem Fall spricht man von bivalentem Chromatin. Des Weiteren ist es möglich, dass sich die Modifikationen untereinander gegenseitig beeinflussen und erst die Kombination mehrerer Modifikationen den Effekt erzeugt. Diese Theorie wird auch als „Histon-Code“ bezeichnet und ist Gegenstand derzeitiger Forschung.

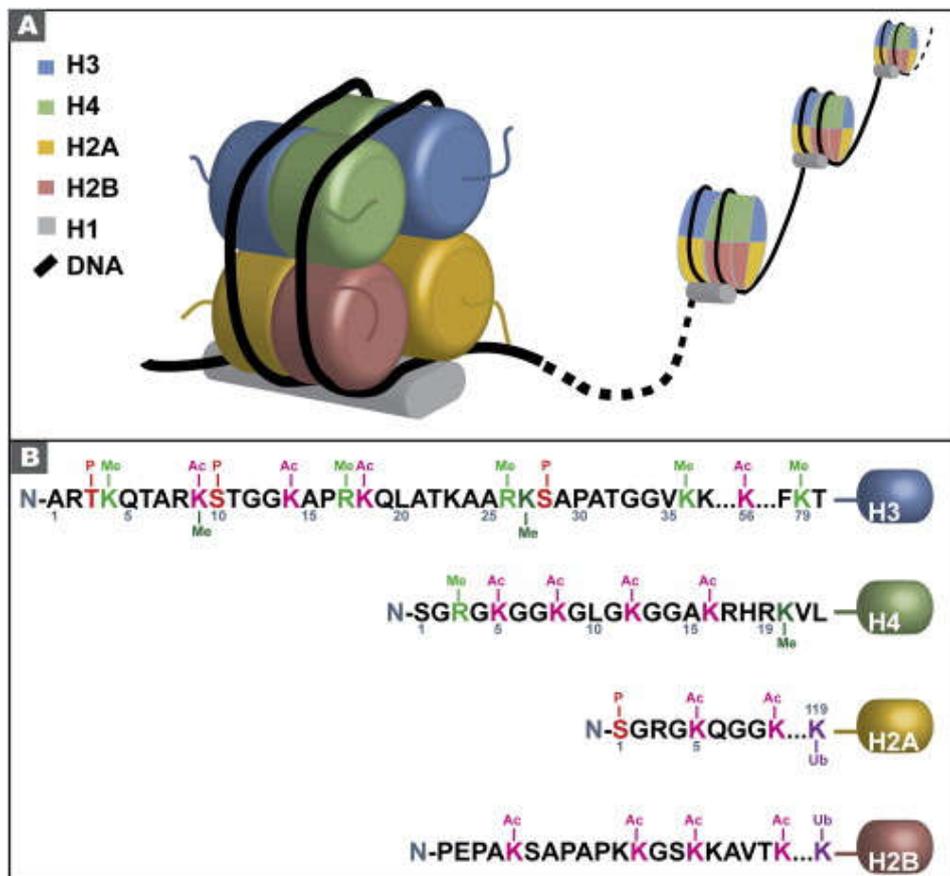


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Nucleosomen und der möglichen Histonmodifikationen an den N-terminalen Armen (Hamon & Cossart 2008).

A: Aufbau eines Nucleosoms mit dem Histonoktamer bestehend aus den Proteinen H2A, H2B, H3 und H4 sowie der um das Oktamer gewundenen DNA und dem stabilisierenden, außen an Oktamer und DNA gebundenen H1-Histon. **B:** Darstellung der Aminosäuren der N-terminalen Arme der Histonproteine im Einbuchstabencode und der möglichen Modifikationen. In dieser Abbildung sind nur Phosphorylierungen (P), Ubiquitynylierungen (Ub), Acetylierungen (Ac) und Methylierungen (Me) dargestellt.

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit sind die Histonmethylierungen H3K4me3 und H3K27me3. Die Trimethylierung von H3K4 ist generell mit transkriptioneller Aktivität assoziiert (Santos-Rosa et al. 2002; Schneider et al. 2004; Bernstein et al. 2005) und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Genen, die in Entwicklungsprozesse involviert sind, speziell im Hox-Cluster (Chambeyron & Bickmore 2004; Bernstein et al. 2005). Entsprechend führen knockouts von Proteinen im H3K4me3-Mechanismus zu Defekten in der Entwicklung (Wysocka et al. 2005). Die H3K4-Trimethylierung wird durch HMTs mit SET-Domänen katalysiert (Dillon et al. 2005), wie die Proteine der MLL-Familie (Glaser et al. 2006; Goo et al. 2003; Wysocka et al. 2003; Hughes et al. 2004), ASH1L, SET7/9 (Wang et al. 2001) oder SMYD3 (Hamamoto et al. 2004). Diese bilden mit weiteren Proteinen einen Multiproteinkomplex über den Rekrutierung, Substraterkennung und schließlich die enzymatische Reaktion zur Übertragung der Methylgruppe vermittelt wird (Dou et al.

2006). Die H3K4me3 kann durch eine Reihe von Proteinen über Chromo- oder PHD-Domänen gebunden werden. Diese sind wiederum Bestandteile größerer Proteinkomplexe wie z.B. NURF, hNuA4 oder HBO1 und lösen unterschiedliche Effekte aus, die zumeist zu weiteren aktivierenden Modifikationen des Chromatins wie Acetylierungen oder genereller Euchromatinisierung führen (Ruthenburg et al. 2007). Das Entfernen der H3K4me3 geschieht durch eine Familie Lysin-spezifischer Demethylasen (KDM) (Iwase et al. 2007; Lee et al. 2007; Christensen et al. 2007).

Im Gegensatz zur H3K4me3 ist die H3K27me3 mit der Repression der Transkription assoziiert (Yoo & Hennighausen 2011). Sie weist im Vergleich eine deutlich breitere Verteilung auf und beschränkt sich nicht nur auf Bereiche des Transkriptionsstarts. Die Trimethylierung von H3K27 wird durch den Polycomb repressor-komplex (PRC) 2 vermittelt. Dieser enthält neben EED, SUZ12 und RbAP46/48 als katalytische Domäne entweder EZH1 oder EZH2, wobei vor allem das EZH2 für die Etablierung von H3K27me3 verantwortlich ist (Pasini et al. 2004; Sewalt et al. 1998; Margueron & Reinberg 2011; Margueron et al. 2008). Ein knockout von EZH2 in Mäusen führt zum Absterben implantierter Eizellen *in utero*, wohingegen EZH1 knockout Mäuse einen unauffälligen Phänotyp zeigen (O'Carroll et al. 2001). Ursache hierfür könnte eine Kompensation von EZH1 durch EZH2 sein. Ebenfalls kann EZH1 die Funktion von EZH2 teilweise kompensieren, was sich unter anderem darin zeigt, dass eine vollständige Eliminierung von H3K27me3 nur in einem doppelten knockout möglich ist (Ezhkova et al. 2011). Die Proteine besitzen somit eine redundante Funktion bezüglich der Übertragung der H3K27me3. In Folge der Etablierung kommt es zu einer Heterochromatinisierung der betroffenen Genbereiche. Vermittelt wird dies unter anderem durch unterschiedliche Varianten des PRC1, für den die H3K27me3 als Bindestelle dient. Je nach Subform gehört zu dessen Funktionen die Etablierung einer weiteren Histonmodifikation, der H2AK119ub. Neben dem PRC2-abhängigen Mechanismus scheint es jedoch auch weitere, H3K27me3 unabhängige Wege zur Rekrutierung des PRC1 zu geben (Tavares et al. 2012). Wie schon die H3K4-Trimethylierung wird auch die H3K27-Trimethylierung durch spezifische KDMs entfernt (KDM6A/B).

1.4.3 Epigenetische Modifikationen und KSHV

Wie bereits unter Kapitel 1.2.4 beschrieben muss KSHV zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz die virale Genexpression stark eingrenzen und kontrollieren, sodass nur die latenzassoziierten Gene exprimiert werden. Wie genau KSHV dies reguliert ist unbekannt. Jedoch deuten Forschungsergebnisse darauf hin, dass unterschiedliche epigenetische Modifikationen eine wichtige Rolle spielen.

Einen Hinweis auf die Bedeutung epigenetischer Modifikationen für den Erhalt der Latenz liefert die Reaktivierung des lytischen Zyklus von KSHV durch DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (5-Azacytidin), HDAC-Inhibitoren (Natrium-Butyrat) und HAT-Stimulatoren (PMA) (Lu et al. 2003; Pantry & Medveczky 2009; Chen et al. 2001b). Untersuchungen zur DNA-Methylierung zeigten, dass langzeit KSHV-infizierte Zellen unterschiedlichen Ursprungs spezifische, untereinander ähnliche Methylierungsmuster aufweisen (Günther & Grundhoff 2010). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der Promotor des RTA in latent-infizierten PEL-Zellen stark methyliert ist, nicht jedoch der Promotor der Latenzkassette. Bei Reaktivierung durch Natriumbutytrat kommt es zur Demethylierung des Promotors. Hinsichtlich der Methylierung des RTA-Promotors liegen jedoch widersprüchliche Ergebnisse vor. So zeigten KSHV-Tumor-Proben keine Methylierung des RTA-Promotors (Chen et al. 2001b). Des Weiteren konnte in einer anderen Studie nur für eine von drei untersuchten PEL-Zelllinien die Methylierung des RTA-Promotors bestätigt werden (Günther & Grundhoff 2010). Auch in anderen Gammaherpesviren wie EBV und MHV-68 konnte die DNA-Methylierung bestimmter lytischer Promotoren in latent-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Bergbauer et al. 2010; Gray et al. 2010). Da jedoch das KSHV-Genom im Virion und somit bei der Infektion keinerlei DNA-Methylierungen oder andere epigenetischen Modifikationen trägt, müssen diese erst etabliert werden. Günther et al. zeigten, dass *de novo* infizierte Zellen fünf Tage nach Infektion praktisch keinerlei DNA-Methylierung aufwiesen, die Latenz zu diesem Zeitpunkt jedoch vollständig etabliert war (Günther & Grundhoff 2010). Somit kann es sich bei der DNA-Methylierung zwar um einen Regulationsmechanismus in langzeit-infizierten Zellen handeln, jedoch nicht bei der *de novo*-Infektion.

Nicht nur für DNA-Methylierung, auch für Histonmodifikationen ließen sich distinkte Muster auf dem latenten KSHV-Genom nachweisen, sowohl in chronisch wie auch in *de novo* infizierten Zellen. Aktivierende Histonmodifikationen wie H3K4me3 und

H3K9/14ac zeigen Anreicherungen in diskreten Bereichen, vor allem in Promotorregionen latenzassoziierter Gene, jedoch auch bei IE-Genen wie RTA. Auch die repressive H3K9me3-Modifikation zeigt diskrete Muster, wobei eine Anreicherung dieser Modifikation vor allem in Bereichen des KSHV-Genoms auftritt, welche für späte Gene codieren und negativ für aktivierende Histonmodifikationen sind. Zudem scheint diese Modifikation vor allem in chronisch-infizierten Zellen vorzukommen, da das virale Genom in *de novo* infizierten Zellen nur geringe Mengen H3K9me3 trägt. Die H3K27me3-Modifikation hingegen ist über weite Bereiche des KSHV-Genoms verteilt. Nur wenige Regionen wie die Latenzkassette sind negativ für H3K27me3. Zudem weisen auch die IE-Gene wie RTA eine starke H3K27me3-Besetzung auf, woraus durch gleichzeitige Besetzung mit H3K4me3 und H3K9/14ac bivalentes Chromatin resultiert. Regionen mit bivalentem Chromatin sind zwar transkriptionell inaktiv, jedoch geht man davon aus, dass durch bereits vorhandene aktivierende Modifikation eine transkriptionelle Reaktivierung dieser Bereiche erleichtert bzw. beschleunigt wird. Somit befinden sich diese Bereiche in einer Art Bereitschaftszustand. Diese Verteilung passt zur viralen Transkription während der Latenz: Latente Gene werden exprimiert und zeigen nur aktivierende Modifikationen, frühe Gene sind inaktiv, auf Grund des bivalenten Chromatins jedoch schnell reaktivierbar und späte Gene, die ausschließlich reprimierende Modifikationen tragen werden erst relativ spät nach Reaktivierung exprimiert (Toth et al. 2013; Toth et al. 2010; Günther & Grundhoff 2010).

Im Gegensatz zur DNA-Methylierung, welche erst relativ spät nach Infektion etabliert zu werden scheint, werden die Histonmodifikationen bereits kurz nach Infektion etabliert. Bereits 24-48 h nach Infektion lassen sich Muster sowohl aktivierender wie auch reprimierender Modifikationen nachweisen, wenn auch teilweise noch nicht vollständig ausgeprägt (Günther et al. 2014). Dieser Zeitraum entspricht in etwa dem der partiell lytischen Genexpression bevor die Latenz etabliert wird. Des Weiteren kommt es bei Reaktivierung zu einer Abnahme der H3K27me3-Besetzung auf dem viralen Genom. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass es in Folge einer Überexpression von H3K27me3-entfernenden Demethylasen zur Induktion lytischer Gene kommt. Die bisherigen Erkenntnisse legen somit nahe, dass die Histonmodifikationen eine wichtige Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der viralen Latenz darstellen (Toth et al. 2013).

2 Zielsetzung

Die genauen Ursachen und Mechanismen der Entstehung KSHV-assoziiierter Tumorerkrankungen sind nach wie vor unvollständig verstanden. Es konnten wichtige Co-Faktoren und Voraussetzungen wie die Immunsuppression identifiziert werden. Ebenfalls gelang es Interaktionen viraler Proteine mit zellulären Faktoren sowie potentiell tumorigene Effekte viraler Proteine (z.B. Proliferation, Inhibition von Tumorsuppressoren) zu identifizieren. Bisher konnte jedoch keiner der beschriebenen Effekte für die Tumorentstehung direkt verantwortlich gemacht werden, was die Vermutung nahelegt, dass vielmehr die Summe der Effekte der KSHV-Infektion in Verbindung mit weiteren Faktoren zur Tumorentstehung führt.

Das KSHV-Episom etabliert distinkte epigenetische Muster nach der Infektion. Man geht davon aus, dass diese eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Genexpression in der Latenz spielen. In langzeit-infizierten Zellen lassen sich spezifische DNA-Methylierungsmuster nachweisen. Für die Latenzetablierung früh nach der Infektion scheinen Histonmodifikationen, vor allem die Histonmethylierungen H3K4me3 und H3K27me3, verantwortlich zu sein, da diese bereits früh nach der Infektion vorhanden sind. Auch hier konnten Muster passend zur latenzassoziierten Genexpression identifiziert werden.

Bisher ist nicht bekannt wie KSHV die Etablierung der beschriebenen epigenetischen Muster steuert. Obwohl diese unabhängig vom infizierten Zelltyp sehr spezifisch sind und eine wichtige Rolle in der Regulation der Latenz zu spielen scheinen, besitzt KSHV keine Proteine, die diese Modifikationen etablieren können. Somit muss KSHV auf die zellulären Proteine zur Etablierung epigenetischer Modifikationen zurückgreifen und diese so beeinflussen, dass die spezifischen, notwendigen Modifikationen des KSHV-Genoms vorgenommen werden. Entsprechend konnten Interaktionen zwischen diesen Proteinen und viralen Proteinen nachgewiesen werden (Hu et al. 2014). Die Manipulation dieser Proteine könnte jedoch einen Einfluss auf das Epigenom der Wirtszelle haben, was entweder direkt die Transkription beeinflussen oder aber zu einer Prädisposition für eine aberrante Genexpression führen könnte. In dieser Arbeit soll der Effekt einer latenten KSHV-Infektion auf das Epigenom und das Transkriptom der Wirtszelle untersucht werden, speziell vor dem Hintergrund der tumorigenen Eigenschaften des KSHV.

3 Material

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien stammten von 5Prime, Abcam, Becton Dickinson, Bio Rad, Bioline, Eppendorf, Gibco, Lonza, Merck, Roche, Roth, Santa Cruz, Sigma, Thermo Scientific, Whatman und Zymo.

3.2 Antikörper

3.2.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
α - β Actin	Maus, monoklonal	Santa Cruz
α -H3K4me3	Kaninchen, monoklonal	Merck Millipore (#07-473)
α -H3K27me3	Kaninchen, monoklonal	Merck Millipore (#07-449)
α -LANA	Kaninchen, monoklonal	
α -ORF50 (RTA)	Kaninchen	
α -TNFRSF1b	Kaninchen, monoklonal	Abcam

3.2.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
α -mouse-HRP	Santa Cruz
α -rabbit-HRP	Santa Cruz
α -rabbit-Alexa Fluor 488	

3.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bioanalyzer 2100	Agilent
Fluoreszenzmikroskop DMI 6000B	Leica
HiSeq	Illumina
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
MiSeq	Illumina
Nanodrop ND-1000	
Rotor Gene Q	Qiagen

3.4 Oligonukleotide

Bezeichnung	Anwendung	Sequenz
ADH5_ChIP_fw	ChIP-qPCR	GCATAATTGAGCCTACGCC
ADH5_ChIP_rv	ChIP-qPCR	GCAGAGGTGTTTGTACGTG
CD74_ChIP_fw	ChIP-qPCR	TGCTTCTCCTCCTGTGCATC
CD74_ChIP_rv	ChIP-qPCR	CAGATTCCTCTCCAGCACCG
IFI6_ChIP_fw	ChIP-qPCR	TGCCACACTTCATAGCTCC
IFI6_ChIP_rv	ChIP-qPCR	CATCTATCAGCAGGCTCCGG
IFIT1_ChIP_fw	ChIP-qPCR	TCTCAGTGAGGTCAGGTTTTCT
IFIT1_ChIP_rv	ChIP-qPCR	CACACACATGCATGCACACA
IFITM1_ChIP_fw	ChIP-qPCR	TCACCAATTTACAAACAGCAGGA
IFITM1_ChIP_rv	ChIP-qPCR	TGAGACCTCCTTTCCCCTGT
ISG15_ChIP_fw	ChIP-qPCR	GCTTTAGTGCATCCTGTGAAGG
ISG15_ChIP_rv	ChIP-qPCR	GAAACACCTAAATATCGCGCA
MAST4_fw	ChIP-qPCR	GCTGAAGGCAAGAGAGGAAT
MAST4_rv	ChIP-qPCR	CTGTCCGGTGACTGGAATTT
MX1_ChIP_fw	ChIP-qPCR	ACCACCCTTTGAGAAGCACG
MX1_ChIP_rv	ChIP-qPCR	ACTGGTTTCCTTTGCCTCGT
MX2_ChIP_fw	ChIP-qPCR	GGCTGCTTTGTGTCTGATGC
MX2_ChIP_rv	ChIP-qPCR	AGCCACATTCACCAAGCAGA
MYT1_ChIP_fw	ChIP-qPCR	TGGAATGTCTGTGTGCAGATT
MYT1_ChIP_rv	ChIP-qPCR	GGCTTAATGATCGCTTAGCTG
ORF17_in_ChIP_fw	ChIP-qPCR	GTGGCTGAGCAAAAAGGATG
ORF17_in_ChIP_rv	ChIP-qPCR	TGTCAATTCCCACAAATGAA
ORF63_in_ChIP_fw	ChIP-qPCR	CCCCATAAACACTTTGCAG
ORF63_in_ChIP_rv	ChIP-qPCR	TTGTGTGTTCCGGTCCTGTGT
ORF73_3_ChIP_fw	ChIP-qPCR	TGGGTGAGTGTGGAGGTGTA
ORF73_3_ChIP_rv	ChIP-qPCR	CCACCGCTTTCAAGTCCTAC
ORF75_pro_ChIP_fw	ChIP-qPCR	AGCGAGCACCGTCTGTATTT
ORF75_pro_ChIP_rv	ChIP-qPCR	GCACCGGAGGCTACTATCTG
PCDHA3_ChIP_fw	ChIP-qPCR	CCTGCTGCTTTCTCTTCTGC
PCDHA3_ChIP_rv	ChIP-qPCR	CATGCTTGGCCTCCTCAGA
RPL28_ChIP_fw	ChIP-qPCR	GCCGCCGCCATGTCT
RPL28_ChIP_rv	ChIP-qPCR	TGATCAGGAACTGGAGCAGTTC
TUBA1c_ChIP_fw	ChIP-qPCR	TGGTAGTCTGTTAGTGGGAGATCCT
TUBA1c_ChIP_rv	ChIP-qPCR	GGTCTGCGGCGGTGAA
vIRF3_in_ChIP_fw	ChIP-qPCR	AAAAATTCGCCAACAACCTGG
vIRF3_in_ChIP_rv	ChIP-qPCR	CCAGAATGTAGCAGGGGAAT
vIRF3_pro_ChIP_fw	ChIP-qPCR	GCGGTAAGACAAAGGGAGGT
vIRF3_pro_ChIP_rv	ChIP-qPCR	TACCTTGCCCCATTTTACCA
CD74_cDNA_fw	qRT-PCR	ATGACCAGCGCGACCTTATC
CD74_cDNA_rv	qRT-PCR	GGAGCAGAGTCACCAGGATG
GAPDH_cDNA_fw	qRT-PCR	AATCCCATCACCATCTTCCAGG
GAPDH_cDNA_rv	qRT-PCR	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTG
IFI6_cDNA_fw	qRT-PCR	GCCCATCTATCAGCAGGCTC
IFI6_cDNA_rv	qRT-PCR	CACCCCACTGCAAGTGAAGA
IFIT1_cDNA_fw	qRT-PCR	GAGGAGCCTGGCTAAGCAAA
IFIT1_cDNA_rv	qRT-PCR	GCTCCAGACTATCCTTGACCTG
IFITM1_cDNA_fw	qRT-PCR	TCGCCTACTCCGTGAAGTCTA
IFITM1_cDNA_rv	qRT-PCR	ACAGGATGAATCCAATGGTCA

ISG15_cDNA_fw	qRT-PCR	ACAGCCATGGGCTGGGA
ISG15_cDNA_rv	qRT-PCR	CCTTCAGCTCTGACACCGAC
LEP_cDNA_fw	qRT-PCR	CACCAGGATCAATGACATTTTACA
LEP_cDNA_rv	qRT-PCR	TGAAGTCCAAACCGGTGACT
MX1_cDNA_fw	qRT-PCR	CAGCCTGCTGACATTGGGTA
MX1_cDNA_rv	qRT-PCR	CCACATTACTGGGGACCACC
MX2_cDNA_fw	qRT-PCR	AGGGAGAATGAGACCCGTTT
MX2_cDNA_rv	qRT-PCR	CAGAAGCTCCTTGCCTCGAT
TNFRSF1B_ChIP_fw	qRT-PCR	AAATGCTCGCCGGGCCAA
TNFRSF1B_ChIP_rv	qRT-PCR	CTGGGTGTATGTGCTGTCCT

3.5 Kits und kommerzielle Systeme

Bezeichnung	Hersteller
Dynabeads Protein A	Life Technologies
SensiMix SYBR-Green HiRox	Bioline
NEXTflex Directional RNA-Seq Kit v2	Bioo Scientific
NEXTflex Rapid Directional RNA-Seq Kit	Bioo Scientific
NEXTflex ChIP-Seq Kit	Bioo Scientific

3.6 Software

Für die Datenanalyse und Visualisierung wurden die folgenden Programme verwendet: BEDTools (Quinlan & Hall 2010), Bowtie (Langmead et al. 2009), ChIPseeker (Yu et al. 2015), CLC Main Workbench 7 (Qiagen), diffReps (Shen et al. 2013), DESeq (Anders & Huber 2010), FACSDiva (Becton Dickinson), IGV (Thorvaldsdóttir et al. 2013), LAS AF (Leica), Micro-Manager (Edelstein et al. 2010), Prism 5 (GraphPad Software), R (R Development Core Team 2013), Rotor Gene Q Software (Qiagen), RStudio (RStudio 2012), STAR (Dobin et al. 2013), Venny (Oliveros 2007) und WebGestalt (Wang et al. 2013).

3.7 Zelllinien

Bezeichnung	Typ	Referenz
BCBL1	KSHV-positive PEL-Zelllinie	(Renne, Zhong, et al. 1996)
HDF	Humane dermale Fibroblasten	Primäre Zellen
MC116	Humanes B-Zell Lymphom	(Magrath et al. 1980)
SLK	KSHV-negative KS-Zelllinie	(Herndier et al. 1994)

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Chromatin Immunpräzipitationen wurden nach dem Protokoll von Günther et al. durchgeführt (Günther et al. 2016). Für die Präparation des Chromatins wurden 5×10^6 – 2×10^7 Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 1 % Formaldehyd inkubiert, um Proteine reversibel an die DNA zu binden (*cross-linking*). Bei diesem Vorgang bildet das Formaldehyd eine kovalente Methylenbrücke, welche die Aminogruppe des Nucleosids mit einem nukleophilen Stickstoff oder Schwefel in der Seitenkette der Aminosäuren Lysin, Histidin, Cystein oder Tryptophan verbindet (Lu et al. 2010). Durch die Zugabe von 1/10 des Volumens 2,5 M Glycin für 5 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden für 3 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Alle folgenden Schritte werden bei 4 °C durchgeführt. Die verwendeten Lyse- und Waschpuffer enthielten 1x cComplete Protease-Inhibitor Cocktail (Roche) sowie 1 mM PMSF. Zur Isolation der Zellkerne wurden die Zellen in 1 mL Puffer I resuspendiert und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Die Kerne wurden mittels Zentrifugation bei 1.350 g pelletiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Kerne zur Reinigung in 1 mL Puffer II resuspendiert und erneut per Zentrifugation pelletiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Lyse der Kernmembran durch Resuspendieren und mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Zellkerne in 600 µL Puffer III. Das so erhaltene Chromatin wurde mittels Sonifikation (Bioruptor, Diagenode) auf eine durchschnittliche Größe von ca. 200 – 500 bp fragmentiert. Nach der Zugabe von 1/10 des Probenvolumens an 10 % Triton X-100 wurde das Chromatin für 10 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert um Reste zellulärer Bestandteile zu entfernen. Der das Chromatin enthaltende Überstand wurde entweder bei -20 °C gelagert oder direkt für die Immunpräzipitation eingesetzt.

Tabelle 4-1: Zusammensetzung von Puffer I der Chromatin-Isolation.

Komponenten	Konzentration
Hepes-KOH	50 mM
NaCl	140 mM
EDTA	1 mM
Glycerol	10 %
NP-40	0.5 %
Triton X-100	0.25 %

Tabelle 4-2: Zusammensetzung von Puffer II der Chromatin-Isolation.

Komponenten	Konzentration
TRIS-HCl	10 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM
EGTA	0,5 mM

Tabelle 4-3: Zusammensetzung von Puffer III der Chromatin-Isolation.

Komponenten	Konzentration
TRIS-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	1 %

Die Menge an eingesetztem Material für die Immunpräzipitationen variierte, lag jedoch im Bereich von Chromatin aus 1×10^5 und 1×10^6 Zellen. Das eingesetzte Chromatin wurde mit Verdünnungs-Puffer 1:10 verdünnt, um die Konzentration des in Puffer III enthaltenen SDS zu senken, welches die Bindung des Antikörpers behindern könnte. Pro Ansatz wurden 4 μg eines für die Histonmodifikationen H3K4me3 (Merck-Millipore #07-473) oder H3K27me3 (Merck-Millipore #07-449) spezifischen Antikörpers eingesetzt und für 15 min auf mittlerer Stufe bei 4 °C sonifiziert (Bioruptor, Diagenode). Hierdurch wird die Interaktion des Antikörpers mit seinem Epitop erleichtert und somit die Inkubationszeit reduziert (Nelson et al. 2006). Zum Präzipitieren der Chromatin-Immunkomplexe wurden 30 μL Dynabeads® gekoppelt mit Protein A (Thermo Fisher Scientific) zugesetzt und für 1 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Um unspezifisch gebundene Bestandteile zu entfernen wurden die Beads mit 1 mL Low-Salt Puffer, 1 mL High-Salt, 1 mL LiCl-Waschpuffer und zweimal mit TE-Puffer gewaschen. Um außerdem unspezifische Komplexe zu

entfernen, die sich an den Gefäßwänden abgesetzt haben, wird die Probe mit dem letzten Waschschrift in ein neues Reagenzgefäß überführt. Das Chromatin wurde von den Beads in 210 µL Elutions-Puffer für 30 min bei 65 °C eluiert. Das eluierte Chromatin sowie die Input-Probe (1/4 des für die Immunpräzipitation eingesetzten Chromatins, mit Elutions-Puffer auf 200 µL aufgefüllt) wurden mit 8 µL einer 5 M NaCl-Lösung versetzt und bei 65 °C über Nacht inkubiert, um die Methylenbrücken zwischen DNA und Proteinen aufzubrechen (*decrosslinking*). Im Anschluss wurden die Proben mit 200 µL TE-Puffer verdünnt um die SDS-Konzentration zu verringern und zum Abbau von RNAs mit 80 µg RNaseA (Sigma) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Proteine in den Proben wurden durch Zugabe von 7 µL CaCl₂-Lösung (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1 % SDS) und 4 µL Proteinase K (20 mg/ml, Peqlab) für 1 h bei 55 °C degradiert. Die DNA-Fragmente wurden mittels zweimaliger Phenol-Chloroform-Extraktion sowie einer einfachen Chloroform-Extraktion isoliert. Die isolierte DNA (ca. 400 µL) wurde durch Zugabe von 1055 µL Ethanol (100 %), 24 µL NaCl (5 M) und 6 µL Glycogen (5 mg/mL) bei -80 °C über Nacht präzipitiert. Die präzipitierte DNA wurde per Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C für 15 min pelletiert, einmal mit 500 µL Ethanol (70 %) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA-Pellets getrocknet und in 70 µL 10 mM TRIS-HCl resuspendiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 4-4: Zusammensetzung des Verdünnungspuffers.

Komponenten	Konzentration
TRIS-HCl pH 8,0	16,7 mM
NaCl	167 mM
EDTA	1,2 mM
Triton X-100	1,1 %
SDS	0,01 %

Tabelle 4-5: Zusammensetzung des Low-Salt Waschpuffers.

Komponenten	Konzentration
TRIS-HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
Triton X-100	1 %
SDS	0,1 %

Tabelle 4-6: Zusammensetzung des High-Salt Waschpuffers.

Komponenten	Konzentration
TRIS-HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	500 mM
EDTA	2 mM
Triton X-100	1 %
SDS	0,1 %

Tabelle 4-7- Zusammensetzung des LiCl-Waschpuffers.

Komponenten	Konzentration
TRIS-HCl pH 8,0	10 mM
LiCl	0,25 M
EDTA	1 mM
Natriumdesoxycholat	1 %
NP-40	1 %

Tabelle 4-8: Zusammensetzung des Elutionspuffers.

Komponenten	Konzentration
TRIS-HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	1 %

4.1.2 RNA-Isolation

Zellen wurden geerntet, 1x mit PBS gewaschen und in 1 mL RNA Bee pro 1×10^6 Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 200 μ L Chloroform pro mL RNA Bee zugesetzt, die Proben 10x invertiert, 5 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere, klare Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der RNA mit 500 μ L Isopropanol versetzt, 10x invertiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden erneut für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet 1x mit Ethanol (70 %) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Ethanol verworfen, die RNA-Pellets getrocknet und je nach Ausgangsmenge an Zellen in 10 – 25 μ L DEPC-H₂O aufgenommen.

4.1.3 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA wurden 1 µg RNA pro Probe eingesetzt. Zunächst wurden DNA-Kontaminationen mittels eines DNase I-Verdau entfernt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µL in 1x DNase I-Puffer und 1 µL DNase I (Invitrogen) für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 2 µL EDTA-Lösung (25 mM) zugesetzt und für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die DNase zu inaktivieren. Für die Synthese der cDNA wurden zufällig generierte Hexamer-Primer und die Reverse Transkriptase SuperScript III (Invitrogen) verwendet. Zunächst erfolgte die Bindung der Primer an die RNA. Hierfür wurden die 22 µL aus dem DNase I-Verdau mit 2 µL dNTPs (10 mM) und 2 µL Hexamer-Primern (250 ng/µL) versetzt, für 5 min bei 65 °C erhitzt und direkt im Anschluss auf Eis inkubiert. Durch das Erhitzen werden Sekundärstrukturen in der RNA denaturiert, um somit die Bindung der Primer zu ermöglichen. Im Anschluss wurden die Proben gleichmäßig á 13 µL aufgeteilt und mit einem cDNA-Synthese-Mix mit bzw. ohne Reverse Transkriptase versetzt (siehe Tabelle 4-9). Die Probe ohne Reverse Transkriptase dient hierbei als Kontrolle für Hintergrundsignale durch genomische DNA bzw. DNA-Kontaminationen und wird bei der Messung vom Signal der Probe abgezogen. Beide Ansätze wurden für 5 min bei 25 °C und anschließend für 60 min bei 50 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben für 10 min bei 70 °C inkubiert. In einem abschließenden Schritt wurden die Proben zum Entfernen der RNA aus den cDNA-RNA Hybridsträngen mit 0,2 µL RNase H (NEB) für 20 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss 1:5 verdünnt. Die Analyse der cDNA erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR).

Tabelle 4-9: Zusammensetzung des cDNA-Synthese Mix mit und ohne RT.

cDNA-Synthese-Mix			
Reagenz	Volumen [µL]	Reagenz	Volumen [µL]
First-Strand Synthesis Buffer	4	First-Strand Synthesis Buffer	4
RNAse OUT	0,2	RNAse OUT	0,2
DTT	1	DTT	1
DEPC-H ₂ O	1,6	DEPC H ₂ O	1,8
SuperScript III	0,2		

4.1.4 Quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative real-time PCR*)

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) basiert auf dem Funktionsprinzip der klassischen PCR und wird für die Quantifizierung spezifischer DNA-Bereiche eingesetzt. Mittels spezifischer Primer werden die gewünschten DNA-Bereiche amplifiziert und deren Anreicherung mit Hilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes oder einer fluoreszenz-markierten DNA-Sonde detektiert. In dieser Arbeit wurde ausschließlich der interkalierende Farbstoff SYBR green verwendet. Nach Anlagerung an die DNA absorbiert der entstandene DNA-Farbstoff-Komplex Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$ und emittiert Licht bei $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$. Da SYBR green ausschließlich doppelsträngige DNA bindet, ist die relative Intensität des Fluoreszenz-Signals direkt proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA in der Probe. Für die relative Quantifizierung des gewünschten Amplikons wurde ein Referenz-Primerpaar verwendet, welches spezifisch ist für ein konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen.

Um die Spezifität des Amplikons zu gewährleisten, wurden Schmelzkurven-Analysen durchgeführt. Hierfür wird die Temperatur graduell erhöht um die doppelsträngigen Amplikons zu denaturieren, wodurch auch der Farbstoffkomplex dissoziiert und somit das Fluoreszenz-Signal verschwindet. Da unterschiedliche PCR-Produkte unterschiedliche Schmelztemperaturen aufweisen, ist es so möglich die Präsenz von Nebenprodukten und Primer-Dimeren, welche ebenfalls durch SYBR green gebunden werden, nachzuweisen.

Für jedes Primer-Paar wurde für die relative Quantifizierung eine Standardkurve mit Verdünnungsreihen in Zehnerschritten von gDNA bzw. cDNA erstellt. In jedem Lauf wurden Kontrollen ohne Ausgangsmaterial eingeschlossen um eventuelle Kontaminationen auszuschließen. Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare sind unter 3.4 aufgelistet.

Die qPCR wurde mit Hilfe eines Rotor-Gene Q (Qiagen) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Reaktion ist in Tabelle 4-10 aufgeführt, das verwendete Programm in Tabelle 4-11.

Tabelle 4-10: Zusammensetzung der qPCR-Reaktion

Reagenz	Volumen [μL]
2x SensiMix SYBR Hi-Rox Mastermix (Bioline)	5
Vorwärts-Primer	0,3
Rückwärts-Primer	0,3
Ausgangsmaterial (ChIP-DNA, cDNA)	1,5
DEPC-H ₂ O	2,9

Tabelle 4-11: Programm-Parameter für die qPCR.

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit	Zyklen
95	7 min	1x
95	10 s	} 50x
57	40 s	
72	10 s	

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 Isolation von Protein aus Zellen

Für die Isolation von Protein aus Zellen wurden diese geerntet, zentrifugiert für 3 min bei 1200 g und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer (mit Proteaseinhibitoren: 1x cOmplete Protease-Inhibitor cocktail, 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 2,5 mM NaVO₃) resuspendiert, für 5 min bei 4 °C inkubiert und für 5 min bei 4°C und mittlerer Intensität sonifiziert (Bioruptor, Diagenode).

Tabelle 4-12: Zusammensetzung RIPA-Puffer.

Komponenten	Konzentration
TRIS-HCl pH 8,0	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
NP-40	1 %
SDS	0,1 %
Natriumdesoxycholat	0,5 %

4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Roti[®]-Nanoquant Reagenz verwendet. Bei dieser Form der Bestimmung der Proteinkonzentration handelt es sich um eine Variante der klassischen Bradford-Methode. Die Durchführung der Analyse erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

4.2.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung von Proteinen und späteren Analyse per Western Blot wurden pro Bahn 30 µg Proteinlysate mit Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine an und schirmt deren eigene Ladung ab, sodass diese eine gleichmäßige negative Ladungsverteilung aufweisen. Gleichzeitig werden die Proteine durch die Abstoßung der negativen Ladungen des SDS und das Erhitzen denaturiert. Somit ist die Laufgeschwindigkeit im Gel von Ladung und Struktur unabhängig und wird ausschließlich durch die Größe des Proteins bestimmt. Um eine bessere Auflösung zu erzielen wurden ein Sammelgel, welches die Proteine vor der Trennung konzentriert, und ein Trenngel verwendet (Laemmli 1970). Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V und 350 mA für 50 min.

4.2.4 Western Blot

Die per SDS-PAGE separierten Proteine wurden per Western Blot auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Hierbei wandern die Proteine mittels eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf die Membran, wo sie sich auf Grund polarer und hydrophober Wechselwirkungen anlagern. Die Detektion von Proteinen erfolgt mittels spezifischer Primärantikörper sowie mit Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) gekoppelter Sekundärantikörper, welche wiederum an die Primärantikörper binden.

Für den Transfer wurde das *semi-dry*-Verfahren verwendet. Der Aufbau von unten nach oben sah dabei wie folgt aus: 3 Whatman-Papiere getränkt in Puffer C, SDS-Gel, PVDF-Membran (zuvor in Methanol aktiviert), 1 Whatman-Papier getränkt in

Puffer B und 2 Whatman-Papiere getränkt in Puffer A. Der Transfer erfolgte bei 40 V und 230 mA für 75 min.

Um unspezifische Bindungen zu verringern, wurde die Membran nach dem Transfer für 30 min in 5 % Milchpulver in PBST unter Schütteln inkubiert. Hierdurch werden die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran durch die Milchproteine, welche nicht durch die Antikörper detektiert werden, besetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in 5 % Milchpulver in PBST verdünnten Primärantikörper bei 4 °C unter Schütteln über Nacht. Die Membran wurde 3x für 5 min mit PBST gewaschen und im Anschluss mit dem 1:5000 in 5 % Milchpulver in PBST verdünnten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen, wurde die Membran 3x für 5 min mit PBST gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe des „Western Blotting Luminol Reagent“ von Santa Cruz. Hierbei handelt es sich um zwei Lösungen die im Verhältnis 1:1 gemischt als chemolumineszentes Substrat für die HRP dienen. Das entstehende Signal wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmes detektiert.

Tabelle 4-13: Zusammensetzung Blotpuffer A.

Komponenten	Konzentration
TRIS	3 M
Methanol	10 %
H ₂ O	ad 1L

Tabelle 4-14: Zusammensetzung Blotpuffer B.

Komponenten	Konzentration
TRIS	0,25 M
Methanol	10 %
H ₂ O	ad 1L

Tabelle 4-15: Zusammensetzung Blotpuffer C.

Komponenten	Konzentration
TRIS	0,25 M
Aminohexansäure	0,4 M
Methanol	10 %
H ₂ O	ad 1L

4.2.5 Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung der KSHV-Infektionsraten sowie der Expression lytischer Gene wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die zu analysierenden Zellen mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min oder mit Methanol für 10 min bei 4 °C auf 8-well-Objektträgern (Thermo Scientific) fixiert und anschließend für 20 min mit 2% Triton X-100 permeabilisiert (entfällt bei Methanol-Fixierung). Die Zellen wurden 5x mit PBS gewaschen, mit Primärantikörpern gegen das virale Latenzprotein LANA bzw. das lytische RTA (1:500 in 3 % BSA in PBS) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, erneut 3x mit PBS gewaschen und für 2 h mit Sekundärantikörpern (1:300 in 3 % BSA in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurde DAPI-haltiges Mounting Medium (Vector Laboratories) aufgetragen und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Kultivierung adhärenter eukaryotischer Zellen

Die primären, adhärenenten humanen dermalen Fibroblasten (HDF) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS, Biochrom/Merck), 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories) und 1 % Natriumpyruvat (Gibco) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mittels Trypsin/EDTA (Gibco) abgelöst und mit der gewünschten Dichte neu ausgesät.

4.3.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die KSHV-positive PEL Zelllinie BCBL1 wurde in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Die KSHV-negative, B-Zell Lymphom Zelllinie MC116 wurde in RPMI-Medium mit 20 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin inkubiert.

Beide Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage subkultiviert.

4.3.3 Präparation von KSHV-haltigen Überständen

KSHV-enthaltende BCBL1-Zellen wurden bei einer Dichte von 4×10^5 Zellen pro mL mit 0,3 mM Natriumbutyrat und 10 ng/mL PMA behandelt um den lytischen Zyklus und somit die Replikation von KSHV zu induzieren. 24 h nach Zugabe der Reagenzien wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert und der virushaltige Überstand filtriert (0,45 µM) um Zellrückstände zu entfernen. Die Viruspartikel wurden per Zentrifugation (27.000 g bei 4 °C) pelletiert und in 1/100 des Ausgangsvolumens EBM-2 Medium resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

4.3.4 De novo KSHV-Infektion

Für die *de novo* Infektion von HDF-Zellen mit wildtyp KSHV wurden 5×10^5 Zellen auf einer 10 cm Schale am Vortag ausgesät. Die Zellen wurden mit 3 mL Infektionslösung (1 mL Virus-Überstand, 2 mL EBM-2, Polybren 8 µg/mL) für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Viruslösung abgenommen und die Zellen mit Vollmedium inkubiert.

Für die *de novo* Infektion von MC116-Zellen mit rKSHV wurden 1×10^5 Zellen direkt vor der Infektion auf einer 12-well Schale ausgesät. Die Zellen wurden mit 300 µL Infektionslösung (100 µL Virusüberstand, 200 µL EBM-2, Polybren 8 µg/mL) für 1 h bei 1000 g und 37 °C zentrifugiert. Darauf erfolgte eine weitere Stunde Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Anschließend wurde die Viruslösung abgenommen und die Zellen mit Vollmedium inkubiert.

4.3.5 Antibiotikaselektion rKSHV-infizierter MC116-Zellen

Zwei Tage nach Infektion der Zellen (siehe 4.3.4) wurde das Medium mit 2 µg/mL Puromycin versetzt. Darauf folgend wurde die Konzentration des Antibiotikums auf 0,5 µg/mL verringert und bis 14 Tagen nach Infektion aufrecht erhalten. Während der Selektion erfolgte eine stetige Subkultivierung der Zellen alle 2-3 Tage.

4.3.6 Apoptose-Assay

Zur Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate von Zellen in Kultur wurde das "Annexin A5 Apoptosis Detection Kit" (BioLegend) verwendet. Der frühe Apoptose-Marker Phosphatidylserin (PS) befindet sich in einer intakten, nicht-apoptotischen Zelle ausschließlich auf der Innenseite der Zellmembran. Bei Eintritt in die Apoptose wird es jedoch auf die Außenseite der Membran transportiert und so auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Membranintegrität der Zelle ist zu diesem frühen Zeitpunkt der Apoptose noch erhalten.

Mit Hilfe eines Konjugats aus Annexin V und des Fluoreszenzfarbstoffes Pacific Blue (PB) wird das PS auf der Zelloberfläche gefärbt. Gleichzeitig werden nekrotische Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt, welches in die DNA interkaliert, jedoch die Membran intakter Zellen nicht passieren kann. Somit sind frühe apoptotische Zellen ausschließlich PB markiert, nekrotische oder späte apoptotische Zellen hingegen, die die Membranintegrität verloren haben, für beide Farbstoffe positiv. Da der Verlust der Membranintegrität es dem Annexin-PB-Konjugat erlaubt, in die Zelle einzudringen und das PS auf der Innenseite der Membran zu färben, kommen keine ausschließlich PI-gefärbten Zellen vor. Lebende Zellen sind negativ für die beiden Farbstoffe.

Für den Versuch wurden infizierte und nicht-infizierte MC116-Zellen ausgesät und für 24 h mit unterschiedlichen Mengen TNF- α stimuliert (3 - 30 ng/mL). Anschließend erfolgte die Färbung mit PS und PI entsprechend den Anweisungen des Kits. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers.

4.4 Hochdurchsatz-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Nukleinsäuren mittels Illumina-Hochdurchsatz-Sequenzierung müssen diese fragmentiert und mit Adaptoren gekoppelt werden. Anschließend werden die markierten Fragmente amplifiziert und gereinigt. Die fertigen Proben werden als Librarys bezeichnet und können nun mit Hilfe der entsprechenden Geräte sequenziert werden.

4.4.1 ChIP-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden ausschließlich ChIP-Proben verwendet (siehe 4.1.1), deren Integrität zunächst per qPCR überprüft wurde. Hierfür wurden Primer für diverse Kontrollbereiche des zellulären und viralen Genoms verwendet (siehe 3.4), die entsprechend positiv oder negativ für die untersuchten Histonmodifikationen sind. Nur Proben, die die erwarteten Anreicherungsmuster in den Kontrollbereichen aufwiesen, wurden für die Sequenzierung verwendet. Für die Präparation von ChIP-Librarys wurde das NEXTflex™ ChIP-Seq Kit (Bioo Scientific) verwendet. Die Präparation erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die Libraries wurden auf der Illumina HiSeq 2500-Plattform mit einer Anzahl von 20-40 mio Reads und einer Read-Länge von 50 bp sequenziert. Das Mapping der Reads auf das KSHV-Genom oder das humane Referenzgenom hg19 erfolgte mit dem Programm Bowtie v. 0.12.9 (Langmead et al. 2009). Aus den erhaltenen Datensätzen wurden mit Hilfe des Programmes BEDTools Duplikate entfernt, um so Anreicherungen durch PCR-Artefakte auszuschließen (Quinlan & Hall 2010). Für die Detektion von Bereichen mit unterschiedlichen Mengen der untersuchten Histonmodifikationen wurden zwei unterschiedliche Ansätze verwendet:

Zum einen wurde das Programm diffReps verwendet, welches den gesamten Datensatz mit definierter Schritt- und Fenstergröße abrastert (Shen et al. 2013). In dieser Arbeit wurde eine Fenstergröße von 1 kb und eine Schrittgröße von 100 bp verwendet. Die Detektion differentieller Bereiche erfolgt hierbei unabhängig von der Funktion der Bereiche, also ob es sich beispielsweise um einen Promotor oder einen intergenischen, transkriptionell inaktiven Bereich handelt. Für die H3K4me3-Modifikation wurde als Grenzwert für den z-score die Option "sharp" gewählt, für die H3K27me3-Modifikation die Option "broad". Um artifizielle Anreicherungen in einzelnen Proben auszuschließen wurden die Input-Datensätze entsprechend der vorgegebenen Option in das Programm eingespeist.

Zum anderen wurden Promotorbereiche von Genen untersucht, welche in der RNA-Sequenzierung differentielle Transkription aufwiesen. Hierzu wurde ein Bereich von je 1 kb strangauf- und strangabwärts als Promotorbereich definiert und die Reads in diesen Bereichen gezählt. Die Daten wurden auf die Anzahl der Reads in den Promotorbereichen aller Gene normalisiert, um so die technisch bedingten Schwankungen der Sequenzierungstiefe zwischen den Proben auszugleichen.

4.4.2 RNA-Sequenzierung

Für die Präparation von RNA-Librarys wurde aus eukaryotischen Zellen isolierte Gesamt-RNA verwendet (siehe 4.1.2 RNA-Isolation). Zunächst wurde die Integrität der RNA mit Hilfe des RNA Nano Kits (Agilent) am Bioanalyzer 2100 überprüft um mögliche Degradationen auszuschließen. Für die Präparation von RNA-seq Librarys wurden ausschließlich Proben mit einer RIN (RNA Integritäts-Wert) von 9 oder höher verwendet.

Die Präparation der Librarys erfolgte mit dem NEXTflex™ Directional RNA-Seq Kit v2 oder dem NEXTflex™ Rapid Directional RNA-Seq Kit (Bioo Scientific) nach Protokoll des Herstellers. Die Sequenzierung erfolgte auf der Illumina HiSeq 2500-Plattform mit einer Tiefe von ca. 60 mio Reads und einer Read-Länge von 200 bp. Das Mapping der Reads auf das KSHV-Genom oder das humane Referenzgenom hg19 erfolgte mit dem Programm STAR (Dobin et al. 2013). Für die Analyse der Daten wurde das Programm DEseq verwendet (Anders & Huber 2010).

5 Ergebnisse

5.1 Analyse humaner dermaler Fibroblasten

Das Kaposi-Sarkom-Herpesvirus kann verschiedene Tumore auslösen, darunter das namensgebende Kaposi-Sarkom, welches zumeist die Haut betrifft. Das KS setzt sich im Gegensatz zu klassischen Tumoren aus unterschiedlichen Zelltypen zusammen. Der genaue Ursprung der Tumorzellen ist unklar. In dieser Arbeit sollen daher primäre Hautzellen mit KSHV infiziert werden und zu drei Zeitpunkten nach Infektion, zwei Tage, sieben Tage und vierzehn Tage, mit parallel kultivierten, nicht-infizierten Zellen verglichen werden. Der Vergleich erfolgt auf der Ebene des Transkriptoms und der Histonmodifikationen H3K4me3 (aktivierend) und H3K27me3 (reprimierend). Dabei sollen Unterschiede im Transkriptom auf einen möglichen Zusammenhang mit der Tumorentstehung sowie auf eine epigenetische Ursache untersucht werden. Unabhängig davon sollen die Histonmodifikationen auf Veränderungen untersucht werden, die eine Prädisposition für eine veränderte Genexpression auch zu späteren Zeitpunkten darstellen könnten. Auch hier liegt ein Fokus auf Veränderungen in Bereichen, die mit tumorrelevanten Genen assoziiert sind.

Es muss berücksichtigt werden, dass die Infektion der Zellen nie zu 100% erfolgreich ist. Entsprechend befindet sich in der KSHV-positiven Probe immer ein gewisser Anteil an KSHV-negativen Zellen, welche bei der Analyse von Transkriptom und Histonmodifikationen dem Profil der nicht infizierten Zellen entsprechen und somit die Differenzen verringern bzw. die Proben aneinander angleichen. Dementsprechend wird eine möglichst hohe Infektionsrate angestrebt um die Hintergrundsignale durch nicht-infizierte Zellen gering zu halten. Für diese Arbeit wurde eine Infektionsrate von 50% als Grenzwert verwendet. Proben, die eine geringere Infektionsrate aufwiesen, wurden verworfen. Hierbei kommt erschwerend hinzu, dass das KSHV-Genom in proliferierenden Zellen verloren geht. Somit sinkt die Rate an KSHV-positiven Zellen zu späten Zeitpunkten der Infektion. Bei stetig proliferierenden Zellen konnte nach 14 Tagen keine Infektionsraten >50% erzielt werden. Aus diesem Grund wurden die Zellen nach der Infektion nicht mehr passagiert, sodass diese wenige Tage nach der Infektion konfluent wurden und auf Grund der Kontaktinhibition die Proliferation einstellten. Da eine hohe Zelldichte die Infektion negativ beeinflusst, mussten die Zellen entsprechend dünn ausgesät werden. Daher war es nicht möglich eine

gleichmäßige Konfluenz der Proben zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten zu gewährleisten. Dies gilt es beim Vergleich der Proben unterschiedlicher Zeitpunkte zu berücksichtigen.

5.1.1 De novo Infektion humaner dermaler Fibroblasten

Humane dermale Fibroblasten wurden entsprechend 4.3.4 infiziert. In Folge der Infektion wiesen die KSHV-infizierten Zellen eine erhöhte Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen und somit eine geringere Zellzahl und Dichte auf. Diese glichen sich für die Zeitpunkte 7 und 14 d.p.i. durch die Proliferation der Zellen bis zur Konfluenz wieder an. Nach 2, 7 und 14 d.p.i. wurden Chromatin entsprechend 4.1.1 und RNA entsprechend 4.1.2 isoliert. Zur Bestimmung der Infektionsrate wurde außerdem eine Immunfluoreszenz-Färbung des LANA entsprechend 4.2.5 angefertigt. Um Kontaminationen auszuschließen wurden auch die nicht-infizierten Zellen gefärbt. KSHV-positive Zellen zeigen unter dem Fluoreszenzmikroskop typische, punktartige Strukturen im Nukleus. Die Gesamtzellzahl pro Ausschnitt wurde mit Hilfe der DAPI-Färbung ermittelt. Für jede Probe wurden mindestens 100 Zellen ausgezählt. Zum frühen Zeitpunkt lagen die Infektionsraten jenseits 90%, wohingegen sie zum Zeitpunkt 14 d.p.i. nur noch bei knapp über 50% lagen. Abbildung 5-1 zeigt exemplarisch die Immunfluoreszenz-Aufnahmen eines Replikates pro Zeitpunkt.

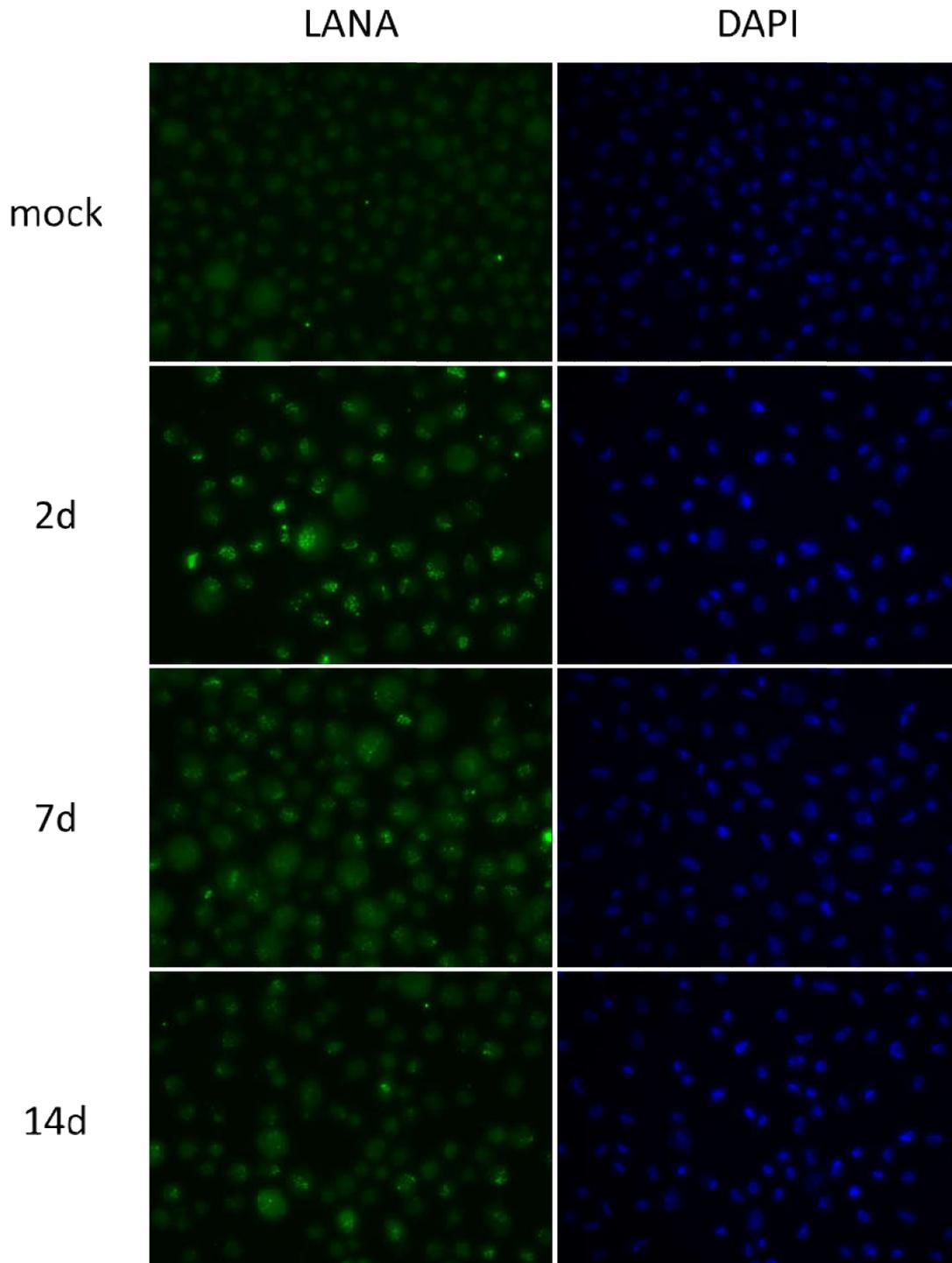


Abbildung 5-1: Immunfluoreszenzaufnahmen infizierter und nicht-infizierter HDF-Zellen zur Bestimmung der Infektionsrate.

Exemplarisch wird je ein KSHV-infiziertes Replikat pro Zeitpunkt sowie ein nicht-infiziertes Replikat gezeigt. Die linke Bildreihe zeigt die LANA-Färbung, positive Zellen weisen punktförmige Strukturen im Nukleus auf. Die rechte Bildreihe zeigt die DAPI-Färbung zur Ermittlung der Gesamtzellzahl.

Die Immunfluoreszenzanalyse zeigt, dass die HDF-Zellen erfolgreich und mit ausreichend hoher Effektivität mit KSHV infiziert werden konnten. In der Abbildung ist die Abnahme an positiven Zellen gut zu erkennen. Während 2 d.p.i. nahezu alle

Zellen LANA-positiv sind, sinkt diese Quote bei 14 d.p.i. auf knapp über 50%.

5.1.2 Transkriptomanalyse infizierter HDF-Zellen

Nachdem eine Infektionsrate von >50% sichergestellt war, wurde die RNA entsprechend 4.1.2 isoliert. Anschließend erfolgte die Library-Präparation und die Sequenzierung mit Hilfe des Illumina HiSeq 2500 (siehe 4.4.2).

Zunächst wurde das Expressionsprofil des KSHV überprüft um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um eine latente Infektion der Zellen handelt. Mit Hilfe des Programms STAR (Dobin et al. 2013) wurden die Reads mit dem viralen Referenzgenom aligniert.

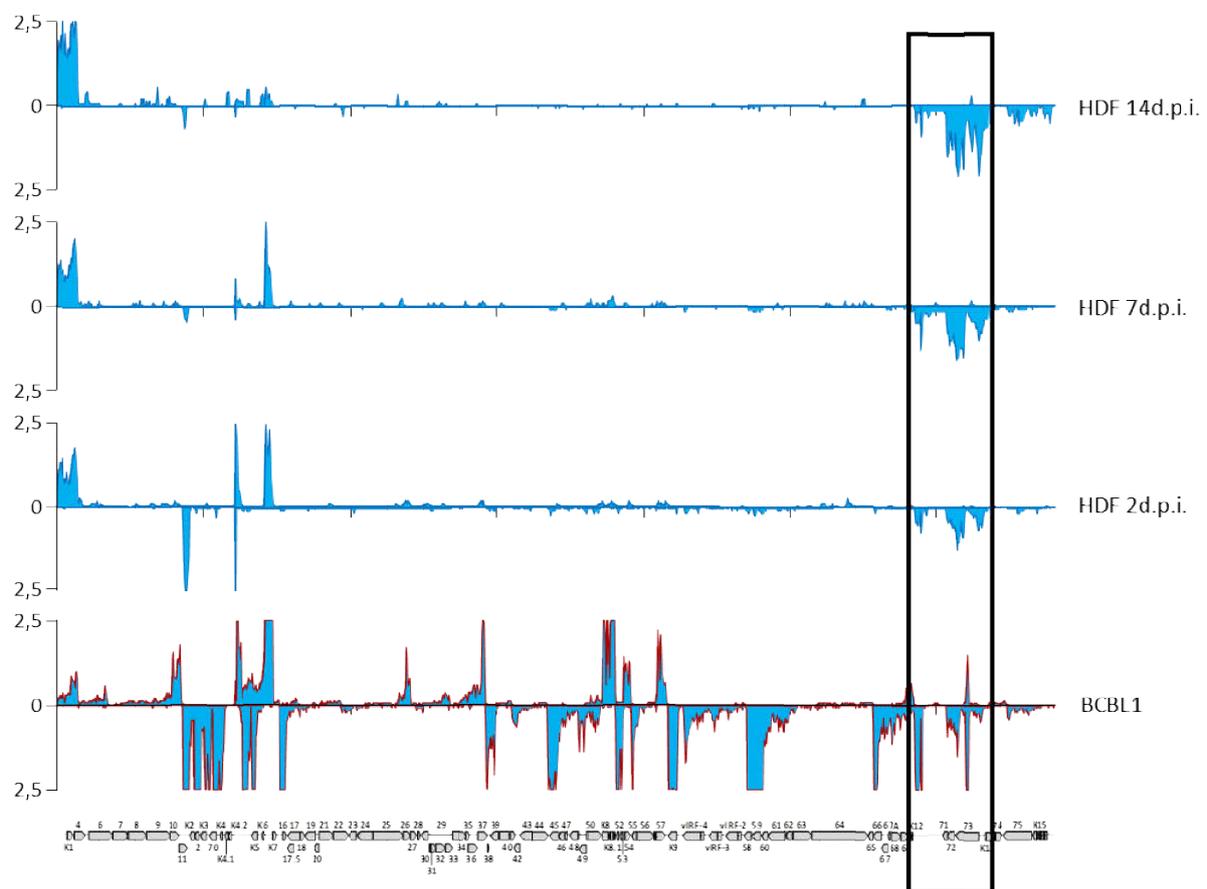


Abbildung 5-2: Virale Transkriptionsprofile aus infizierten HDF-Zellen.

In den oberen drei Paneelen wird das Transkriptionsprofil der HDF-Zellen zu den drei Zeitpunkten 2, 7 und 14 d.p.i. als normalisierter Mittelwert der Replikate ($n = 3$) gezeigt. Zum Vergleich wird im untersten Paneel das Transkriptionsprofil von teilweise lytischen BCBL1-Zellen gezeigt (rot umrandet). Auf der Y-Achse ist die Anzahl auf die Promotorbereiche normalisierter Reads aufgetragen. Um die Profile der BCBL1- mit denen der HDF-Zellen vergleichen zu können wurden die BCBL1-Werte zusätzlich auf die Anzahl der Reads im Bereich der Latenzkassette der HDF-Zellen normalisiert. Die Latenzkassette ist hervorgehoben.

Die viralen Transkriptionsprofile zeigen, dass das KSHV in HDF-Zellen latent vorliegt. Das Virus ist größtenteils inaktiv, lediglich die latenzassoziierten Gene zeigen transkriptionelle Aktivität, wie z.B. die Latenzkassette mit vFLIP, vCyclin und LANA (ORF71 - ORF73). Außerhalb dieser Kassette zeigen nur wenige Bereiche transkriptionelle Aktivität, welche darüber hinaus über die Zeit nach Infektion abnimmt. Der Unterschied zur lytischen Transkription wird beim Vergleich mit dem Profil des KSHV in BCBL1-Zellen (unterstes Paneel) deutlich. Auf Grund von spontaner Reaktivierung befindet sich das Virus in 1-2% dieser Zellen in der lytischen Phase. Bereits dieser geringe Anteil sorgt auf Grund der äußerst starken Expression lytischer viraler Gene im Zuge der viralen Replikation für die hohen Transkriptionswerte, welche zumeist deutlich über die aus Gründen der Vergleichbarkeit gewählte Skala hinausgehen. Um die Profile der BCBL1- und der HDF-Zellen vergleichen zu können wurden die BCBL1-Werte so normalisiert, dass die Summe der Reads in der Latenzkassette der BCBL1 dem Mittelwert der Summen der Reads in der Latenzkassette der HDF entspricht. Somit zeigt sich, dass relativ zur Transkription der Latenzproteine eine starke Transkription lytischer Gene stattfindet. Im Gegensatz zum latenten KSHV in den HDF-Zellen wird in den BCBL1-Zellen das gesamte virale Genom transkribiert.

Für die Analyse der zellulären Transkription wurden die Reads mit dem Referenzgenom hg19 aligniert. Mit Hilfe des Programms DESeq wurde die Abdeckung der einzelnen Genbereiche und somit die Stärke der Transkription bestimmt (Anders & Huber 2010). Aus diesem Wert wurde für die einzelnen Gene das Verhältnis zwischen infizierter und nicht-infizierter Probe im logarithmischen Maßstab bestimmt (*log₂ fold change*, *log₂FC*). Für die Bestimmung der Signifikanz der Transkriptionsänderungen wurde der p-value verwendet. In Abbildung 5-3 wird eine Übersicht über die *log₂FC* und Signifikanzwerte der HDF-Proben zu den drei Zeitpunkten gegeben. Auf Grund der besseren Darstellungsmöglichkeit wurde für die Abbildung der negative dekadische Logarithmus des p-value verwendet. Als Grenzwerte wurden ein *log₂FC* von 0,5 bzw. -0,5 und ein $-\log_{10}$ p-value von 1,3 gewählt, was einem p-value von 0,05 entspricht.

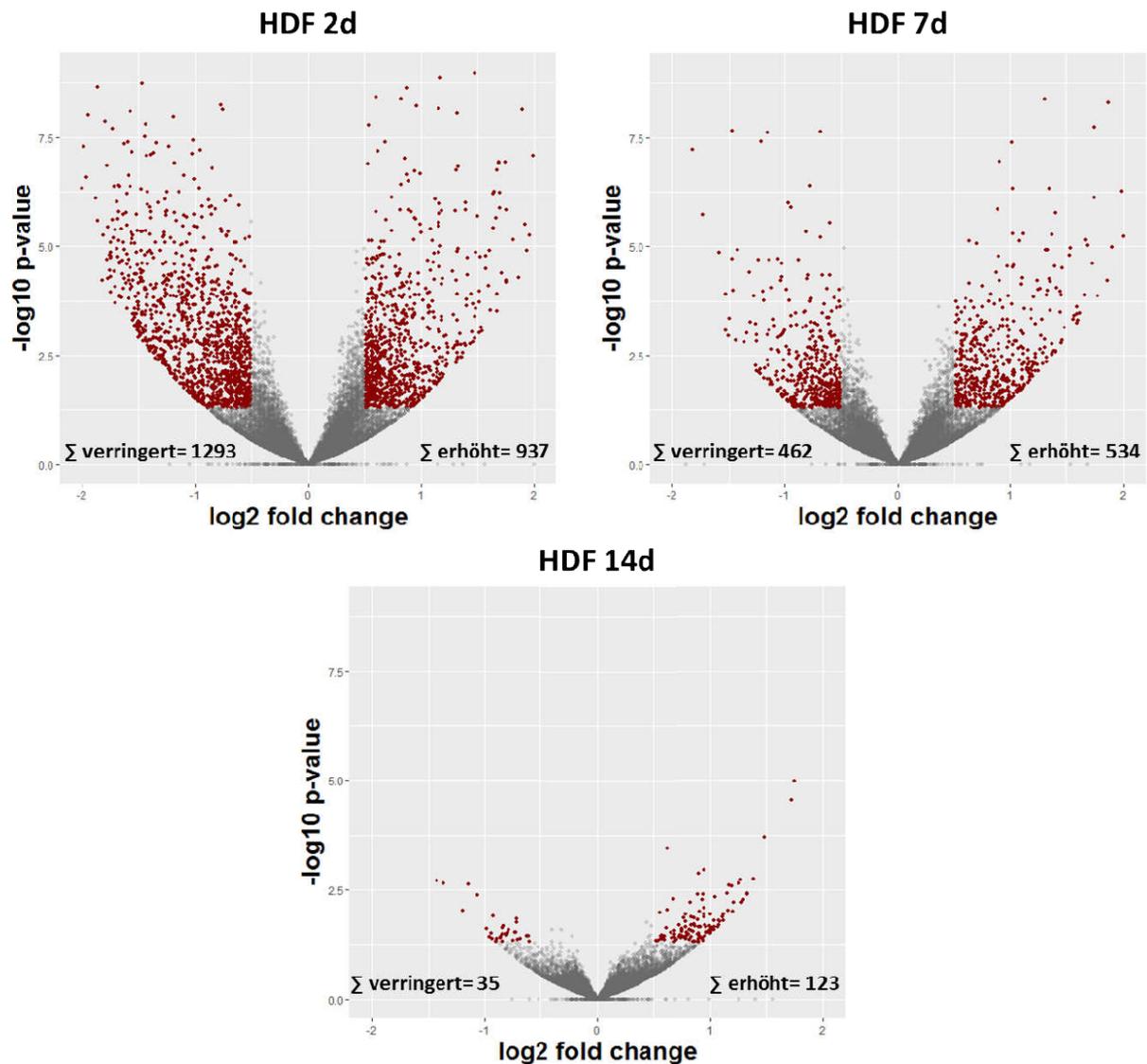


Abbildung 5-3: Volcano-Diagramme der Transkriptionsanalyse infizierter versus nicht-infizierter HDF-Zellen.

Jeder Punkt im Diagramm repräsentiert ein Gen, die Position des Punktes repräsentiert dessen veränderte Expression in KSHV-infizierten Zellen sowie den Signifikanzwert. Es handelt sich jeweils um den Mittelwert aus $n = 3$ Messungen. Auf der X-Achse ist der $\log_2\text{FC}$ dargestellt, wobei der Wert 0 Zentral auf der Achse liegt. Von dort ausgehend sind die in den infizierten Zellen geringer transkribierten Gene nach links (negative Werte) und die höher transkribierten Gene nach rechts (positive Werte) aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der negative dekadische Logarithmus des p-value ($-\log_{10} \text{p-value}$) aufgetragen. Je höher die Veränderung und die Signifikanz, desto stärker streben die Punkte den oberen beiden Ecken des Diagramms entgegen, je nach Art der Veränderung. In dieser Arbeit wurden Grenzwerte von $\log_2\text{FC} = 0,5/-0,5$ und $-\log_{10} \text{p-value} = 1,3$ verwendet (entspricht einem p-value von 0,05). Alle Gene die diese Kriterien erfüllten sind in der Abbildung rot, die übrigen Gene grau eingefärbt.

An Hand von Abbildung 5-3 kann man erkennen, dass die Anzahl an Genen mit $\log_2\text{FC}$ und $-\log_{10} \text{p-value}$ oberhalb der gewählten Grenzwerte über die Zeit nach Infektion abnimmt. Infizierte und nicht-infizierte Proben gleichen sich hinsichtlich ihres Expressionsprofils mit zunehmender Zeit nach der Infektion an.

Von besonderem Interesse für die weitere Analyse waren die Gene, welche zu allen drei untersuchten Zeitpunkten eine signifikant differentielle Expression ($\log_2\text{FC} > 0,5$

bzw. $< -0,5$) zwischen infizierten und nicht-infizierten Proben aufwiesen, da solche konsistenten Änderungen von höherer Relevanz für eventuelle Prädispositionen für die Tumorentstehung sind als temporäre Differenzen.

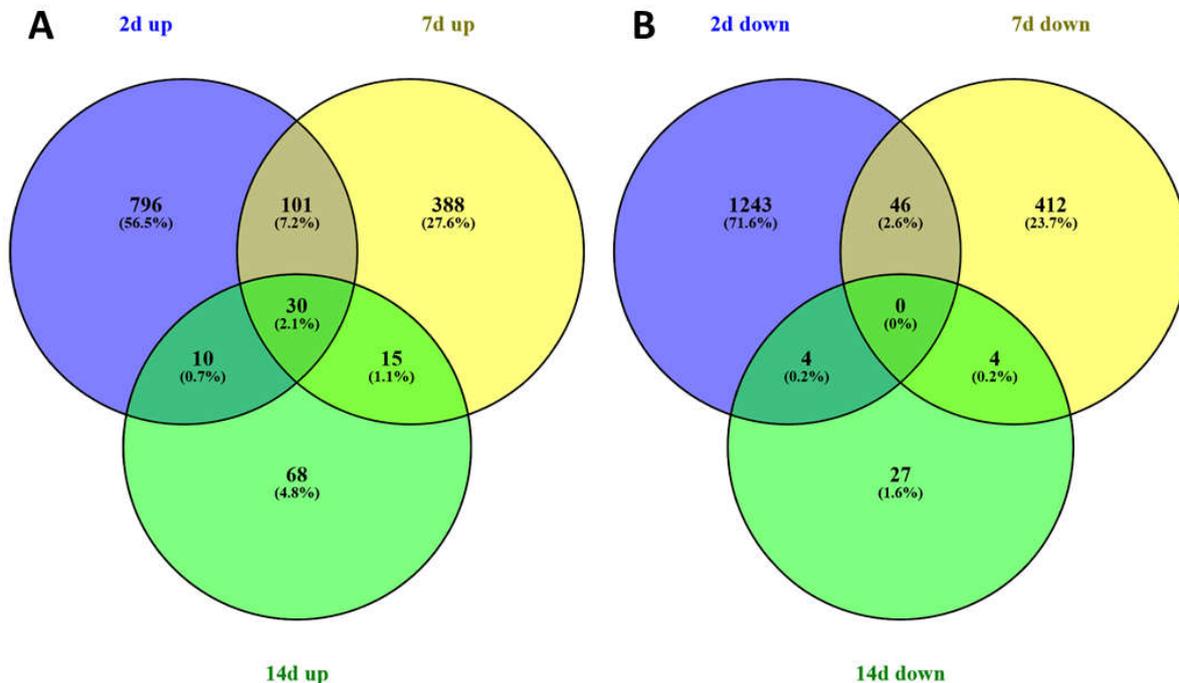


Abbildung 5-4: Venn-Diagramm differenziell transkribierter Gene in KSHV-infizierten HDF im Vergleich zu mock-infizierten Zellen.

Es sind jeweils die differenziell transkribierten Gene zu den drei Zeitpunkten 2 (blau), 7 (gelb) und 14 (grün) d.p.i. in KSHV-infizierten versus mock-infizierten HDF dargestellt (p -Wert $< 0,05$; $\log_2FC > 0,5$ bzw. $< -0,5$). Für jeden Zeitpunkt wurden jeweils die Mittelwerte aus $n = 3$ Replikaten verwendet. **A:** Gene mit gesteigerter Transkription; **B:** Gene mit verringerter Transkription.

Die Analyse ergab, dass nur 30 Gene eine konsistente, signifikante Änderung über alle drei Zeitpunkte zeigten, wobei es sich ausschließlich um Gene mit einer erhöhten Transkription handelte. Generell zeigten sich bei höher transkribierten Genen mehr Gemeinsamkeiten zwischen den Zeitpunkten als bei schwächer transkribierten Genen. Insgesamt ist der Anteil an konsistenten Veränderungen zwischen infizierten und nicht-infizierten Proben, auch zwischen nur zwei Zeitpunkten, sehr gering. Lediglich 11% der zu den einzelnen Zeitpunkten identifizierten Gene mit erhöhter und nur 3% mit geringerer Transkription zeigen auch zu einem anderen Zeitpunkt eine signifikante Änderung.

Um die Varianz der Transkription der einzelnen Replikate zu analysieren wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA, *principal component analysis*) durchgeführt. Sollte die Infektion zu einer deutlichen Veränderung der Transkription führen, so sollten die infizierten Proben und die nicht-infizierten Proben jeweils eigene Cluster bilden.

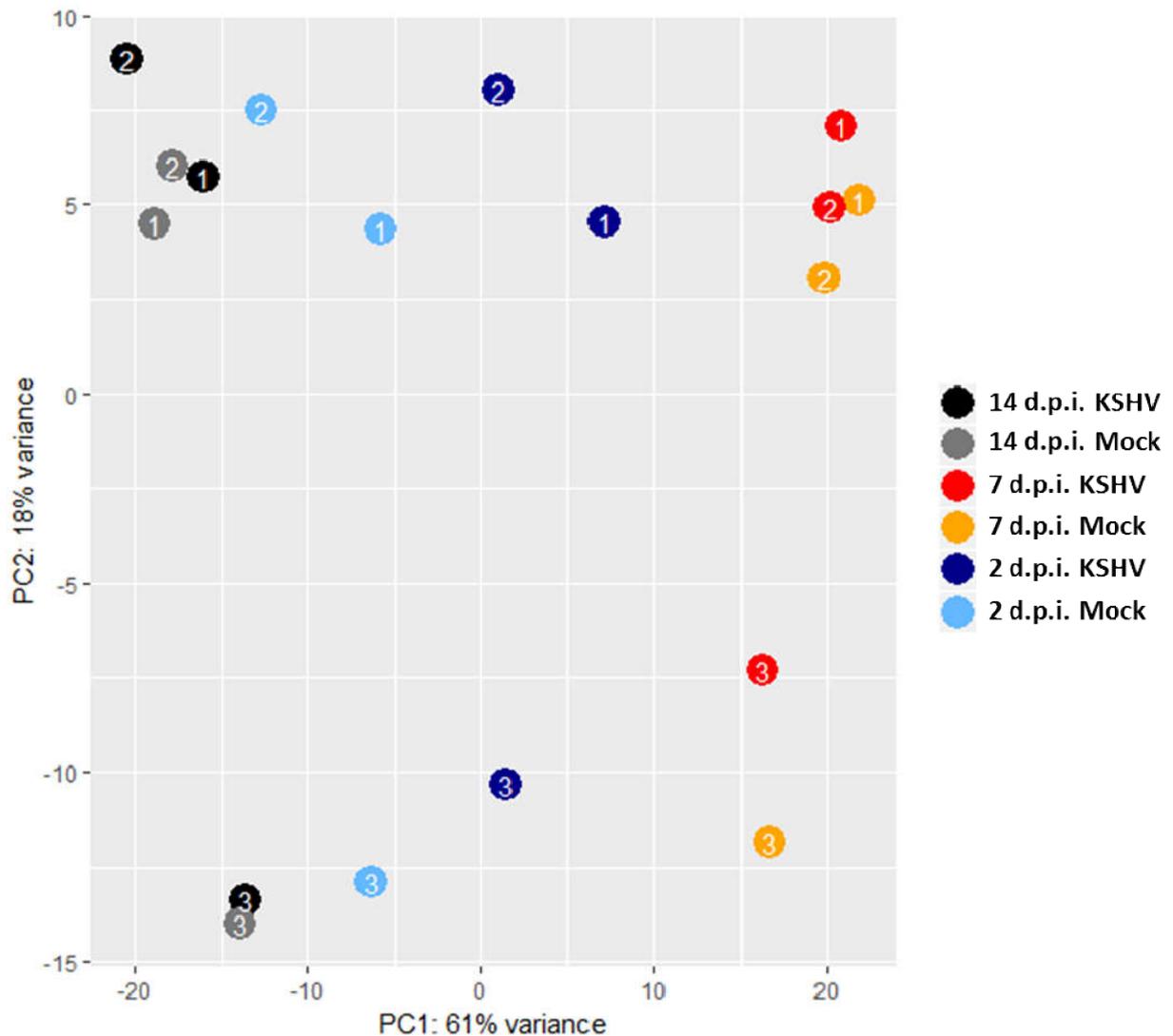


Abbildung 5-5: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptionsunterschiede der infizierten und nicht-infizierten HDF-Zellen.

Jeder Punkt in der PCA entspricht einer Probe. Die Position des Punktes spiegelt die Varianz der Transkription der Proben untereinander wider. Die zusammengehörigen Replikate sind jeweils in der gleichen Farbe dargestellt, in den Punkten ist die Nummer des Replikats angegeben.

Wie in Abbildung 5-5 zu erkennen, ist dies nicht der Fall. Vielmehr zeigt sich, dass die Replikate der Zeitpunkte Cluster bilden, jedoch unabhängig davon ob es sich um infizierte oder nicht-infizierte Proben handelt. Somit scheint die KSHV-Infektion einen geringen Einfluss auf die generelle Transkription zu haben. Des Weiteren weichen die Proben von Replikat Nr 3 von den anderen beiden Replikaten ab. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse die Ergebnisse der Venn-Diagramme: Die KSHV-Infektion scheint nur zu wenig konsistenten Änderungen der Transkription zu führen.

Die 30 konsistent differentiell transkribierten Gene sind in Tabelle 5-1 aufgelistet. Im Anhang dieser Arbeit befindet sich eine detaillierte Liste mit den log₂FC- und pvalue-Werten (Tabelle 10-1). Eine Analyse auf funktionelle Zusammenhänge ergab, dass viele der durch diese Gene codierten Proteine in die antivirale Immunantwort involviert sind.

Tabelle 5-1: Liste der Gene, die zu allen drei Zeitpunkten in den KSHV-infizierten HDF-Zellen eine erhöhte Transkription aufwiesen.

Gene, die mit Hilfe der Gen-Ontologie-Analyse einem der drei Immunantwort-assoziierten Cluster zugeordnet wurden, sind in rot markiert.

Symbol	Name	Symbol	Name
CCND2	cyclin D2	LOC645638	
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10	MX1	MX dynamin like GTPase 1
CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11	MX2	MX dynamin like GTPase 2
DCAF12L2	DDB1 and CUL4 associated factor 12 like 2	NAP1L2	nucleosome assembly protein 1 like 2
EPSTI1	epithelial stromal interaction 1	OAS1	2-5-oligoadenylate synthetase 1
HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	OAS2	2-5-oligoadenylate synthetase 2
HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6	OASL	2-5-oligoadenylate synthetase like
HIST1H1C	histone cluster 1 H1 family member c	PCDHA10	protocadherin alpha 10
IFI6	interferon alpha inducible protein 6	PCDHB16	protocadherin beta 16
IFI44	interferon induced protein 44	PCDHB8	protocadherin beta 8
IFI44L	interferon induced protein 44 like	PEG3	paternally expressed 3
IFIT1	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	PTPRN2	protein tyrosine phosphatase, receptor type N2
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	TGFA	transforming growth factor alpha
LEP	leptin	ZNF560	zinc finger protein 560

Zur Bestätigung der RNA-seq Daten wurde eine qPCR mit Primern spezifisch für ausgewählte Gene der 30 differentiellen Gene aus Tabelle 5-1 durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die RNA wie in 4.1.3 beschrieben in cDNA umgewandelt. Um Hintergrundsignale durch genomische DNA zu minimieren wurden ausschließlich Primer verwendet die entweder ein ausreichend großes Intron überspannen oder aber direkt auf der Grenze zwischen zwei Exons binden. Die Ergebnisse der qPCR-Analyse bestätigten die erhöhte Transkription der analysierten Gene in infizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Mittels Gen-Ontologie-Analyse mit dem Programm WebGestalt 2017 (Zhang et al. 2005; Wang et al. 2013) konnten verschiedene funktionelle Cluster identifiziert werden, die im Wesentlichen die gleichen Gene enthalten. Der überwiegende Teil dieser Cluster ist mit der Immunantwort assoziiert, spezifisch der Typ I Interferon-Antwort sowie der viralen Immunantwort. Die in diesen Clustern enthaltenen Gene sind in Tabelle 5-1 rot markiert. Tabelle 5-2 zeigt eine Übersicht über das Ergebnis der Gen-Ontologie-Analyse, es sind die Top 10 Cluster angegeben.

Tabelle 5-2: Ergebnisse der Gen-Ontologie-Analyse der Gene, die zu allen Zeitpunkten in den KSHV-infizierten HDF-Zellen eine erhöhte Expression aufwiesen.

Für die Analyse wurde das Programm WebGestalt verwendet. In der Tabelle sind die Top 10 Cluster der Analyse angegeben. AW = Anreicherungswert.

Name	Anzahl Gene	AW	Pval
Antwort auf Typ 1 Interferon	10	79,15	0
Typ 1 Interferon Signalweg	10	83,37	0
Zelluläre Antwort zu Typ 1 Interferon	10	83,37	0
Reaktion auf Virus	13	26,74	2,22e-16
Virus-Immunantwort	12	33,06	3,33e-16
Cytokin-medierter Signalweg	13	15,14	3,39e-13
Neg. Regulation viraler Genomrepl.	7	91,19	7,81e-13
Immunantwort auf anderen Organismus	12	16,94	9,88e-13
Reaktion auf anderen Organismus	14	11,37	1,26e-9
Reaktion auf ext. biotischen Stimulus	14	11,35	1,26e-9

Insgesamt zeigte die vergleichende Analyse des Transkriptoms infizierter und nicht-infizierter HDF-Zellen einen nur sehr geringen Einfluss der Infektion auf die Transkription. Jedoch konnten einige wenige konsistente Änderungen ermittelt werden. Unter diesen differentiell transkribierten Genen befanden sich 14, die mit einer Funktion in der Virus-Immunantwort assoziiert sind. Des Weiteren ist die

aberrante Expression der detektierten Gene CCND2, EPSTI1 und TGFA mit unterschiedlichen Tumoren assoziiert (Wang et al. 2016; Misiewicz-Krzeminska et al. 2016; Nielsen et al. 2002; Li et al. 2014; Fanelli et al. 2012; Tarhini et al. 2014). In den folgenden Abschnitten soll überprüft werden, ob die Ursache dieser Änderungen der Transkription in Änderungen von aktivierenden oder reprimierenden Histonmodifikationen begründet ist. Da es sich bei den drei tumorassoziierten Genen jeweils nur um einzelne Gene ohne funktionelle Relation untereinander handelt, welche auch noch mit unterschiedlichen Arten von Tumoren in Zusammenhang stehen, wurde der Fokus hierbei auf die Gene des Immunantwort-Cluster gelegt. Des Weiteren soll unabhängig von den Änderungen der Transkription nach Unterschieden zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen bei den Histonmodifikationen gesucht werden. Diese könnten eine Prädisposition für spätere Änderungen der Transkription darstellen und somit für die Tumorentstehung relevant sein.

5.1.3 Analyse der Histonmodifikationen infizierter HDF-Zellen

Die Isolation des Chromatins infizierter und nicht-infizierter HDF-Zellen erfolgte 2, 7 und 14 d.p.i. parallel zur Isolation der RNA. Die Isolation sowie die anschließende ChIP erfolgten wie unter 4.1.1 beschrieben. Es wurden jeweils Antikörper für die aktivierende H3K4me3- und die reprimierende H3K27me3-Histonmodifikation verwendet (siehe 3.2.1). Zur Kontrolle des Erfolgs der ChIP wurden die Proben vor der Sequenzierung per qPCR analysiert (siehe 4.1.4 und 4.4.1, Daten nicht gezeigt). Bei erfolgreicher ChIP wurden die Proben per NGS analysiert.

Zunächst wurden die Profile der Histonmodifikationen auf dem KSHV-Genom überprüft. Mit diesem Schritt sollte analysiert werden, ob das Virus in HDF-Zellen ein zur Transkription passendes Muster aufweist und ob es im Vergleich zum Muster von BCBL1-Zellen Differenzen gibt. Deren Profil konnte, mit nur geringen Abweichungen, bereits in mehreren Zelltypen nachgewiesen werden. Starke Abweichungen vom Profil der BCBL1-Zellen könnten auf ein untypisches Verhalten des Virus im gewählten Zelltyp hindeuten.

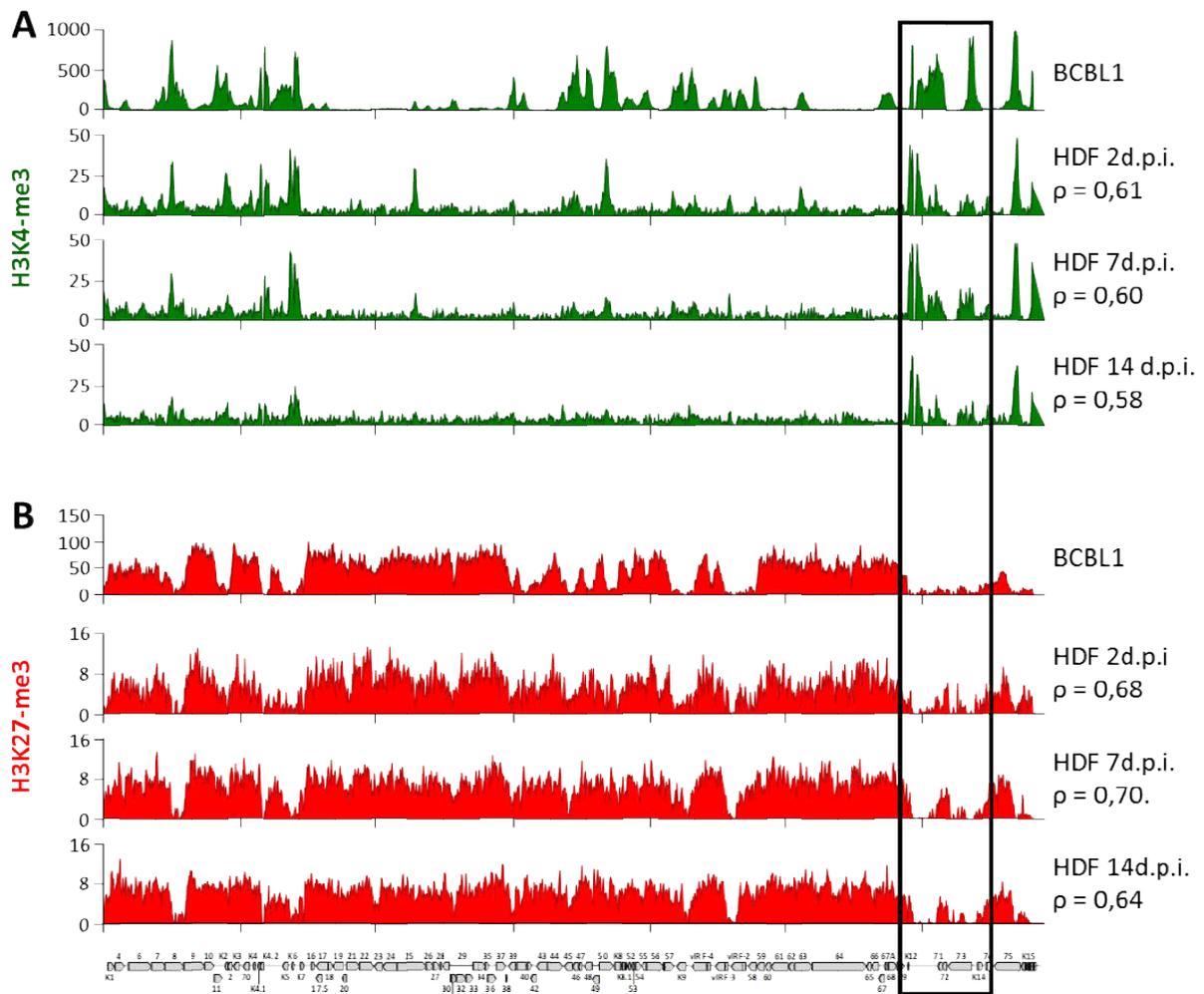


Abbildung 5-6: Profile der Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 auf dem KSHV-Genom in HDF-Zellen.

HDF-Zellen wurden *de novo* mit KSHV infiziert. Das Chromatin wurde nach 2, 7 und 14 d.p.i. isoliert und auf die Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 untersucht. Es sind jeweils die normalisierten Mittelwerte ($n = 3$) der Besetzung des KSHV-Genoms mit den Histonmodifikationen in HDF-Zellen, sowie in BCBL1-Zellen zum Vergleich dargestellt. Für jedes HDF-Profil ist der Pearson-Korrelationskoeffizient (ρ) relativ zum BCBL1-Profil angegeben. **A:** Profile der H3K4me3-Modifikation, das oberste Diagramm zeigt BCBL1-Zellen als Referenz, die Diagramme darunter die HDF-Zellen in aufsteigender Dauer nach Infektion. **B:** Profile der H3K27me3-Modifikation, Anordnung s.o. Im schwarzen Rechteck wird die Latenzkassette hervorgehoben.

Sowohl für die H3K4me3- als auch die H3K27me3-Modifikation konnten Profile sehr ähnlich dem des Virus in BCBL1-Zellen gezeigt werden. Dabei zeigt die H3K4me3 nur wenige, scharf umgrenzte Bereiche der Anreicherung, unter anderem in der hervorgehobenen Latenzkassette. Hingegen ist die H3K27me3 über nahezu das gesamte virale Genom verteilt, wobei die Latenzkassette nur eine geringe Besetzung mit dieser Modifikation zeigt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient für die H3K4me3-Modifikation liegt für alle Zeitpunkte bei ca. 0,6; für die H3K27me3 Modifikation liegt er geringfügig höher. Vor dem Hintergrund, dass es sich um unterschiedliche Zelllinien handelt und somit gewisse Differenzen zu erwarten sind, zeigt der

Korrelationskoeffizient ein hohes Ausmaß an Korrelation der Histonmodifikationen an. Zum Vergleich: Der Korrelationskoeffizient für die H3K4me3-Datensätze der Zeitpunkte 7 d.p.i. und 14 d.p.i. liegt bei $\rho = 0,83$. Für beide Modifikationen sind die Profile bereits 2 d.p.i. vollständig etabliert. Insgesamt zeigt die Analyse, dass das KSHV in HDF-Zellen die erwarteten Histonmodifikationsprofile einer latenten Infektion aufweist. Somit liegt kein untypisches Verhalten des Virus vor, welches die nun folgende Untersuchung der Histonmodifikationen auf dem humanen Genom verfälschen bzw. beeinflussen könnte.

Die Daten der Sequenzierung wurden mit Hilfe des R-Paketes ChIPseeker analysiert (Yu et al. 2015). Ziel war es, die generelle Distribution der Reads auf bestimmte Bereiche des humanen Genoms wie z.B. Promotoren zu ermitteln. Zum einen ließ sich so überprüfen, ob die Modifikationen tatsächlich in den erwarteten DNA-Bereichen zu finden sind. Zum anderen kann durch den Vergleich KSHV-infizierter und nicht-infizierter Proben ermittelt werden, ob eine generelle Änderung in der Verteilung der Modifikationen stattfindet. Um den Einfluss des Hintergrundes, d.h. der Reads in Bereichen ohne signifikante Anreicherung der Modifikation, auf die Analyse zu verringern, sollten nur angereicherte Bereiche auf ihre Distribution überprüft werden. Dazu wurden die Datensätze der Histonmodifikationen mittels des Programms diffReps (Shen et al. 2013) mit ihren Input-Datensätzen verglichen. Das Ergebnis der diffReps-Analyse ist eine Liste der genomischen Bereiche die gegenüber dem Input eine Anreicherung aufweisen.

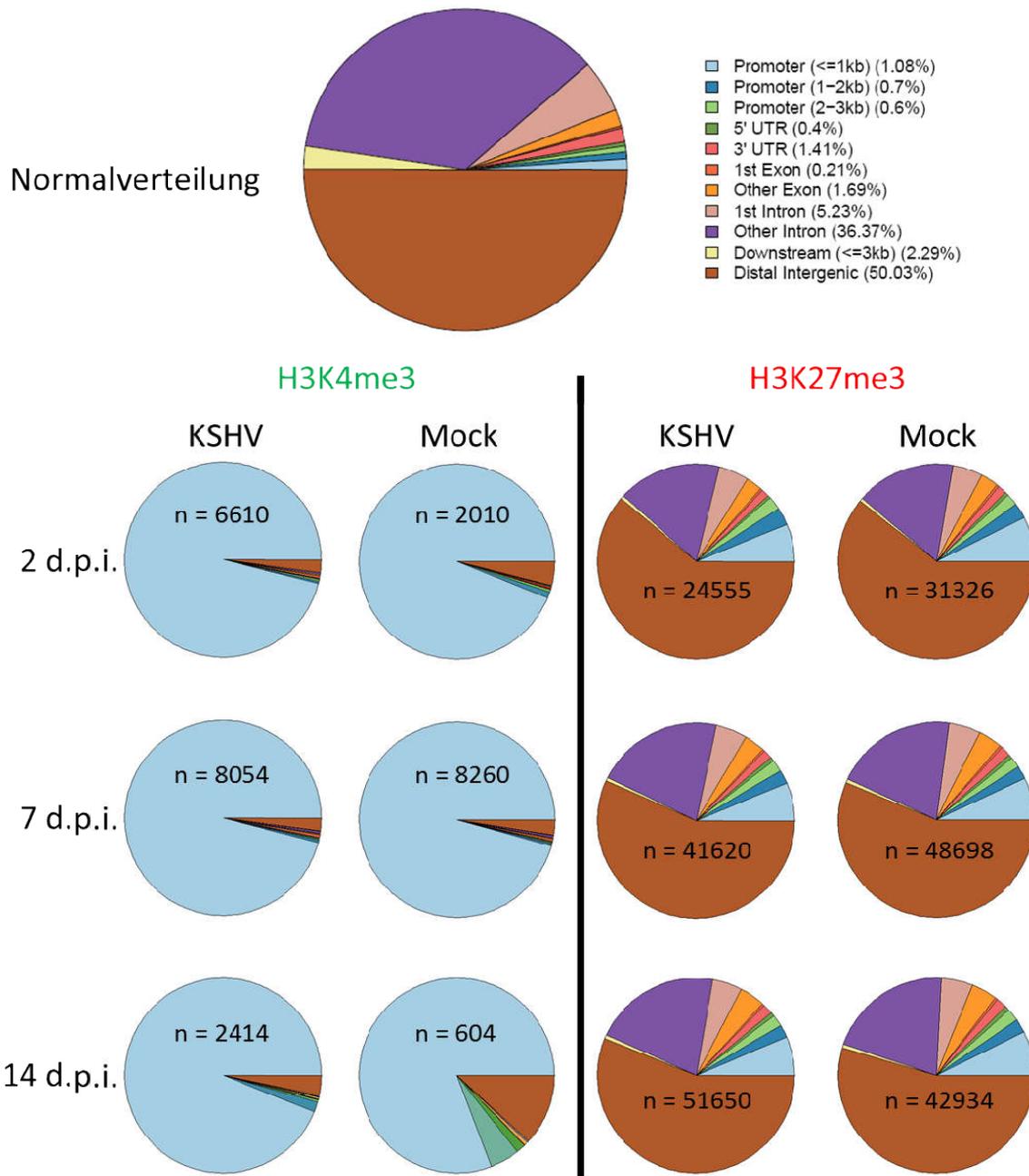


Abbildung 5-7: Distributionsanalyse angereicherter Bereiche der CHIP-Datensätze aus HDF-Zellen mittels ChIPseeker.

Mit Hilfe des Programms diffReps wurden gegenüber dem Input angereicherte Bereiche identifiziert und mit ChIPseeker hinsichtlich ihrer Verteilung analysiert. Das oberste Diagramm basiert auf der Verteilung der verschiedenen genomischen Bereiche und gibt somit die zu erwartende Distribution bei einer zufälligen Verteilung der Reads an. Das linke Panel zeigt die Distribution der infizierten (KSHV) und nicht-infizierten (Mock) Proben der H3K4me3-Modifikation, das rechte die der H3K27me3-Modifikation. Für jedes Diagramm ist die Gesamtzahl der mittels diffReps detektierten angereicherten Bereiche angegeben.

Die H3K4me3-Modifikation ist wie erwartet vor allem in Promotorbereichen angereichert. Die H3K27me3-Modifikation hingegen ist eher gleichmäßig über das Genom verteilt, wobei gegenüber der zufälligen Verteilung auch hier die Promotorbereiche überrepräsentiert sind. Des Weiteren ist sie in distalen intergenischen Bereichen verstärkt angereichert. Ein Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Proben ließ sich nicht feststellen. Lediglich die nicht-infizierte 14 d.p.i. Probe der H3K4me3-Modifikation wies einen erhöhten Anteil an Anreicherungen in distalen intergenischen Bereichen auf. Somit scheint die KSHV-Infektion die generelle Verteilung der untersuchten Histonmodifikationen nicht zu beeinflussen.

Im nächsten Schritt wurden die ChIP-seq Ergebnisse mit Hilfe des Programms diffReps unabhängig von den Ergebnissen der Transkriptom-Analyse auf Differenzen zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen untersucht. Da nur wenige konsistente Änderungen der Transkription detektiert werden konnten, ist der Einfluss des KSHV auf dieser Ebene anscheinend gering. Stattdessen wäre es möglich, dass durch Veränderungen der Histonmodifikationen eine Prädisposition für die Dysregulation von Genen geschaffen wird. Diese könnten dann erst später in der Expression zum Tragen kommen, beispielsweise wenn weitere tumorogene Ereignisse eintreten bzw. andere Regulationsmechanismen versagen. Für die diffReps-Analyse wurden die Standard-Parameter des Programms verwendet, der z-score-Grenzwert wurde entsprechend der untersuchten Modifikation angepasst. Da das Programm für die H3K4me3-Modifikationen auch Bereiche mit äußerst geringen Differenzen als signifikantes Ergebnis bewertet, wurde für diese Modifikation außerdem ein log₂FC-Grenzwert von 0,25 bzw. -0,25 verwendet. Wie schon für die Transkriptomanalyse sollte zunächst nach konsistenten Änderungen über alle Zeitpunkte gesucht werden. Für diese Analyse wurden ausschließlich differentielle Fenster ausgewählt, die mit einem Gen assoziiert sind, d.h. distale intergenische Bereiche wurden ausgeschlossen.

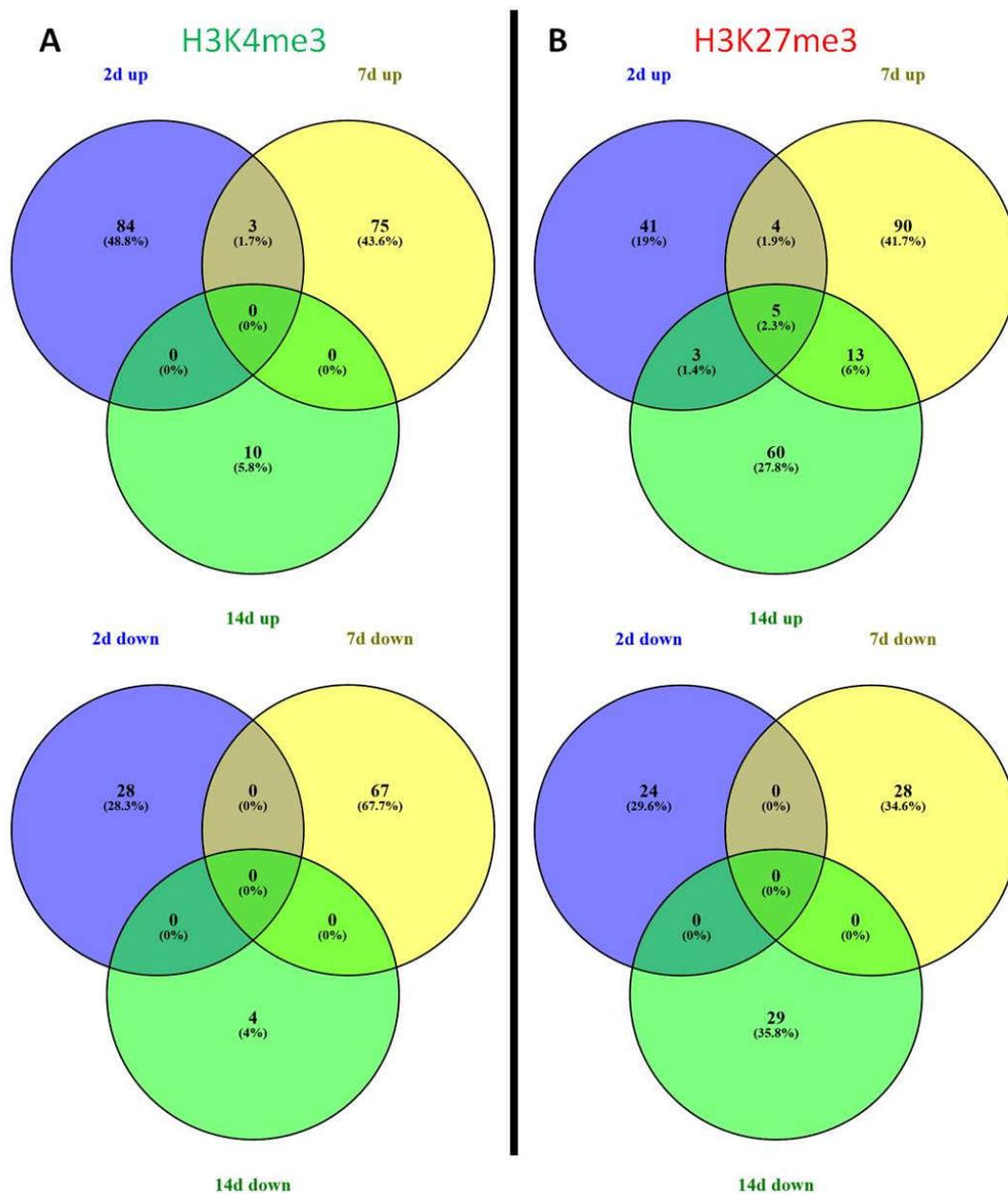


Abbildung 5-8: Venn-Diagramme der diffReps-Analyse zur Identifikation Bereiche differentieller Histonmodifikationen in KSHV-infizierten HDF im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen.

Es sind genassoziierte Fenster mit differentiellen Levels an Histonmodifikationen ab einem \log_2FC von 0,25 bzw. -0,25 zu den Zeitpunkten 2, 7 und 14 d.p.i. dargestellt. **A:** Änderungen der H3K4me3-Modifikation; in der oberen Abbildung sind Anstiege, in der unteren Reduktionen dargestellt. **B:** Änderungen der H3K27me3-Modifikation; in der oberen Abbildung sind Anstiege, in der unteren Reduktionen dargestellt.

Die Analyse der ChIP-seq-Daten mittels diffReps ergab nur sehr wenige Bereiche mit signifikanten Differenzen zu den einzelnen Zeitpunkten nach Infektion. Des Weiteren zeigten sich hierbei kaum konsistente Veränderungen über die drei Zeitpunkte. Für die H3K4me3-Modifikation ergaben sich keine gemeinsamen Änderungen über alle drei Zeitpunkte und lediglich drei gemeinsame Anreicherungen für 2 und 7 d.p.i. Bei der H3K27me3-Modifikation zeigten sich fünf gemeinsame Anreicherungen über alle drei Zeitpunkte sowie einige weitere gemeinsame zwischen zwei Zeitpunkten.

Gemeinsame Reduktionen konnten für keine der beiden untersuchten Modifikationen festgestellt werden. Da somit insgesamt nur fünf Gene mit differentiellen Histonmodifikationen über alle drei Zeitpunkte durch diffReps detektiert werden konnten, ist eine Analyse der Gen-Ontologie nicht sinnvoll. Die detektierten Gene sind in Tabelle 5-3 zusammen mit einer kurzen Funktionsbeschreibung sowie den zugehörigen Änderungen in H3K27me3-Besetzung und Transkription dargestellt. Für den Transkriptionsfaktor TSHZ2 ist eine mögliche Rolle als Tumorsuppressor bei Brust- und Prostatakarzinomen beschrieben. Untersuchungen zeigten eine verringerte Expression von TSHZ2 in diesen Erkrankungen (Yamamoto et al. 2011). Eine Assoziation weiterer Gene mit Tumorerkrankungen ist in der Literatur nicht beschrieben. Die vollständigen Ergebnisse der diffReps-Analyse der HDF-Zellen zu den einzelnen Zeitpunkten befinden sich im Anhang.

Betrachtet man die zugehörigen Transkriptionswerte der Gene mit konsistenter Anreicherung der H3K27me3-Besetzung (siehe Tabelle 5-3), so zeigt sich für keines der Gene eine konsistente Änderung. Darüber hinaus weisen einige Gene trotz erhöhter H3K27me3-Besetzung gesteigerte Transkriptionswerte zu einzelnen Zeitpunkten auf.

Tabelle 5-3: Gene mit konsistenter Anreicherung der H3K27me3-Modifikation nach Analyse mit diffReps.

Alle in der Tabelle aufgelisteten Gene zeigten eine Anreicherung an H3K27me3 in KSHV infizierten HDF-Zellen gegenüber nicht-infizierten Zellen. Für das Gen TSHZ2 ist eine mögliche Funktion als Tumorsuppressor beschrieben. In der rechten Tabellenhälfte sind die Änderungen (\log_2FC) der Transkription (obere Zeile) und der H3K27me3-Modifikation (untere Zeile) zwischen KSHV-infizierten und mock-infizierten Zellen für die entsprechenden Gene angegeben.

Gen	Funktion		2 d	7 d	14 d
ANO2	Calcium aktivierter Chlorid-Kanal (Geruchssinn)	Transkription	-0,06	-0,07	0,26
		H3K27me3	1,41	1,32	1,43
ATP9A	ATPase	Transkription	0,24	-0,1	-0,09
		H3K27me3	1,36	1,08	1,52
IQCA1	ATPase	Transkription	0,47	-0,07	0,39
		H3K27me3	1,97	1,31	1,68
TH1L	Teil des NELF-Komplexes, Inhibiert Elongation d. RNA-Pol II	Transkription	0	-0,14	-0,01
		H3K27me3	1,69	1,26	1,54
TSHZ2	Transkriptionsfaktor, mögl. Tumorsuppressor	Transkription	-0,32	-0,52	0
		H3K27me3	2,08	1,32	1,27

Mit Hilfe von diffReps konnten auch für die einzelnen Zeitpunkte nur sehr wenige signifikante Differenzen festgestellt werden, deutlich weniger als für die Transkriptomanalyse. Da sich auf Grund der geringen Anzahl konsistenter Änderungen keine Ansatzpunkte für weitere Analysen ergaben, sollte im folgenden Schritt überprüft werden wie sich die Histonmodifikationen in den Promotorregionen der Gene mit differentieller Transkription aus Tabelle 5-1 verhalten. Auf Grund der Analyse der Gen-Ontologie wurde hier ein Fokus auf die Gene der antiviralen Cluster gelegt. Hierzu wurden die Reads in einem Fenster 1 kb strangauf- und strangabwärts des Transkriptionsstarts gezählt. Um artifizielle Differenzen durch technisch bedingte Unterschiede in der Gesamtanzahl der Reads der einzelnen Proben auszuschließen, wurden die Ergebnisse auf die Anzahl der Reads in den Promotorbereichen aller Gene normalisiert.

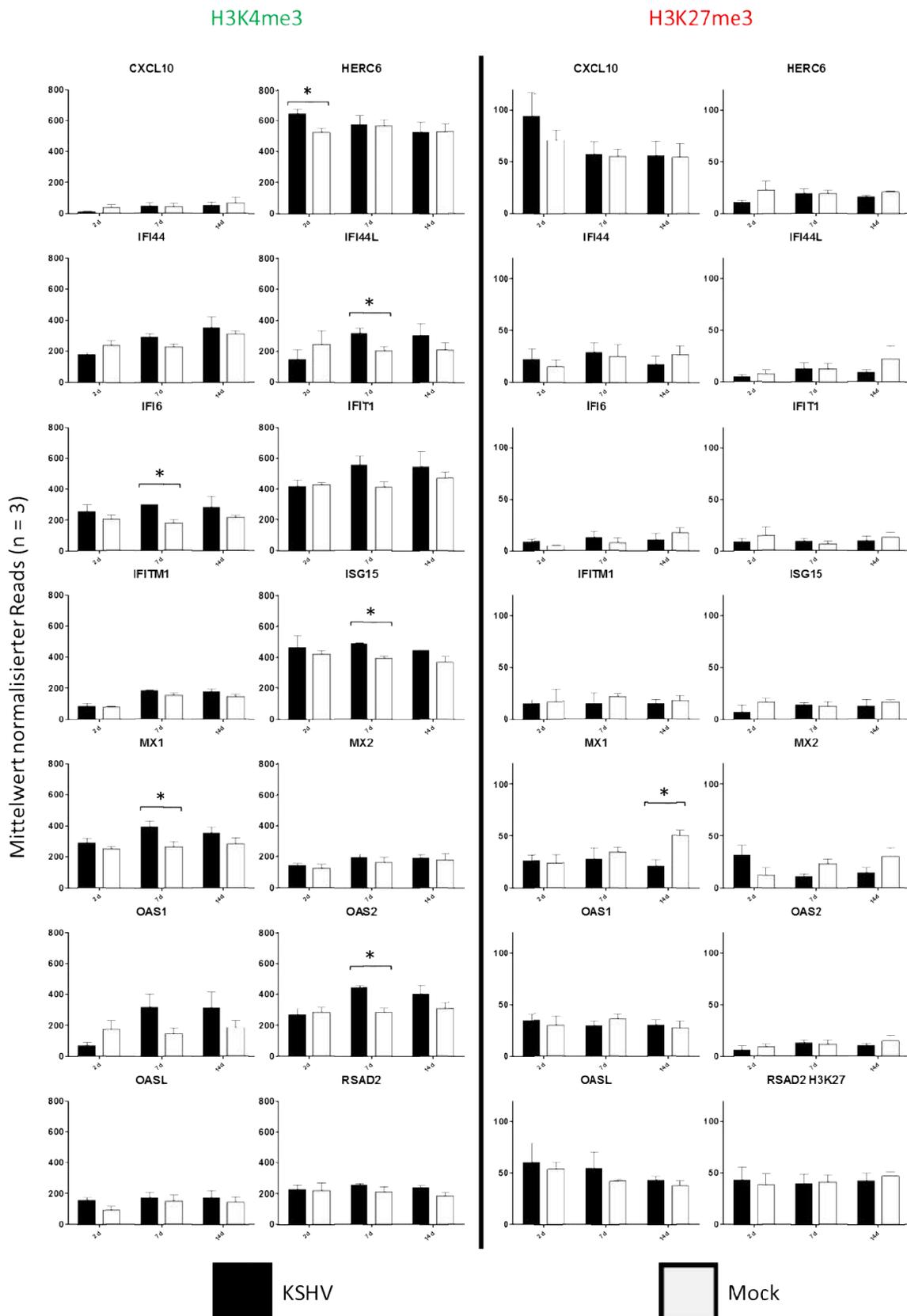


Abbildung 5-9: Übersicht über die Level der Histonmethylierungen an den Promotorregionen der Gene der antiviralen Cluster.

Dargestellt ist die normalisierte Anzahl an Reads in einem Fenster 1000 bp strangauf- und strangabwärts des TSS; im linken Panel wird die H3K4me3-Modifikation gezeigt, im rechten die H3K27me3-Modifikation. In jedem einzelnen Diagramm sind von links nach rechts die Werte für die einzelnen Zeitpunkte 2, 7 und 14 d.p.i. dargestellt, die KSHV-infizierten Proben in schwarz, die mock-infizierten in weiß. Signifikante Änderungen sind mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Die Analyse der Histonmodifikationen in den Promotorregionen der Gene der antiviralen Cluster zeigte, von wenigen Ausnahmen abgesehen, keine signifikanten Änderungen zwischen infizierten und nicht-infizierten Proben. Diese Ausnahmen traten zudem nur vereinzelt auf, d.h. lediglich zu einem der drei Zeitpunkte pro Gen. Jedoch scheint für die H3K4me3-Modifikation eine klare Tendenz vorhanden zu sein, so zeigten 34 von 39 Vergleichen der Promotorregionen infizierter und nicht-infizierter Proben einen höheren Level an H3K4me3 in infizierten Zellen (siehe Abbildung 5-9, die H3K4me3 negativen Regionen des CXCL10 ausgeschlossen). Dies passt zu der per RNA-Sequenzierung festgestellten erhöhten Transkription dieser Gene. Für die H3K27me3-Modifikation konnte keine solche Tendenz festgestellt werden. Zudem liegen die Level dieser Modifikation für einen Großteil dieser Gene im Bereich des Hintergrundes, sie sind somit negativ für diese Modifikation.

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung der Histonmodifikationen unter Einfluss von KSHV in HDF-Zellen für H3K4me3 keine signifikanten, über die Zeit konsistenten Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen. Für H3K27me3 konnten fünf genassoziierte Bereiche mit konsistenter Erhöhung der H3K27me3-Level identifiziert werden. Von diesen ist für das Gen TSHZ2 ein möglicher Zusammenhang mit Mamma- und Prostatakarzinom beschrieben. Jedoch zeigte keines dieser Gene eine konsistente, signifikant differentielle Transkription. Für die Promotorregionen der differentiell exprimierten Gene konnten kaum signifikante Unterschiede in der Besetzung mit Histonmodifikationen identifiziert werden. Vereinzelt signifikante Differenzen waren stets nur an einem von drei Zeitpunkten vorhanden und somit nicht über die Zeit konsistent. Jedoch zeigten die Promotorregionen in infizierten Zellen in fast allen Vergleichen mit den zugehörigen nicht-infizierten Proben geringfügig höhere Level an H3K4me3.

Da für die Gene mit konsistenter differentieller Transkription keine Korrelationen der Ergebnisse der Transkriptom- und Histonmodifikationsanalyse festgestellt werden konnte, soll im folgenden Abschnitt die Korrelation differentieller Gene bzw. Bereiche innerhalb der einzelnen Zeitpunkte sowie die generelle Korrelation der Daten der beiden Analysen untersucht werden.

5.1.4 Korrelation der RNA-seq und ChIP-seq Daten der HDF-Zellen

Die H3K4me3-Modifikation ist mit den Promotorregionen aktiv transkribierter Gene assoziiert, die H3K27me3-Modifikation hingegen mit transkriptionell reprimierten Genen. Entsprechend wäre zu erwarten, dass eine erhöhte Transkription von höheren H3K4me3- bzw. geringeren H3K27me3-Leveln begleitet wird. In den zuvor beschriebenen Versuchen ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen den Änderungen der Transkription und der Level an Histonmodifikationen feststellen. Jedoch zeigte die H3K4me3-Modifikation in infizierten Zellen tendenziell höhere Level in den Promotorregionen von Genen mit erhöhter Transkription. Auf Grund der großen Varianz der Proben zwischen den Zeitpunkten konnten keine konsistenten Änderungen für die H3K4me3-Modifikation detektiert werden. Daher soll nun überprüft werden, ob zu den einzelnen Zeitpunkten eine Korrelation von Transkription und Histonmodifikationsleveln vorhanden ist. Des Weiteren soll unabhängig von differentiellen Genen die generelle Korrelation von Transkription und Histonmodifikationen untersucht werden. Zum einen dient dies der Kontrolle, ob die Verteilung der Modifikationen der oben formulierten Erwartung entspricht. Zum anderen soll untersucht werden, in wie weit die Stärke der Transkription und die Level der Histonmodifikationen korrelieren, also ob beispielsweise die am stärksten transkribierten Gene auch die höchsten H3K4me3-Level in ihren Promotorregionen zeigen.

Für die Analyse der Korrelation differentiell regulierter Gene aus ChIP-seq und RNA-seq zu den einzelnen Zeitpunkten wurden die Schnittmengen von Genen mit erhöhter Transkription und erhöhten Besetzungen von H3K4me3 bzw. verringerten Besetzungen von H3K27me3 und umgekehrt überprüft. Hierzu wurden die Daten der DESeq- und der diffReps-Analyse verwendet.

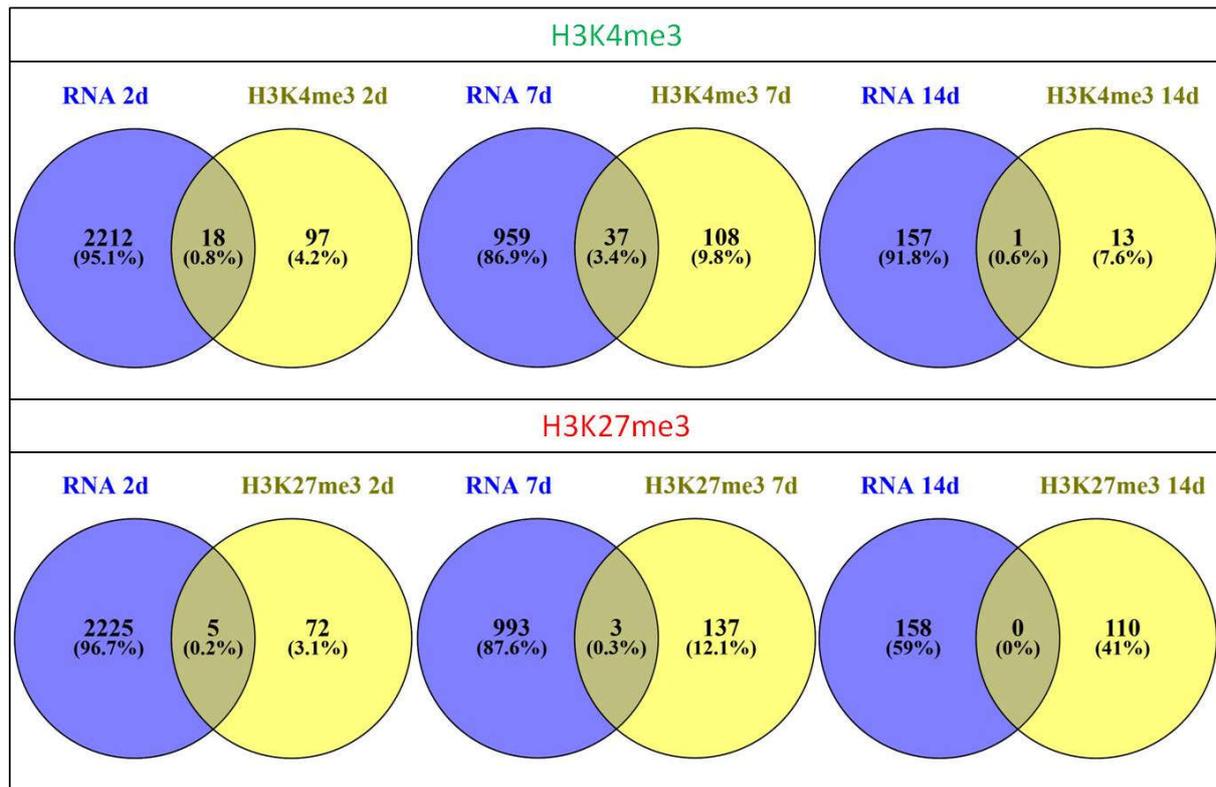


Abbildung 5-10: Venn-Diagramme zur Überprüfung der Korrelation von differentiell regulierten Genen in RNA-seq und ChIP-seq.

Die RNA-seq-Daten wurden mit DESeq, die ChIP-seq-Daten mit diffReps ermittelt. Die oberen Venn-Diagramme zeigen die Vergleiche der H3K4me3-Modifikation mit den RNA-seq-Daten zu den drei Zeitpunkten 2, 7 und 14 d.p.i. (von links nach rechts). Die unteren Diagramme zeigen den Vergleich der H3K27me3-Modifikation mit den RNA-seq-Daten. Ein Gen wurde als korrelierend verändert angesehen, wenn es bei gesteigerter Transkription höhere H3K4me3-Besetzungen bzw. geringere H3K27me3-Besetzungen aufwies und umgekehrt.

Auch für die einzelnen Zeitpunkte ließ sich nur eine sehr geringe Korrelation bei den Änderungen der Transkription und den Leveln der Histonmodifikationen nachweisen. Für die H3K4me3-Modifikation zeigten sich noch einige Schnittmengen zwischen RNA-seq und ChIP-seq Daten, vor allem 7 d.p.i. wo immerhin 34% der in diffReps identifizierten Gene auch eine entsprechend veränderte Transkription aufweisen. Die H3K27me3-Modifikation hingegen zeigte kaum Schnittmengen und somit keine Korrelation differentieller Bereiche.

Nachdem schon in 5.1.3 kaum signifikante Änderungen der Histonmodifikationen für die über alle Zeitpunkte differentiell transkribierten Gene nachgewiesen werden konnten, ergab auch der Vergleich zu den einzelnen Zeitpunkten nur für wenige Gene eine Korrelation. Im Folgenden soll überprüft werden in wie weit Transkription und die untersuchten Histonmodifikationen generell korrelieren, d.h. unabhängig von differentiellen Bereichen bzw. Genen (siehe Abbildung 5-11). Hierzu wurden alle Gene nach der Höhe ihrer Transkription sortiert, beginnend mit dem Gen mit der

höchsten Transkription. Anschließend wurde jedem Gen die Besetzung mit den Histonmodifikationen im Promotorbereich zugeordnet (1kb strangauf- und strangabwärts vom Transskriptionsstart, normalisierter Mittelwert aus drei Replikaten). Da die H3K4me3-Modifikation vor allem in Promotorbereichen aktiver Gene auftritt sollte bei entsprechender Korrelation eine verstärkte Anreicherung im linken Bereich mit hoher Transkription vorliegen. Hingegen sollte es sich für die reprimierende H3K27me3-Modifikation genau umgekehrt verhalten. Zusätzlich wurden die differentiell exprimierten Gene markiert. Dadurch sollte überprüft werden, ob Gene mit differentieller Transkription in bestimmten Bereichen bezüglich absoluter Transkription bzw. Besetzung mit Histonmodifikationen akkumulieren.

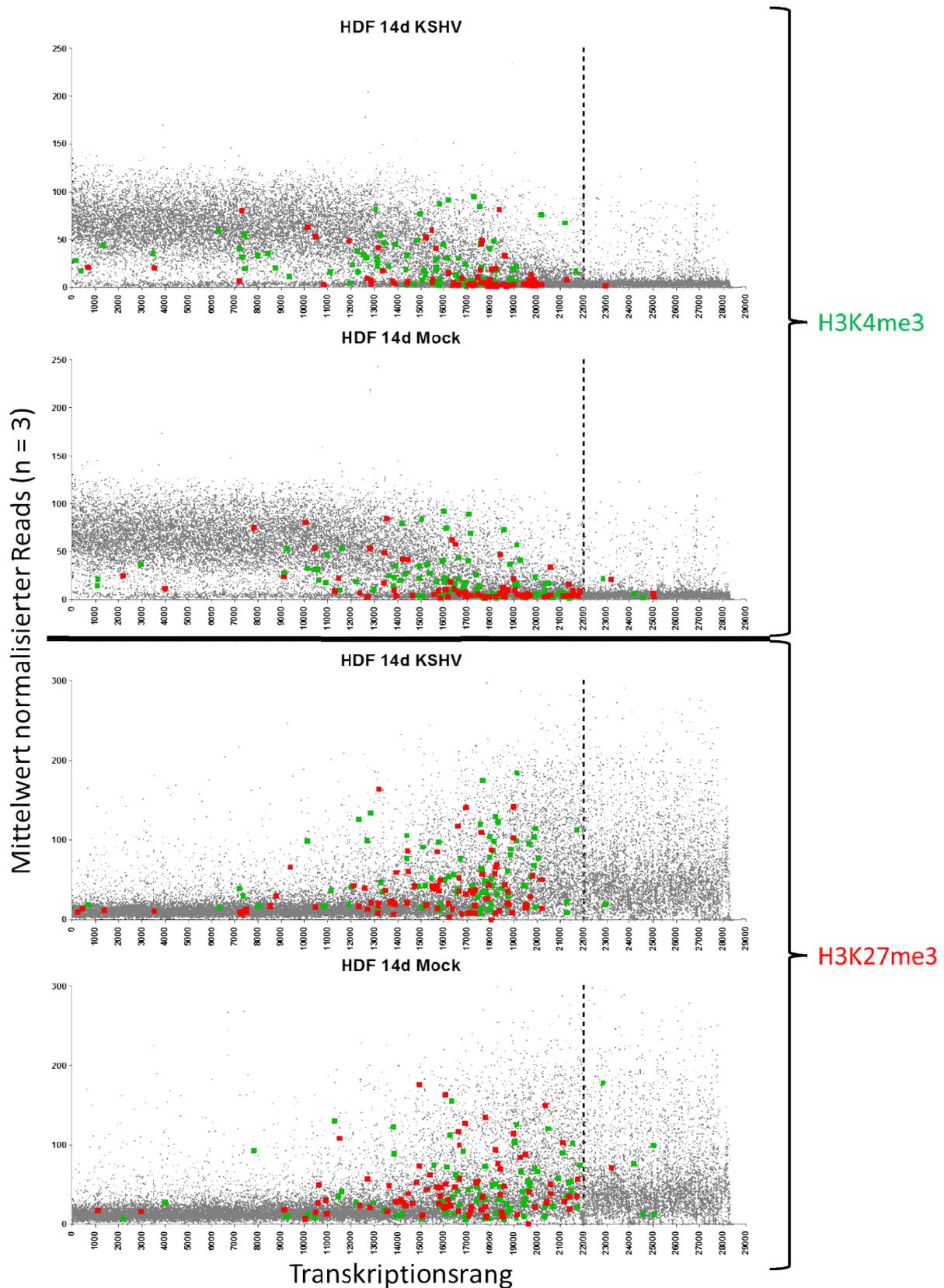


Abbildung 5-11: Korrelation von Histonmodifikationen und Transkription aller Gene.

Es werden exemplarisch die Daten für die HDF-Zellen 14 d.p.i gezeigt. Auf der X-Achse sind die Gene von höchster (links) zu niedrigster (rechts) Transkription sortiert, die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zu nicht-transkribierten Genen an. Auf der Y-Achse ist die mittlere Besetzung mit der entsprechenden Histonmodifikation über drei Replikate aufgetragen. Differenziell transkribierte Gene sind gesondert markiert, in grün Gene mit in KSHV-infizierten Proben gesteigerten Histonmodifikations-Leveln, in rot mit gesenkten. Die oberen beiden Diagramme zeigen die H3K4me3-Level in den KSHV- und Mock-Proben, die unteren beiden die H3K27me3-Level.

Wie erwartet zeigen Gene mit hoher Transkription häufig auch hohe H3K4me3-Level, sodass es im Diagramm zu einer Akkumulation von Punkten mit hohen Y-Werten im linken Diagrammbereich kommt. Hierbei fällt auf, dass die H3K4me3-Modifikation relativ schnell ein Plateau erreicht und trotz steigender Transkription keine weitere Steigerung der H3K4me3-Besetzung zu beobachten ist. Gene die nicht transkribiert werden oder eine nur sehr geringe Transkription aufweisen (rechter Diagrammbereich) zeigen zumeist auch eine sehr geringe Besetzung mit H3K4me3. Dies wird deutlich durch die Akkumulation der Punkte nahe der X-Achse. Auffällig ist jedoch, dass es in beiden Fällen zahlreiche Gene gibt, die sich konträr verhalten. So finden sich im linken Diagrammbereich auch Punkte mit geringer H3K4me3-Besetzung, also nahe der X-Achse, und im rechten Diagrammbereich Punkte mit hoher H3K4me3-Besetzung, die in ihrer Höhe den aktiven Genen im linken Diagrammbereich entsprechen. In der Mitte des Diagramms, also bei Genen mit moderater Transkription, zeigt sich ein dynamischer Bereich der Histonmodifikationen. Interessanterweise befindet sich ein Großteil der differentiell transkribierten Gene in diesem dynamischen Bereich.

Die H3K27me3-Modifikation verhält sich wie erwartet genau gegenteilig zur H3K4me3-Modifikation. Für Gene mit hoher Transkription im linken Diagrammbereich sind hauptsächlich geringe H3K27me3-Level vorhanden, während bei geringer Transkription der Anteil an Genen mit hoher H3K27me3-Besetzung steigt. Auch hier gibt es im Bereich der moderat transkribierten Gene einen dynamischen Bereich bezüglich der H3K27me3-Level. Wie schon bei der aktivierenden Modifikation akkumulieren die differentiell transkribierten Gene in diesem Bereich. Im Gegensatz zur H3K4me3 ist die Verteilung der Punkte jedoch weniger eindeutig. So ist das Plateau bei hohen Y-Werten schwächer ausgeprägt. Zwar ist auch hier keine weitere Zunahme der H3K27me3 Besetzung zwischen Genen mit in diesem Fall geringer Transkription und ohne Transkription zu sehen, die Streuung der Punkte ist jedoch deutlich größer. Des Weiteren ist die Annäherung an die X-Achse bei hoher Transkription weniger ausgeprägt als für H3K4me3 bei niedriger Transkription, was auf einen höheren Hintergrundwert hindeutet. Auch für die H3K27me3-Modifikation weisen zahlreiche Gene eine Besetzung konträr zum Transkriptionsverhalten auf, d.h. hohe H3K27me3-Level bei hoher Transkription und umgekehrt.

Der Vergleich der RNA-seq- und ChIP-seq-Daten zeigte kaum Korrelation bezüglich der Gene, die in den beiden Analysen getrennt voneinander als differentiell identifiziert wurden. Die generelle Verteilung der Histonmodifikationen entsprach jedoch den Erwartungen. So zeigten sich hohe H3K4me3-Besetzungen vor allem in Genen mit hoher Transkription und hohe H3K27me3-Besetzungen vor allem in nicht- oder nur gering transkribierten Genen. Es wurde jedoch deutlich, dass eine hohe Besetzung der jeweiligen Histonmodifikationen nicht zwangsweise eine Auswirkung auf die Transkription hat. So konnten sowohl für die H3K4me3- als auch die H3K27me3-Modifikation Promotorbereiche mit zur Transkription antikorrelierenden Besetzungen detektiert werden. Des Weiteren ist es schwierig ausgehend von der Stärke der Besetzung, also der Anzahl an modifizierten Histonen im Promotorbereich, Rückschlüsse auf die Stärke der Transkription zu ziehen. Da sich für beide Modifikationen ein Plateau einstellt wird für Gene die sich in diesen Bereichen befinden eine stärkere bzw. schwächere Transkription nicht durch die Histonmodifikationen angezeigt. Außerdem weist die Stärke der Besetzung innerhalb des Plateaus teils starke Schwankungen auf, sodass auch hier nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die Transkription gezogen werden können. In den Plateau-Bereichen genügt es scheinbar einen bestimmten Grenzwert zu erreichen, um den Effekt auf die Transkription zu erzielen. In den dynamischen Bereichen jedoch scheint eine Korrelation zwischen der Stärke der Besetzung mit Histonmodifikationen und der Intensität der Transkription zu bestehen. Jedoch ist auch hier die Schwankung groß, sodass Rückschlüsse für einzelne Gene schwierig sind.

5.1.5 Zusammenfassung

Der Vergleich KSHV-infizierter und nicht-infizierter HDF-Zellen auf Ebene der Transkription und der Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 ergab nur wenige Differenzen. So konnten zwar für die einzelnen Zeitpunkte Gene mit differentieller Transkription ermittelt werden, diese erwiesen sich jedoch zumeist als nicht konsistent über den Verlauf der Infektion. Innerhalb der wenigen, über die Zeit konsistenten Gene konnte ein Cluster von Genen identifiziert werden, die mit der viralen Immunantwort assoziiert sind. Auf Ebene der Histonmodifikationen konnten schon für die einzelnen Zeitpunkte nur wenige Differenzen festgestellt werden. Über die drei Zeitpunkte konsistent erwiesen sich lediglich fünf Anreicherungen der

H3K27me3-Modifikation. Des Weiteren zeigten sich nur vereinzelt Schnittmengen differentieller Gene beim Vergleich der Ergebnisse beider Analysen. Hingegen konnte die generelle Korrelation der beiden Histonmodifikationen mit der Transkription bestätigt werden, wenngleich einige Gene antikorrelierende Besetzungen aufwiesen. Die Stärke der Besetzung erlaubt keine Rückschlüsse auf die Stärke der Transkription, vielmehr scheint das Erreichen bzw. überschreiten eines Grenzwertes der ausschlaggebende Faktor zu sein.

5.2 Analyse der B-Zelllinie MC116

Im ersten Teil der Arbeit wurden humane dermale Fibroblasten untersucht. Diese primären Hautzellen sind vor allem im Zusammenhang mit dem KS als Modell relevant. Jedoch verursacht KSHV noch weitere Tumorekrankungen, die aus entarteten B-Zellen hervorgehen. Schon länger wird vermutet, dass es sich bei den B-Zellen um das natürliche Reservoir des KSHV im menschlichen Wirt handelt. Paradoxe Weise erwiesen sich gerade B-Zelllinien in der Zellkultur als nicht oder nur äußerst schlecht infizierbar. Dollery et al. gelang es jedoch die humane B-Zelllinie MC116 zu identifizieren, mit der Infektionsraten von bis zu 20% erzielt werden konnten (Dollery et al. 2014). Bei dieser handelt es sich um eine humane Zelllinie aus einem B-Zell-Lymphom. In diesem Kapitel sollen die Differenzen der Transkription und der Histonmodifikationen in Folge einer KSHV-Infektion in *de novo* infizierten MC116 untersucht werden. Auch hier liegt erneut der Fokus auf der Identifikation von Differenzen in Genen die für die Tumorentstehung relevant sein könnten.

Wie schon unter 5.1 erläutert ist eine hohe Infektionsrate von entscheidender Bedeutung für das Experiment, weswegen bei der Infektion der HDFs nur Proben mit einer Infektionsrate >50% verwendet wurden. Obwohl sich die MC116 für eine B-Zelllinie relativ effizient infizieren lassen, ist die Infektionsrate mit maximal 20% im Kontext dieser Untersuchung sehr gering. Aus diesem Grund wurde für die Arbeiten mit den MC116-Zellen nicht das wildtyp-KSHV verwendet, sondern ein rekombinantes KSHV (rKSHV), welches eine Gen-Kassette mit einem konstitutiv exprimierten GFP-Gen sowie einem RFP-Gen unter Kontrolle des lytischen PAN-Promotors besitzt. Letzteres wird somit nur bei lytischer Reaktivierung exprimiert. Des Weiteren enthält die Kassette eine Puromycin-Resistenz, welche die Selektion infizierter Zellen mittels Puromycin ermöglicht. Auf diesem Weg wurden die infizierten Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen bis zu einer Infektionsrate von 100% angereichert. Gleichzeitig wurde auf diesem Weg der Verlust der Episome durch Ausdünnung während der Zellteilung verhindert, sodass trotz der relativ späten Analyse nach Infektion und stetiger Proliferation keine Abnahme der Infektionsrate vorhanden war. Jedoch machte dies die Analyse früher Zeitpunkte nach Infektion unmöglich. Zum einen bestand das Problem der zu geringen Infektionsrate, da die Anreicherung infizierter Zellen vor allem zwei Tage nach Infektion nicht ausreichend war. Zum anderen erzeugt der hohe Anteil an Zellen, welche durch das Antibiotikum

abgetötet bzw. beeinflusst werden, einen nicht kalkulierbaren Effekt auf Ebene von Transkription und Epigenom. Durch permanentes Subkultivieren wurden die toten Zellen über die Zeit aus der Kultur entfernt, sodass 14 Tage nach Beginn der Selektion vergleichbare Anteile an toten Zellen in infizierten und nicht-infizierten Zellen vorhanden waren.

5.2.1 De novo Infektion der humanen B-Zelllinie MC116

Die Infektion der MC116-Zellen mit rKSHV sowie die anschließende Puromycin-Selektion wurde wie unter 4.3.4 und 4.3.5 beschrieben durchgeführt. Anschließend erfolgte die Isolation von RNA (siehe 4.1.2) und Chromatin (siehe 4.1.1). Zur Kontrolle der Infektion wurde die GFP-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Des Weiteren bot das RFP, da es unter der Kontrolle des lytischen PAN-Promotors steht, eine einfache Möglichkeit zu überprüfen wie effektiv die Etablierung der Latenz in diesen Zellen abläuft.

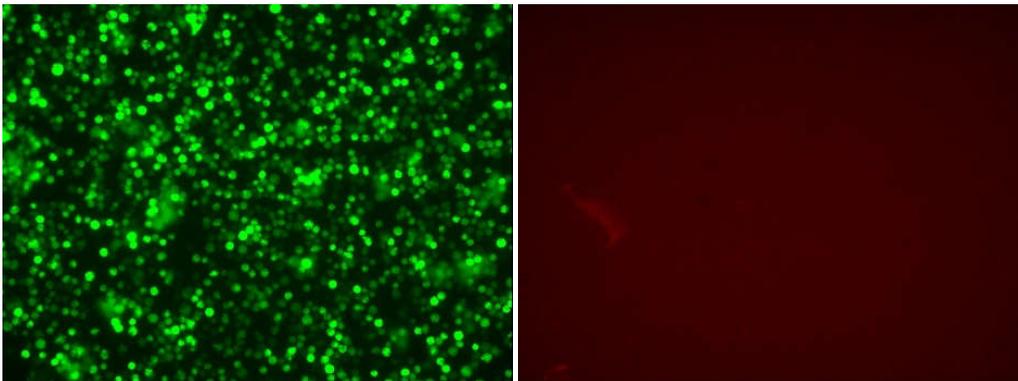


Abbildung 5-12: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen KSHV-infizierter MC116-Zellen.

Zur Kontrolle der Infektion und Puromycin-Selektion wurde die GFP-Expression überprüft. Die Auswertung ergab, dass 100% der Zellen GFP positiv sind. Zudem wurde über die Expression des RFP überprüft inwieweit die Zellen spontane lytische Reaktivierung zeigen. Da nahezu keine RFP-positiven Zellen detektiert werden konnten scheint KSHV in den MC116-Zellen streng latent vorzuliegen.

5.2.2 Kontrolle der Funktionalität des rKSHV in MC116-Zellen

Durch den Nachweis der GFP-Expression konnte die erfolgreiche Infektion nachgewiesen werden. Jedoch ist dies kein Nachweis dafür, dass das Virus auch funktional ist und virale Gene exprimiert werden. Um dies sicherzustellen, wurde die LANA-Expression per Immunfluoreszenz untersucht (siehe 4.2.5).

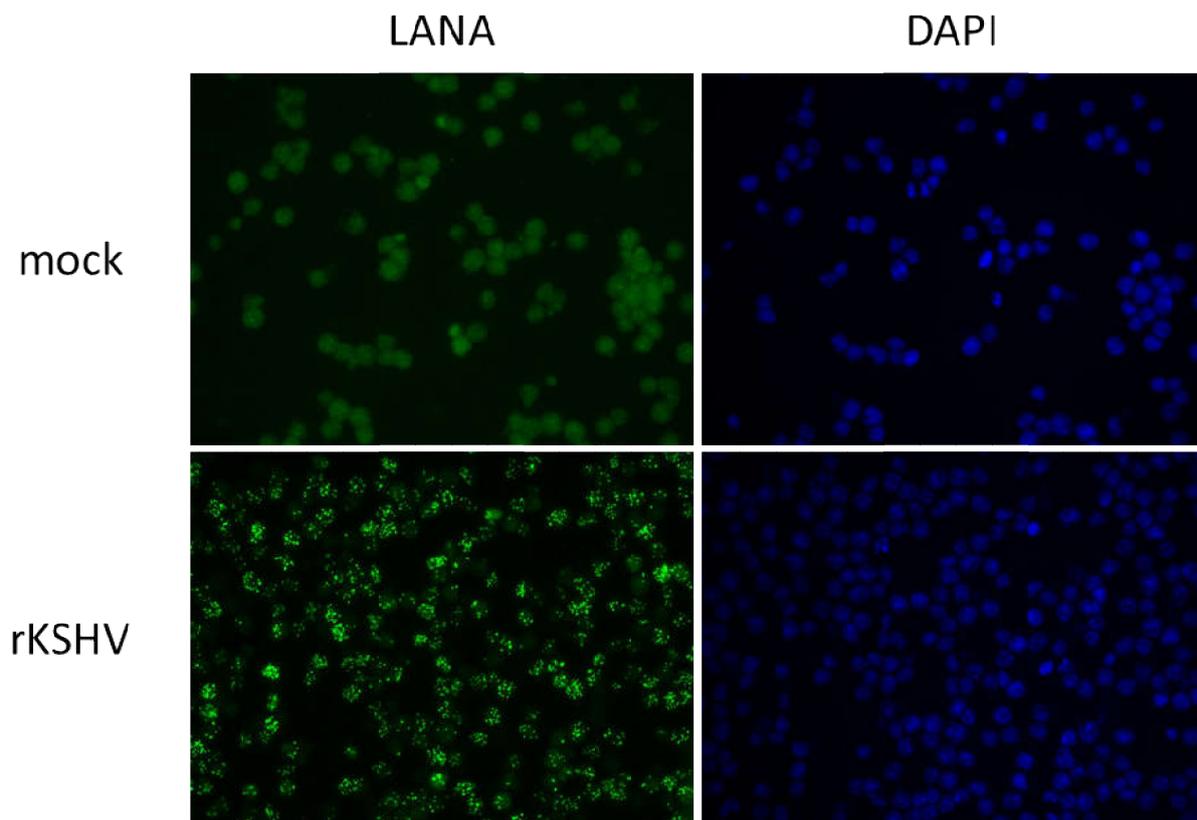


Abbildung 5-13: Immunfluoreszenzaufnahmen infizierter und nicht-infizierter MC116 zum Nachweis der LANA-Expression.

In der LANA-Färbung der rKSHV-infizierten Zellen sind die typischen punktförmigen Strukturen im Nucleus aller Zellen zu erkennen. Diese sind in den mock-infizierten Zellen nicht vorhanden.

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Analyse zeigte, dass LANA in allen Zellen der rKSHV-infizierten MC116 vorhanden war. Somit wurde das Ergebnis der Analyse der GFP-Expression zur Kontrolle von Infektion und Erfolg der Antibiotikaselektion bestätigt. Weiterhin sollte die Fähigkeit des KSHV zur Reaktivierung überprüft werden. Hierzu wurden infizierte MC116-Zellen wie bei der Produktion virushaltiger Überstände aus BCBL1 (siehe 4.3.3) mit Natriumbutyrat und PMA induziert und die Expression des RFP überprüft, welches die Aktivierung lytischer Promotoren anzeigt.

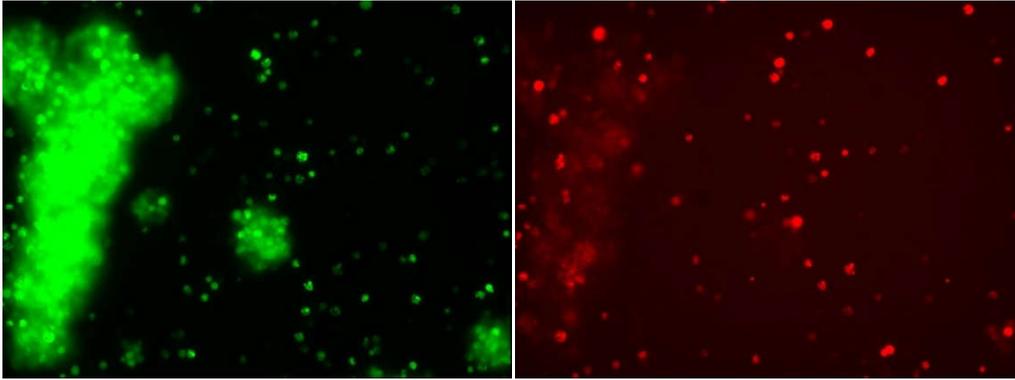


Abbildung 5-14: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen zur Kontrolle der RFP-Expression in induzierten MC116.

Die Abbildung zeigt KSHV-infizierte MC116-Zellen die mit Natriumbutyrat und PMA behandelt wurden. Im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen (siehe Abbildung 5-12) zeigt sich deutlich die erhöhte Anzahl an RFP-positiven Zellen.

Ähnlich wie bei der GFP-Expression gibt die RFP-Expression zwar einen starken Hinweis auf die Funktionalität des Virus, ist jedoch kein Beweis für die Expression von, in diesem Fall lytischen, viralen Genen. Daher wurden KSHV-infizierte und nicht-infizierte MC116 zwei Tage nach Induktion geerntet und Proteinlysate entsprechend 4.2.1 hergestellt. Mittels Western-Blot sollte die Expression viraler Proteine nach Induktion überprüft werden, in diesem Fall die Expression des Latenzproteins LANA und des lytischen Schalterproteins RTA.

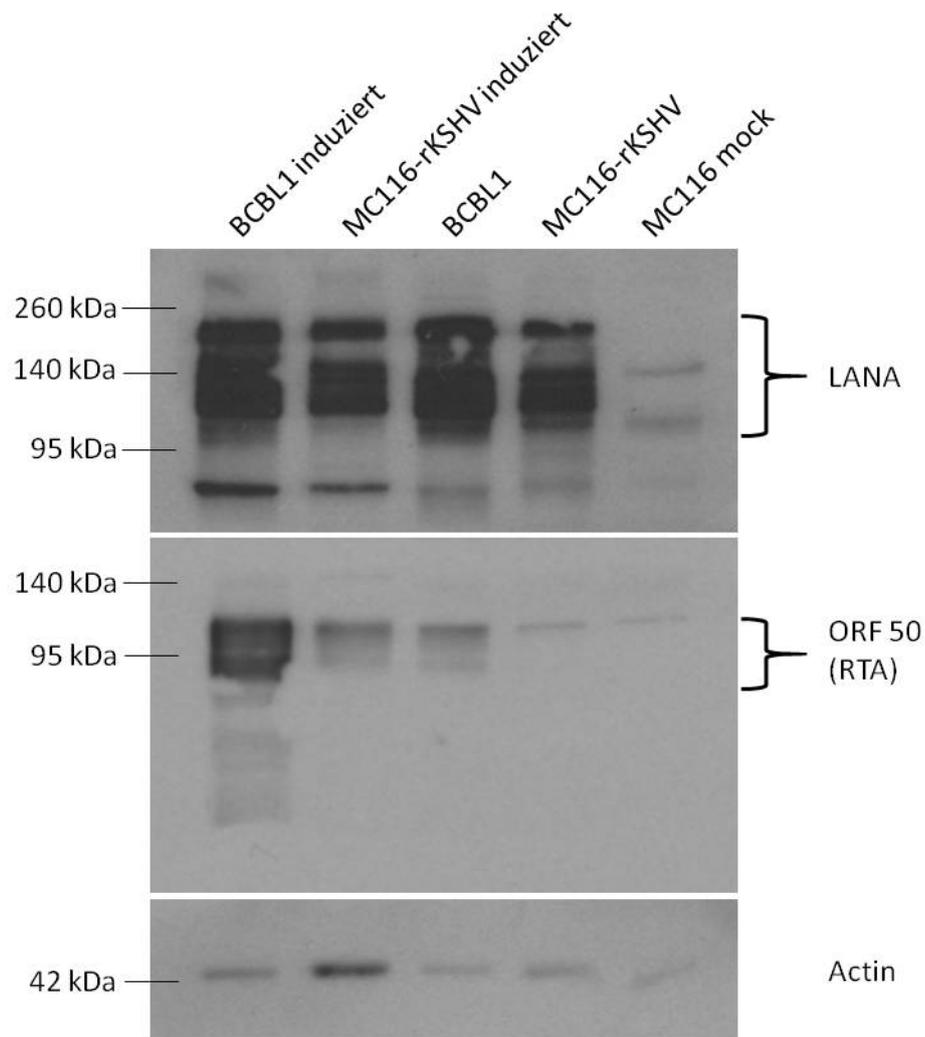


Abbildung 5-15: Western-Blot zum Nachweis der Expression von RTA in KSHV-infizierten MC116-Zellen nach Induktion. Neben RTA wurde die Expression von LANA überprüft, welches in allen KSHV-infizierten Zellen unabhängig von der Induktion vorhanden sein sollte. Als Positiv-Kontrollen wurden Lysate aus induzierten und nicht-induzierten BCBL1 verwendet. Der obere Abbildungsteil zeigt deutlich die LANA Expression sowohl in MC116 als auch in BCBL1 unabhängig von der Induktion, nicht-infizierte MC116 zeigen erwartungsgemäß keine LANA-Expression. Mittig ist die Expression von RTA zu sehen. Infizierte, nicht-induzierte MC116 weisen keine RTA Expression auf. BCBL1 zeigen auf Grund ihrer Neigung zur spontanen Reaktivierung eine moderate RTA-Expression, welche unter Induktion deutlich gesteigert wird. Induzierte MC116 zeigen ebenfalls eine moderate RTA-Expression, welche in etwa dem Niveau nicht-induzierter BCBL1 entspricht.

Im Western-Blot ließ sich erkennen, dass KSHV-infizierte MC116 zum einen streng latent vorliegen, was die Ergebnisse der Analyse der RFP-Expression nicht-induzierter Zellen bestätigt (Abbildung 5-12). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass mittels Natriumbutyrat und PMA die lytische Phase induziert werden kann. Ob diese auch vollständig durchlaufen wird und zur Produktion infektiöser viraler Partikel führt wurde überprüft, indem der Überstand induzierter MC116-Zellen, nach der Konzentration der potentiell vorhandenen viralen Partikel, zur Infektion von SLK-Zellen verwendet wurde. Dabei wurde analog zur Infektion von HDF-Zellen verfahren und im Anschluss die LANA-Expression via Immunfluoreszenz überprüft.

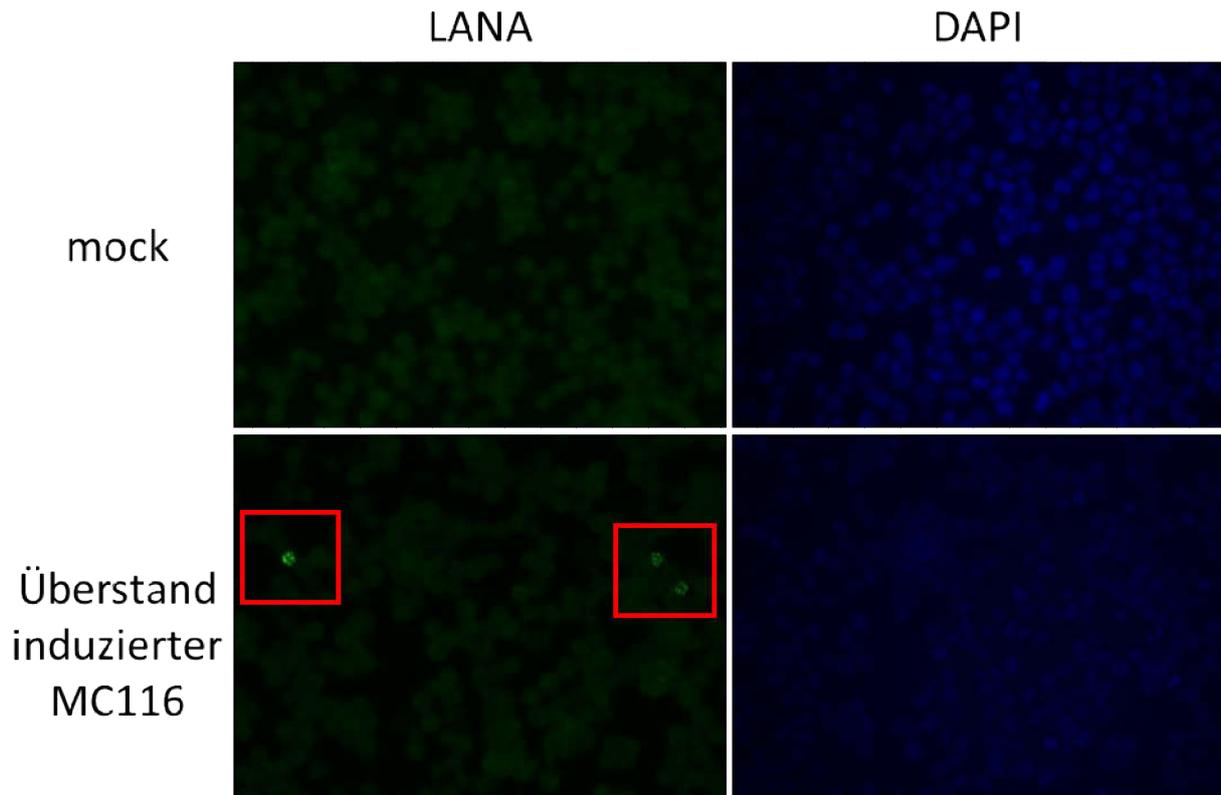


Abbildung 5-16: Kontrolle der Produktion infektiöser viraler Partikel durch Infektion von SLK-Zellen mit Überständen induzierter KSHV-infizierter MC116-Zellen.

Die Abbildung zeigt die LANA-Färbung (grün) mock-infizierter sowie mit Überständen induzierter MC116 inkubierter SLK-Zellen. Erfolgreich infizierte Zellen weisen die typischen punktförmigen Strukturen im Nukleus auf und sind mit roten Kästchen hervorgehoben.

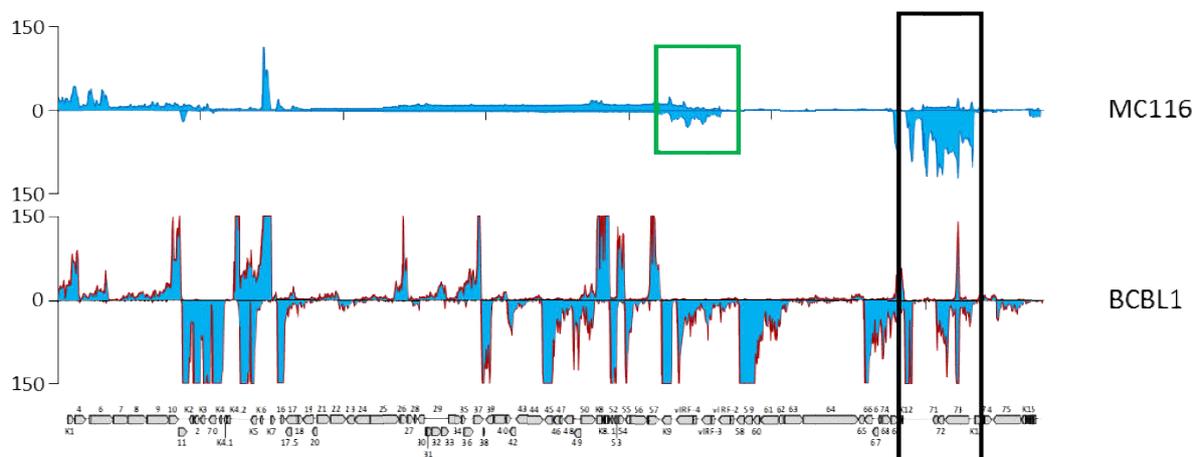
Das Ergebnis der Immunfluoreszenz zeigt die erfolgreiche Infektion von SLK-Zellen mit Überständen induzierter MC116-Zellen. Da ein deutlich geringeres Volumen an MC116-Überstand für die Konzentration viraler Partikel eingesetzt wurde im Vergleich zur Produktion virushaltiger Überstände aus BCBL1, lässt sich keine Aussage über die Effizienz der Virusproduktion in MC116 im Vergleich zu BCBL1 treffen.

Die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse weisen nach, dass das rKSHV in MC116-Zellen vollständig funktional vorliegt. In den weiteren Schritten erfolgte die Analyse der Transkription via RNA-seq und der Histonmodifikationen via CHIP-seq zur Detektion von Unterschieden in rKSHV-infizierten versus nicht-infizierten Zellen.

5.2.3 Transkriptomanalyse infizierter MC116-Zellen

Die RNA rKSHV-infizierter und nicht-infizierter MC116-Zellen wurde entsprechend 4.1.2 isoliert. Anschließend erfolgte die Library-Präparation und die Sequenzierung via Illumina HiSeq 2500 (siehe 4.4.2).

Zunächst wurde das Expressionsprofil des KSHV überprüft um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um eine latente Infektion der Zellen handelt. Mit Hilfe des Programms STAR (Dobin et al. 2013) wurden die Reads mit dem viralen Referenzgenom aligniert.



Der Unterschied zur lytischen Transkription wird deutlich beim Vergleich mit dem Profil des KSHV in BCBL1-Zellen (unteres Paneel). Auf Grund von spontaner Reaktivierung befindet sich das Virus in 1-2% der Zellen in der lytischen Phase. Bereits dieser geringe Anteil sorgt auf Grund der äußerst starken Expression lytischer viraler Gene im Zuge der viralen Proliferation für die hohen Transkriptionswerte. Diese gehen zumeist deutlich über die aus Gründen der Vergleichbarkeit gewählte Skala hinaus. Um die Profile der BCBL1- und der MC116-Zellen vergleichen zu können wurden die BCBL1-Werte so normalisiert, dass die Summe der Reads in der Latenzkassette der BCBL1 der Summe der Reads in der Latenzkassette der MC116 entspricht. Entsprechend zeigt die Abbildung, dass relativ zur Transkription der Latenzproteine eine starke Transkription lytischer Gene stattfindet.

Für die Analyse der zellulären Transkription wurden die Reads mit dem Referenzgenom hg19 aligniert. Auch für die MC116-Zellen erfolgte die Detektion der differentieller Transkription mit dem Programm DESeq (Anders & Huber 2010). Abbildung 5-18 gibt einen Überblick über die Ergebnisse dieser Analyse.

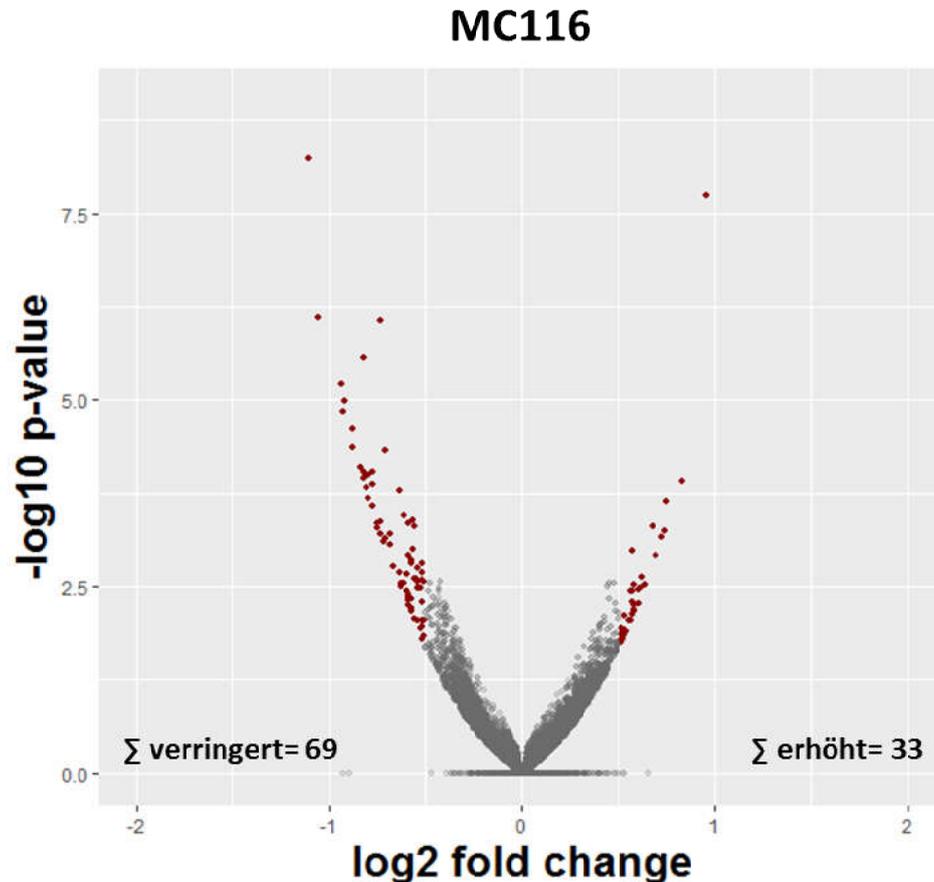


Abbildung 5-18: Volcano-Diagramm der Transkriptionsanalyse infizierter versus nicht-infizierter MC116-Zellen.

Jeder Punkt im Diagramm repräsentiert ein Gen; die Position des Punktes repräsentiert dessen veränderte Expression in rKSHV-infizierten Zellen sowie den Signifikanzwert. Es handelt sich jeweils um den Mittelwert aus $n = 3$ Messungen. Auf der X-Achse ist der $\log_2\text{FC}$ dargestellt, wobei der Wert 0 Zentral auf der Achse liegt. Von dort ausgehend sind die in den infizierten Zellen geringer transkribierten Gene nach links (negative Werte) und die höher transkribierten Gene nach rechts (positive Werte) aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der negative dekadische Logarithmus des p-value ($-\log_{10}$ p-value) aufgetragen. Je höher die Veränderung und die Signifikanz, desto stärker streben die Punkte den oberen beiden Ecken des Diagramms entgegen, je nach Art der Veränderung. In dieser Arbeit wurden Grenzwerte von $\log_2\text{FC} = 0,5/-0,5$ und $-\log_{10}$ p-value = 1,3 verwendet (entspricht einem p-value von 0,05). Alle Gene die diese Kriterien erfüllten sind in der Abbildung rot, die übrigen Gene grau eingefärbt.

Insgesamt wurden 102 Gene mit einer signifikant veränderten Transkription identifiziert. Diese wurden mit dem Programm WebGestalt 2017 auf funktionelle Cluster untersucht.

Tabelle 5-4: Ergebnisse der Gen-Ontologie-Analyse der Gene, die zu allen Zeitpunkten in den rKSHV-infizierten MC116-Zellen eine erhöhte Expression aufwiesen.

Für die Analyse wurde das Programm WebGestalt verwendet. In der Tabelle sind die Top 10 Cluster der Analyse angegeben. AW = Anreicherungswert.

Name	Anzahl Gene	AW	Pval
Immunantwort	19	2,63	7,10e-5
Positive Regulation der Zell-Adhäsion	9	4,87	9,34e-5
Negative Regulation der Vesikelfusion	2	80,29	2,43e-4
Leukozyten-Differenzierung	9	3,97	4,26e-4
Zell-Adhäsion	19	2,29	4,37e-4
Biologische Adhäsion	19	2,28	4,57e-4
Positive Regulation d. T-Zell-Aktivierung	6	6,02	4,85e-4
Positive Regulation der Leukozyten Zell-Zell Adhäsion	6	5,76	6,12e-4
Reaktion auf Peptidoglycan	2	50,18	6,73e-4
B-Zell Aktivierung	6	5,50	7,81e-4

Im Zuge der Gen-Ontologie-Analyse wurden Cluster identifiziert, die im Zusammenhang mit der Zell-Adhäsion sowie der Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen stehen (Positive Regulation der T-Zell-Aktivierung, AW = 6,02; B-Zell-Aktivierung, AW = 5,5; Differenzierung von Leukozyten, AW = 3,97). Dabei fanden sich auch in den Adhäsions-Clustern zahlreiche Gene mit immunrelevanten Funktionen bzw. Gene, die auch in den Differenzierungs- und Aktivierungs-Clustern auftauchten.

Vor dem Hintergrund der Fragestellung dieser Arbeit wurde ein Fokus auf die Cluster der Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen gelegt. Diese weisen einige Überschneidungen auf und umfassen insgesamt 12 Gene (siehe Tabelle 5-5). Viele dieser Gene haben tumorrelevante Funktionen, wie z.B. Regulation der Differenzierung oder Inhibition der Apoptose (IL7R). Daher ist es nicht verwunderlich, dass Defekte oder eine aberrante Expression einiger dieser Gene mit bestimmten Tumoren assoziiert sind. Hervorzuheben ist das Gen NME1, welches vermutlich als Tumorsuppressor fungiert (Hartsough & Steeg 2000). Da NME1 eine reduzierte Transkription aufweist, stellt es einen interessanten Ansatzpunkt dar. Wie schon für die HDF-Zellen konnte des Weiteren ein Cluster mit Genen der Immunantwort detektiert werden (Immunantwort AW = 2,63). Abgesehen vom Chemokin CXCL10 befinden sich jedoch keine mit den HDF-Zellen gemeinsamen Gene in diesem

Cluster. Insgesamt sind die Anreicherungswerte deutlich geringer für die MC116-Zellen als für die HDF-Zellen.

Tabelle 5-5: Gene der Cluster der T- und B-Zell-Aktivierung sowie Differenzierung von Leukozyten.

Es sind die Gene der Cluster B- und T-Zellaktivierung sowie Differenzierung von Leukozyten aufgeführt. Diese zeigten in der funktionalen Analyse der differentiell exprimierten Gene mittels WebGestalt die höchsten Anreicherungswerte. Log₂FC und p-value der Transkriptionsänderung der Gene sind in den Tabellen im Anhang angegeben.

Symbol	Name	Symbol	Name
CORO1A	coronin 1A	LYL1	lymphoblastic Leukemia associated Hematopoiesis Regulator 1
IL7R	interleukin 7 receptor	TPD52	tumor protein D52
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	IL27RA	interleukin 27 receptor, alpha
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2	NME1	nucleoside diphosphate kinase A
ZAP70	zeta-chain-associated protein kinase 70	TRPM2	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2
CD3E	CD3e molecule	CBFA2T3	core-binding factor alpha subunit 2

5.2.4 Analyse der Histonmodifikationen infizierter MC116-Zellen

Die Isolation des Chromatins erfolgte nach Abschluss der Antibiotikaselektion 14 Tage nach Infektion mit rKSHV parallel zur Isolation der RNA. Die ChIP wurde wie für die HDF-Zellen mit Antikörpern gegen die H3K4me₃- und die H3K27me₃-Modifikation durchgeführt (siehe 4.1.1). Analog zum Vorgehen bei den HDF-Zellen wurden die Proben per qPCR überprüft und anschließend sequenziert.

Die Analyse der Profile der Histonmodifikationen erfolgte, wie auch für die HDF-Zellen, um eine zur Transkription passende, latente Besetzung zu überprüfen. Da es sich bei den MC116 Zellen ebenfalls um B-Zellen handelt, sollte deren Profil überwiegend dem der BCBL1-Zellen entsprechen. Jedoch wurde für die Versuche mit den MC116-Zellen rKSHV verwendet. Mit der Überprüfung der Profile sollte daher ebenfalls ausgeschlossen werden, dass das rKSHV bezüglich der Histonmodifikationen ein vom wildtyp-Virus abweichendes Verhalten aufweist.

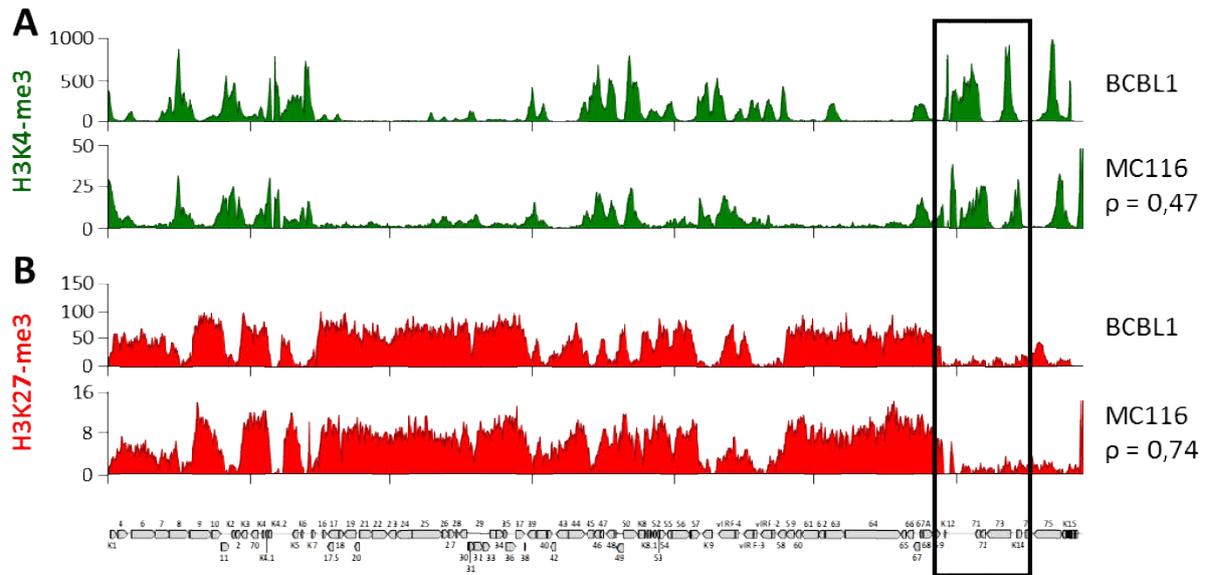


Abbildung 5-19: Profile der Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 auf dem rKSHV-Genom in MC116-Zellen.

MC116-Zellen wurden *de novo* mit rKSHV infiziert und 14 Tage mit Puromycin behandelt. Anschließend wurde das Chromatin isoliert und auf die Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 untersucht. Es sind jeweils die normalisierten Mittelwerte ($n = 3$) der Besetzung des rKSHV-Genoms mit den Histonmodifikationen in MC116-Zellen, sowie in BCBL1-Zellen zum Vergleich dargestellt. Für beide MC116-Profile ist der Pearson-Korrelationskoeffizient (ρ) relativ zum BCBL1-Profil angegeben. Die Karte unterhalb der Profile bezieht sich auf das wt-KSHV. **A:** Profile der H3K4me3-Modifikation. Das obere Diagramm zeigt BCBL1-Zellen als Referenz, das untere die MC116-Zellen. **B:** Profile der H3K27me3-Modifikation. Anordnung s.o. Im schwarzen Rechteck wird die Latenzkassette hervorgehoben.

Die Profile der Histonmodifikationen auf dem rKSHV-Genom entsprachen zu großen Teilen denen vom wildtyp-KSHV-Genom in BCBL1-Zellen. In der Hervorhebung ist deutlich zu erkennen, dass die Latenzkassette die typische Besetzung mit H4K4me3 aufweist und nur geringe Mengen H3K27me3. Ansonsten zeigt die H3K4me3-Modifikation Anreicherungen in einigen diskreten Bereichen, welche nahezu identisch mit denen der BCBL1 sind. Die repressive H3K27me3-Modifikation hingegen ist über weite Bereiche des Genoms verteilt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient liegt für die H3K4me3-Modifikation bei $\rho = 0,47$ und ist somit etwas geringer als bei den HDF-Zellen. Für die H3K27me3-Modifikation ist der Wert mit $\rho = 0,74$ geringfügig höher als in den HDF-Zellen ($\rho = 0,64 - 0,70$). Da es sich zum einen um unterschiedliche Zellen und zum anderen um einen Vergleich von rKSHV und wildtyp KSHV handelt ist mit einem gewissen Ausmaß an Abweichungen zu rechnen. Insgesamt bestätigt der Korrelationskoeffizient auch hier, dass die Profile der Histonmodifikationen von MC116 und BCBL1 Zellen korrelieren. Somit scheint sich das rKSHV auch bezüglich der Histonmodifikationen wie das wildtyp-Virus zu verhalten. Somit liegt hinsichtlich der Histonmodifikationen kein untypisches

Verhalten des rKSHV in MC116-Zellen vor, welches die folgende Analyse auf dem humanen Genom verfälschen könnte.

Im nächsten Schritt wurde die generelle Verteilung der Histonmodifikationen auf dem humanen Genom ermittelt. Wie schon bei den HDF-Zellen wurden zunächst mit Hilfe des Programmes diffReps die angereicherten Bereiche und anschließend die Verteilung mit dem Programm ChipSeeker ermittelt (siehe 5.1.3).

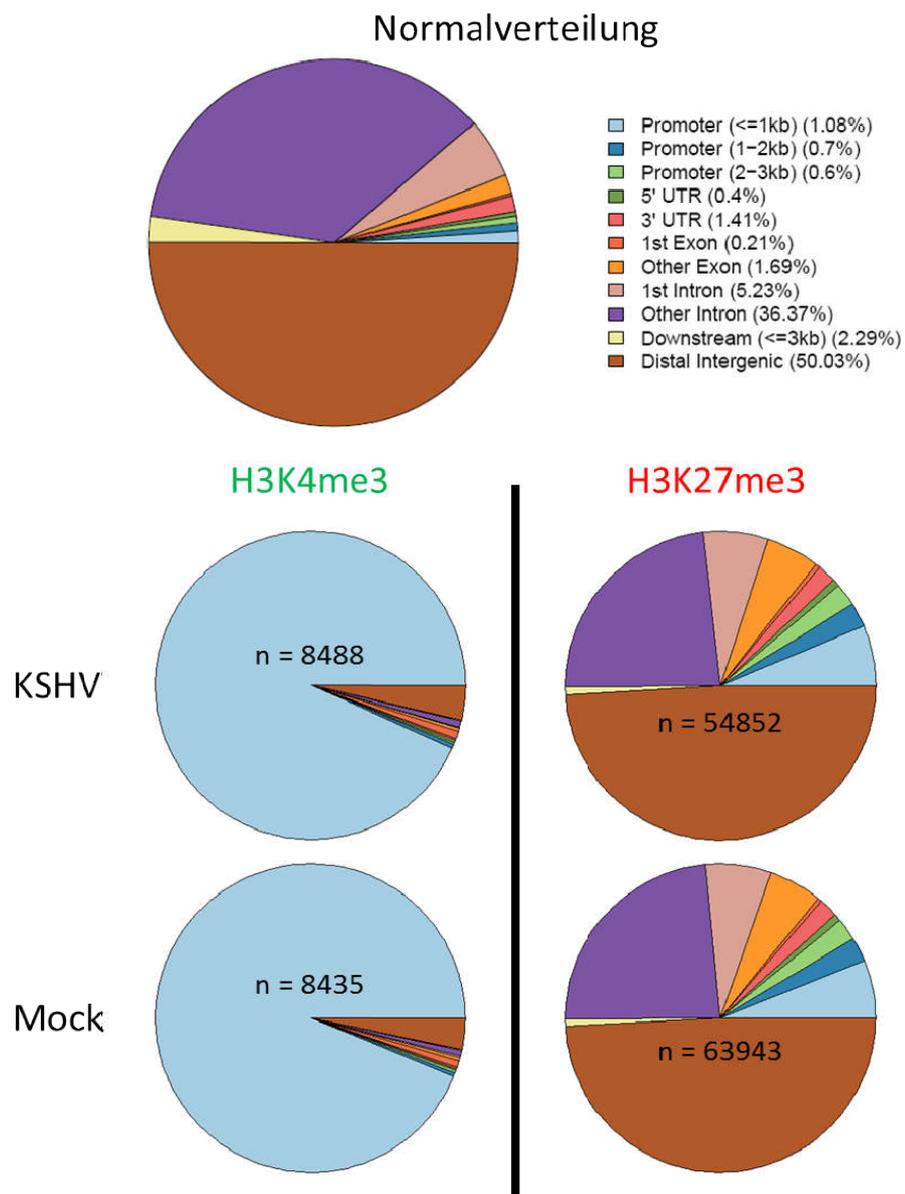


Abbildung 5-20: Distributionsanalyse angereicherter Bereiche der ChIP-Datensätze aus MC116-Zellen mittels ChipSeeker. Mit Hilfe des Programmes diffReps wurden gegenüber dem Input angereicherte Bereiche identifiziert und mit ChipSeeker hinsichtlich ihrer Verteilung analysiert. Das oberste Diagramm basiert auf der Verteilung der verschiedenen genomischen Bereiche und gibt somit die zu erwartende Distribution bei einer zufälligen Verteilung der Reads an. Links sind die Verteilungen der H3K4me3-Modifikation gezeigt, rechts die der H3K27me3-Modifikation. Für jedes Diagramm ist die Gesamtzahl der mittels diffReps detektierten angereicherten Bereiche angegeben.

Die Verteilung der Histonmodifikationen in den MC116-Zellen ist nahezu identisch zu der in den HDF-Zellen. Während die H3K4me3-Modifikation nahezu ausschließlich in Promotorbereichen angereichert ist, weist die H3K27me3-Modifikation eine deutlich gleichmäßigere Verteilung über das Genom auf, wobei auch hier die Promotorbereiche überrepräsentiert sind. Auch für die MC116-Zellen ist kein Unterschied für die generelle Verteilung der Modifikationen zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen feststellbar.

Für die Analyse von Differenzen der Histonmodifikationen zwischen infizierten und nicht-infizierten Proben wurde das Programm diffReps verwendet. Es wurden die gleichen Parameter und Grenzwerte wie für die Analyse der HDF-Zellen verwendet (siehe 5.1.3). Die vollständigen diffReps-Ergebnisse für genassoziierte Bereiche mit signifikanten Änderungen der H3K4me3- und H3K27me3-Modifikation befinden sich im Anhang in Tabelle 10-9 und Tabelle 10-10.

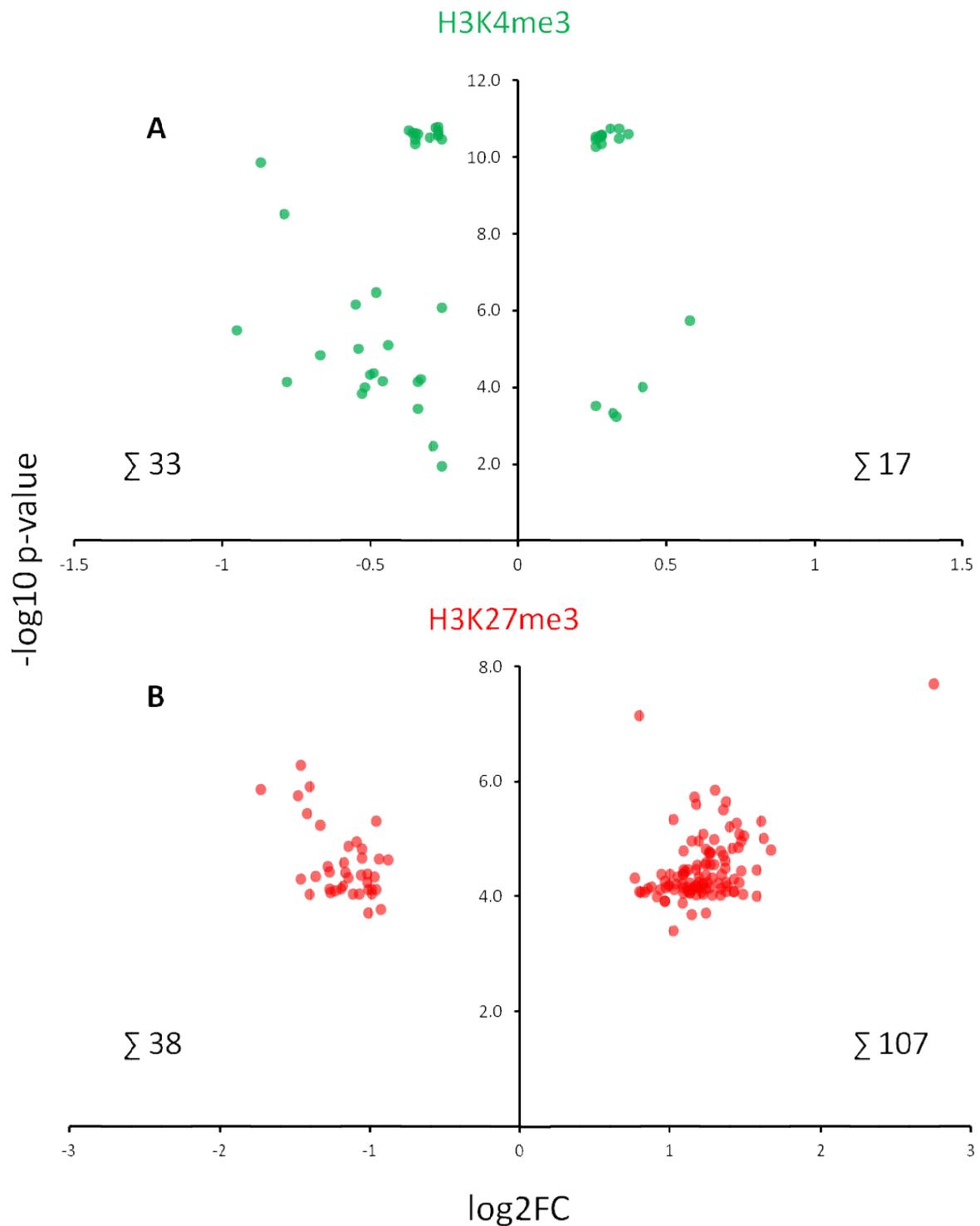


Abbildung 5-21: Ergebnisse der diffReps-Analyse der MC116-Zellen.

Für die Analyse mit diffReps wurden jeweils $n = 3$ Replikate rKSHV infizierter und nicht-infizierter MC116 verwendet. Jeder Punkt in den Diagrammen repräsentiert ein genassoziiertes Fenster mit einer signifikant veränderten Besetzung der jeweiligen Histonmodifikation. Auf der X-Achse ist der $\log_2 FC$ aufgetragen, auf der Y-Achse der $-\log_{10} p\text{-value}$. **A:** Analyse der H3K4me3-Modifikation. **B:** Analyse der H3K27me3-Modifikation. In jedem Quadranten ist die Summe der signifikant veränderten Fenster angegeben.

Für die H3K4me3-Modifikation ergaben sich nur wenige genassoziierte Bereiche die eine Veränderung aufwiesen. Insgesamt zeigten 17 genassoziierte Fenster eine

höhere und 33 eine niedrigere Besetzung. Die H3K27me3-Modifikation zeigte deutlich mehr differentielle Fenster. Von diesen wiesen 107 eine höhere und 38 eine geringere Besetzung auf. Die Anzahl differentieller genassoziierter Bereiche lag somit in einer ähnlichen Größenordnung wie für die HDF-Zellen. Die mit den Fenstern assoziierten Gene wurden mit Hilfe des Programms WebGestalt auf funktionale Zusammenhänge untersucht. Für die Gene mit differentiellen H3K4me3-Leveln enthielt nur ein Cluster (zelluläre Proteinlokalisierung, AW = 2,88) mehr als zwei Gene der Liste (Tabelle 10-9). Die Gen-Ontologie-Analyse der differentiellen H3K27me3-Bereiche ergab zwei Cluster: Ionen-Transmembran-Transport (AW = 2,96) und Signaltransmission der Synapsen (AW = 3,59). Keines dieser Cluster weist eine offensichtliche Verbindung zur Tumorgenese auf. Jedoch befinden sich unter den Genen mit differentiellen H3K27me3-Leveln einige wenige, die in tumorrelevante Signalwege involviert sind. Dabei handelt es sich um die zwei Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR und IGF1R sowie den Wachstumsfaktor FGF12. Untereinander weisen diese jedoch inkonsistente Änderungen auf: EGFR und IGF1R zeigen eine erhöhte, FGF12 jedoch eine verringerte Besetzung mit H3K27me3. Hinsichtlich der Transkription weisen die Gene nahezu keine Änderungen auf.

Tabelle 5-6: Tumorrelevante Gene mit differentiellen H3K27me3-Leveln in rKSHV-infizierten MC116-Zellen.

In Folge der Analyse mit diffReps wurden 145 Gene mit veränderten H3K27me3-Leveln detektiert. In der funktionalen Analyse mit Hilfe des Programms WebGestalt wurden unter diesen drei tumorrelevante Wachstumsfaktoren bzw. Wachstumsfaktorrezeptoren ermittelt.

Symbol	Name	Log2FC H3K27me3	Log2FC RNA
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	1,63	0,00
FGF12	Fibroblast Growth Factor 12	- 1,14	- 0,05
IGF1R	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor	1,41	- 0,17

Des Weiteren wurden die H3K4me3- und H3K27me3-Level der Promotorbereiche 1000 bp strangauf- und strangabwärts des TSS der differentiell transkribierten Gene ausgewertet und KSHV-infizierte mit nicht-infizierten Proben verglichen. Die Anzahl der Reads in den definierten Bereichen wurde auf die Gesamtzahl der Reads in den Promotorbereichen aller Gene normalisiert um technisch bedingte Differenzen zwischen den Proben auszugleichen. In Abbildung 5-22 sind exemplarisch die sechs Gene mit der am stärksten erhöhten und der am stärksten verringerten Transkription dargestellt.

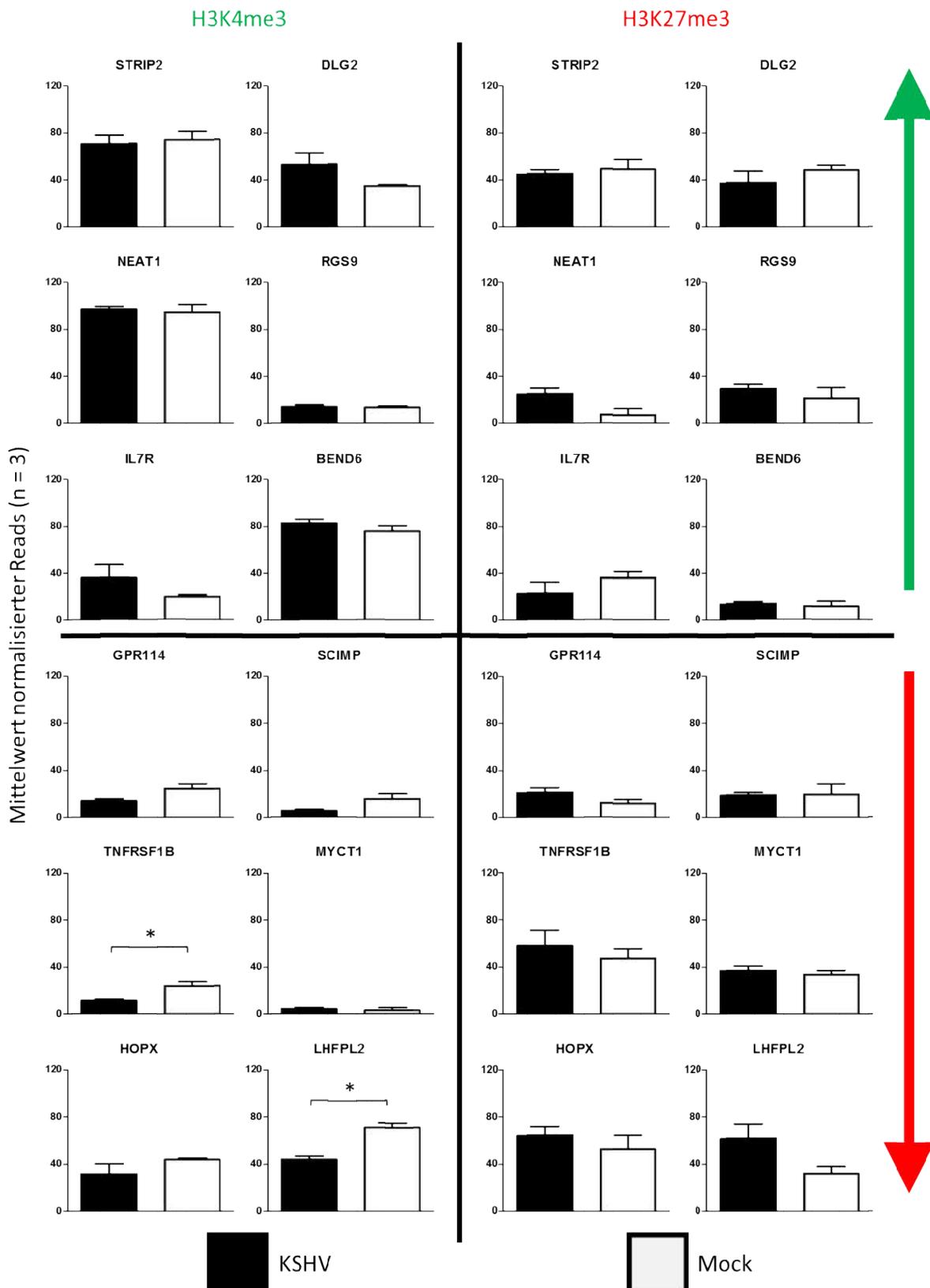


Abbildung 5-22: Histonmethylierungen in den Promotorregionen der am deutlichsten differentiell transkribierten Gene in rKSHV-infizierten MC116 im Vergleich zu mock-infizierten Zellen.

Dargestellt ist die normalisierte Anzahl der Reads in einem Fenster 1000 bp strangauf- und strangabwärts des TSS der sechs Gene mit der am stärksten erhöhten und der am stärksten verringerten Transkription. Im linken Bereich ist die H3K4me3-Modifikation, im rechten die H3K27me3-Modifikation dargestellt. Im oberen Abschnitt der Abbildung befinden sich die höher transkribierten Gene (grüner Pfeil), im unteren die geringer transkribierten (roter Pfeil). Signifikante Änderungen sind mit einem Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Die differentiell regulierten Gene weisen zumeist keine signifikanten Änderungen der untersuchten Histonmodifikationen auf. Lediglich 12 von 102 differentiell transkribierten Genen zeigen signifikant veränderte Level der H3K4me3-Modifikation und 10 von 102 der H3K27me3-Modifikation. Viele von diesen befinden sich bezüglich der Gesamtzahl der Reads in der Promotorregion im oder nahe des Hintergrundes. So beträgt die durchschnittliche Anzahl normalisierter Reads für die 12 Gene mit signifikanter Änderung der H3K4me3-Modifikation nur 24 (KSHV) bzw. 33 (Mock). Auch für die H3K27me3-Modifikation befindet sich die Anzahl der Reads bei 7 der 10 Gene mit differentiellen Modifikations-Leveln im Bereich des Hintergrundes.

Die ausgesuchten differentiell transkribierten Gene repräsentieren das Gesamtbild. Auch hier sind kaum signifikante Änderungen der Histonmodifikationen vorhanden, trotz der relativ stark veränderten Transkription. Lediglich für die geringer transkribierten LHFPL2 und TNFRSF1b ließen sich signifikante Reduktionen der H3K4me3-Level in den infizierten Zellen nachweisen. In beiden waren auch die H3K27me3-Level erhöht, wenn auch nicht signifikant. Bei TNFRSF1b handelt es sich um einen Membranrezeptor der in den Tumornekrosefaktor- α Signalweg involviert ist. Die Funktion des LHPFL2 ist nicht näher bekannt.

5.2.5 Korrelation der RNA-seq und CHIP-seq Daten der MC116-Zellen

Analog zur Analyse der Korrelation von Transkription und Histonmodifikationen in HDF-Zellen wurde diese für die MC116-Zellen durchgeführt. Gene, die nach Auswertung mit DESeq eine differentielle Transkription aufwiesen, wurden mit den Ergebnissen der diffReps Analyse für differentielle Histonmodifikationen verglichen. Gene mit erhöhter Transkription sollten entsprechend höhere Level der H3K4me3-Modifikation tragen bzw. geringere Level der H3K27me3-Modifikation und umgekehrt.

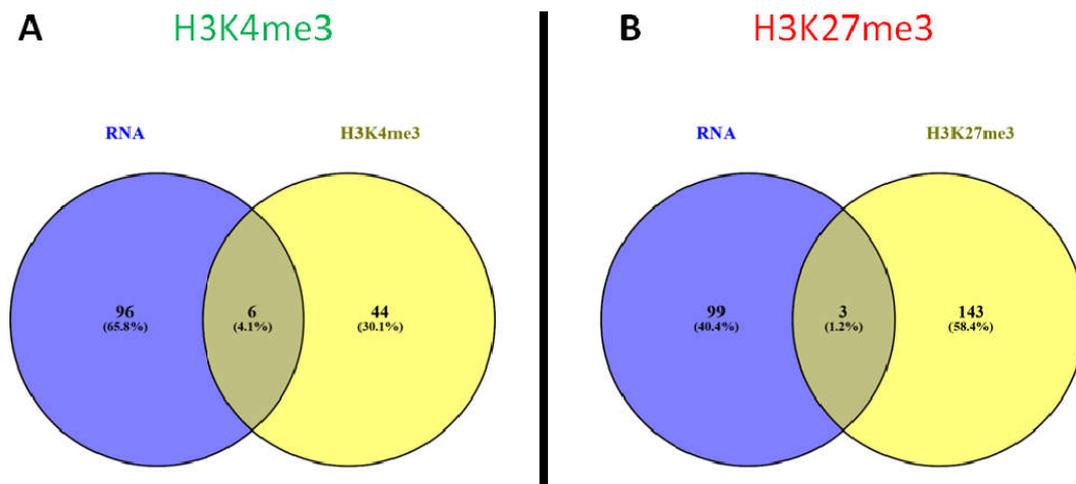


Abbildung 5-23: Korrelation differentieller Transkription und differentieller Histonmodifikationen.

Differentiell transkribierte Gene wurden mit DESeq, Bereiche mit differentiellen Histonmodifikationen mit diffReps ermittelt. **A:** Korrelation differentieller Transkription mit der H3K4me3-Modifikation. **B:** Korrelation differentieller Transkription mit der H3K27me3-Modifikation. Ein Gen wurde als korrelierend verändert angesehen, wenn es bei gesteigerter Transkription höhere H3K4me3-Besetzungen bzw. geringere H3K27me3-Besetzungen aufwies und umgekehrt.

Wie schon für die HDF-Zellen ist die Korrelation differentieller Transkription und differentieller Histonmodifikationen sehr schwach, wobei diese für die H3K4me3-Modifikation deutlicher ausgeprägt ist als für die H3K27me3-Modifikation. Die korrelierenden Gene aus Abbildung 5-23 sind in Tabelle 5-7 und Tabelle 5-8 dargestellt.

Tabelle 5-7: Gene mit korrelierender Veränderung von H3K4me3-Modifikation und Transkription.

Die differentielle Besetzung mit H3K4me3 wurde mit dem Programm diffReps ermittelt, die differentielle Transkription mit dem Programm DESeq.

Symbol	Name	Log2FC H3K4me3	Log2FC RNA
DLG2	Discs Large MAGUK Scaffold Protein 2	0,58	0,83
ITGA3	Integrin Alpha 3	-0,79	-0,67
LHFPL2	Lipoma HMGIC Fusion Partner-Like 2	-0,87	-0,88
PLEKHA2	Pleckstrin Homology Domain Containing A2	-0,53	-0,52
ST3GAL1	ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 1	-0,49	-0,63
SYNGR1	Synaptogyrin 1	-0,95	-0,58

Tabelle 5-8: Gene mit korrelierender Veränderung von H3K27me3-Modifikation und Transkription.

Die differentielle Besetzung mit H3K27me3 wurde mit dem Programm diffReps ermittelt, die differentielle Transkription mit dem Programm DESeq.

Symbol	Name	Log2FC H3K27me3	Log2FC RNA
BEND6	BEN Domain Containing 6	-1,33	0,69
DLG2	Discs Large MAGUK Scaffold Protein 2	-1,36	0,83
DOK1	Docking Protein 1	1,57	-0,51

Die Gene mit zur Transkription korrelierender Änderung der H3K4me3-Besetzung weisen jeweils nur geringe log2FC-Werte auf. Für die H3K27me3-Modifikation sind diese wesentlich deutlicher, doch auch hier sind die Transkriptionsunterschiede gering. Eine Analyse der Gen-Ontologie aller korrelierender Gene ergab keine angereicherten Cluster mit mehr als 2 Genen. Auch die Untersuchung der assoziierten Funktionen der Gene zeigte kaum Gemeinsamkeiten. Interessant ist, dass das Gen DLG2 sowohl für die H3K4me3- als auch die H3K27me3-Modifikation signifikant differentielle Werte aufweist. Es handelt sich um eine Membran-assoziierte Guanylat Kinase, die vermutlich mit anderen Proteinen einen multimeren Komplex an postsynaptischen Lokationen bildet und das Clustering von Rezeptoren und Signalproteinen bewirkt. Eine Assoziation mit Tumoren oder tumorrelevanten Funktionen ist nicht bekannt. Das in 5.2.4 identifizierte TNFRSF1b wurde in dieser Analyse nicht detektiert, da die Änderung der H3K4me3-Modifikation von diffReps nicht detektiert wurde.

Nachdem für die differentiellen Gene kaum eine Korrelation zwischen der Transkription und den Leveln der Histonmodifikationen ermittelt werden konnte, wurde die generelle Korrelation der beiden Parameter in allen Promotorbereichen (1000 bp strangauf- und strangabwärts) untersucht. Die Vorgehensweise für diese Analyse ist analog zu der in HDF-Zellen (siehe 5.1.4 und Abbildung 5-11).

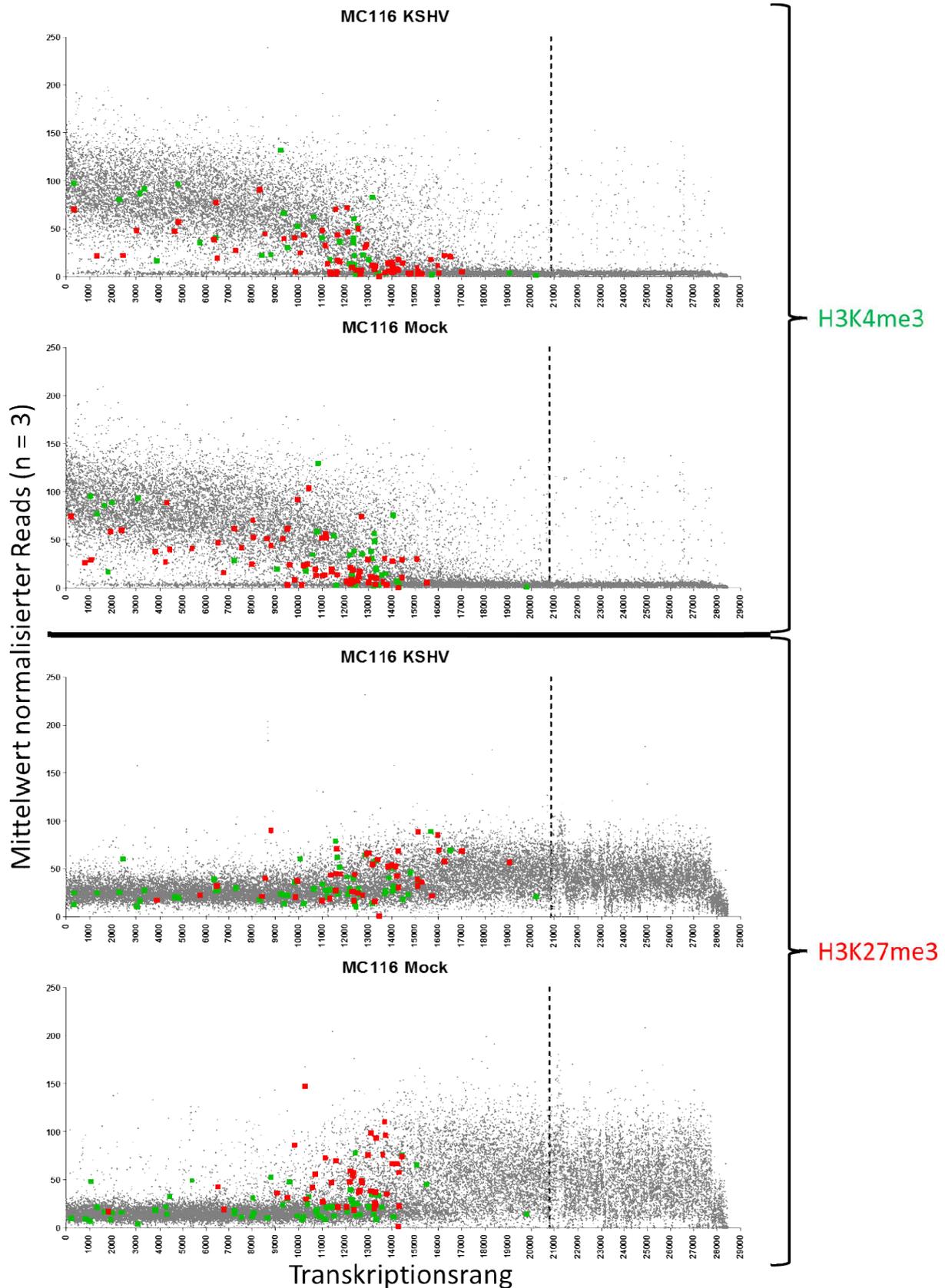


Abbildung 5-24: Korrelation von Histonmodifikationen und Transkription aller Gene in MC116-Zellen.

Die oberen beiden Diagramme zeigen die H3K4me3-Level in den KSHV- und Mock-Proben, die unteren beiden die H3K27me3-Level. Auf der X-Achse sind die Gene von höchster zu niedrigster Transkription sortiert, die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zu den nicht transkribierten Genen an. Auf der Y-Achse ist die mittlere Besetzung der entsprechenden Histonmodifikation über drei Replikate aufgetragen. Differenziell transkribierte Gene sind gesondert markiert, in grün Gene mit in rKSHV-infizierten Zellen gesteigerten Histonmodifikations-Leveln, in rot mit gesenkten.

Auch bezüglich der generellen Korrelation von Transkription und Histonmodifikationsleveln verhalten sich die MC116- ähnlich wie die HDF-Zellen. Gene mit hohen Transkriptionswerten zeigen zumeist auch hohe H3K4me3- und niedrige H3K27me3-Werte und umgekehrt. Dies führt in den linken Bereichen der Diagramme zu einer Akkumulation der Punkte im oberen Bereich für die H3K4me3 und nahe der X-Achse für die H3K27me3. Umgekehrt zeigen sich im rechten Bereich der Diagramme vermehrt hohe Werte für die H3K27me3 während sich für die H3K4me3 die Punkte der X-Achse annähern. Erneut zeigen trotz dieses generellen Trends eine Vielzahl von Genen antikorrelierende Besetzungen der Modifikationen. Für beide Modifikationen stellt sich auch in dieser Untersuchung rasch ein Plateau ein, sodass eine Steigerung oder Abnahme der Transkription keine weitere Änderung der Histonmodifikation nach sich zieht. Zwischen den überwiegend negativen und dem Plateau der überwiegend positiven Gene gibt es im mittleren Abschnitt des Diagramms einen dynamischen Bereich der erneut den Großteil der differentiell transkribierten Gene enthält.

Wie schon in den HDF-Zellen zeigten Gene mit einer veränderten Transkription nur selten auch Änderungen in der Besetzung der Histonmodifikationen und umgekehrt. Jedoch konnte die generelle Korrelation von Transkription und der Level der H3K4me3- und H3K27me3-Modifikation in den Promotorbereichen gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in den HDF-Zellen konnten hier jedoch zwei Gene (TNFRSF1b und LHFPL2) ermittelt werden, die neben einer veränderten Transkription auch eine korrelierende Veränderung der Histonmodifikationen aufwiesen. Entsprechend stellen die beiden Gene vielversprechende Ansatzpunkte für weitere Analysen dar.

5.2.6 Analyse des TNFRSF1b in MC116-Zellen

Nach Auswertung der RNA-seq und ChIP-seq Daten der MC116-Zellen konnten zwei Gene (TNFRSF1b und LHFPL2) identifiziert werden, welche eine deutlich verringerte Transkription aufwiesen und eine signifikante Verringerung der H3K4me3-Modifikation. Zusätzlich zeigte auch die H3K27me3-Modifikation erhöhte Werte. Da jedoch die Funktion des LHFPL2 im Gegensatz zum TNFRSF1b nicht bekannt ist, wurden weitere Analysen auf letzteren fokussiert. Bei TNFRSF1b handelt es sich um

einen Rezeptor des Zytokins TNF- α . Dieser ist in die Regulation von Apoptose und Inflammation involviert, vor allem über die Stimulation von NF- κ B.

Zur Bestätigung der differentiellen Transkription wurden die rKSHV-infizierten sowie nicht-infizierte MC116-Zellen aufgetaut, expandiert und nach vier Tagen die RNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert.

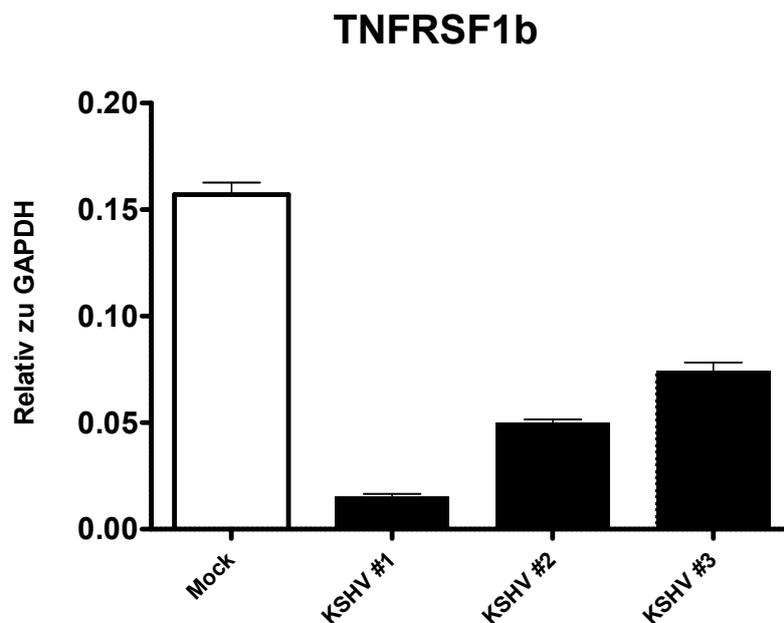


Abbildung 5-25: Bestätigung der verringerten Transkription des TNFRSF1b in rKSHV-infizierten MC116-Zellen mittels qPCR.

Gesamtzell-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mit TNFRSF1b sowie GAPDH spezifischen Primern mittels qPCR analysiert. Die TNFRSF1b-Werte wurden auf die GAPDH-Transkription normalisiert.

Die Ergebnisse in Abbildung 5-25 bestätigen die verringerte Expression des TNFRSF1b. Im Vergleich zu den RNA-seq-Daten ist die Differenz zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen in dieser Analyse deutlich größer. Des Weiteren scheint die Höhe der Transkription in den KSHV-infizierten Zellen zwischen den Proben zu schwanken.

Nachdem die differentielle Transkription des TNFRSF1b bestätigt werden konnte, wurde eine mögliche Auswirkung auf den TNF- α -Signalweg untersucht. Hierzu sollten die Mengen an phosphoryliertem NF- κ B (P-NF- κ B) und phosphoryliertem I κ B α (P-I κ B α) überprüft werden. Beide zeigen eine Aktivierung des NF- κ B an. Das I κ B α , welches im unstimulierten Zustand NF- κ B bindet und inhibiert, wird in Folge eines aktivierenden Signals phosphoryliert. Dies führt zur Ubiquitylierung und Dissoziation vom NF- κ B, sowie schlussendlich zur proteasomalen Degradation. Das freigesetzte NF- κ B wird ebenfalls phosphoryliert und transloziert in den Nukleus. Für

das Experiment wurden MC116 Zellen mit unterschiedlichen Mengen TNF- α für 15 min, 30 min und 2h behandelt und die Mengen an P-NF- κ B und P-I κ B α mittels spezifischer Antikörper per Western Blot überprüft.

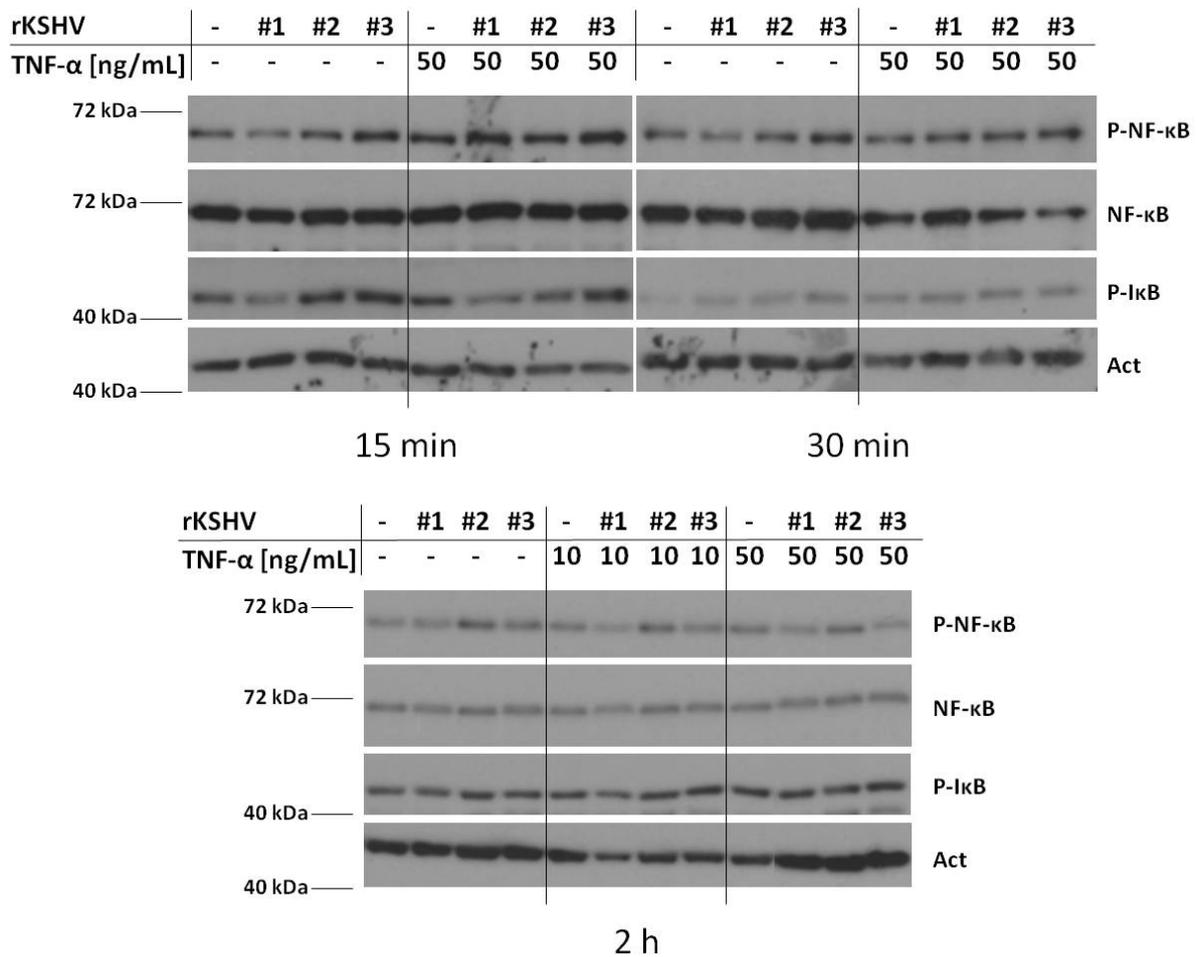


Abbildung 5-26: Western-Blot-Analyse der P-NF- κ B- und P-I κ B α -Level in infizierten und nicht-infizierten MC116-Zellen mit und ohne Stimulation durch TNF- α .

Infizierte und nicht-infizierte MC116-Zellen wurden für 15 min, 30 min und 2h mit TNF- α stimuliert, geerntet und lysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden die Level des P-NF- κ B und P-I κ B α analysiert, als Kontrollen dienten Actin sowie unphosphoryliertes NF- κ B. Für die frühen Zeitpunkte wurden 50 ng/mL TNF- α verwendet, für den späten Zeitpunkt zusätzlich eine Konzentration von 10 ng/mL. Es wurden alle drei *de novo* infizierten MC116 Kulturen getrennt untersucht und entsprechend den Replikaten in den Sequenzierungsanalysen mit #1, #2 und #3 bezeichnet.

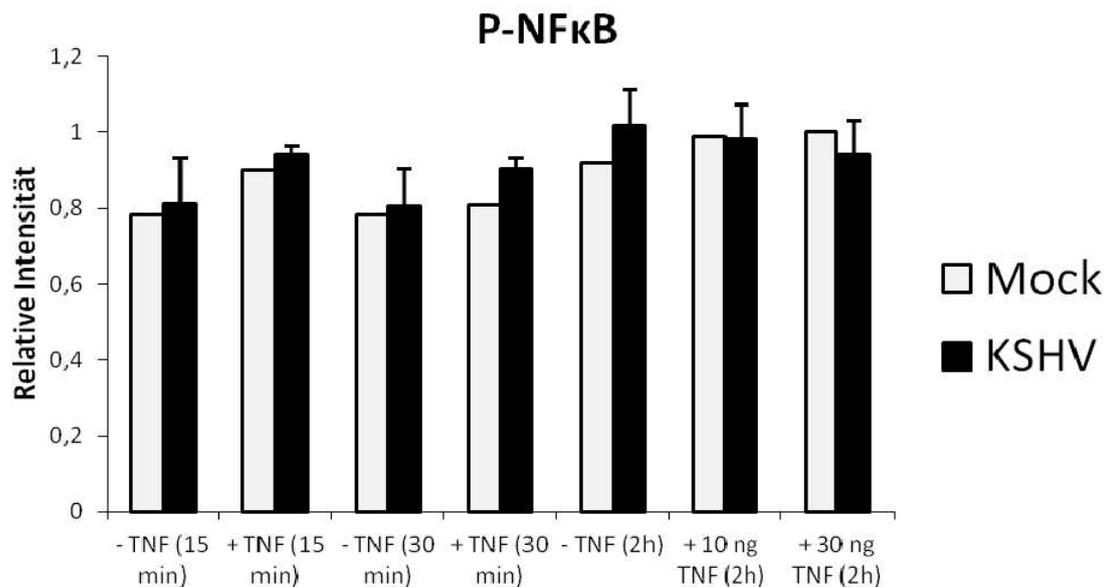


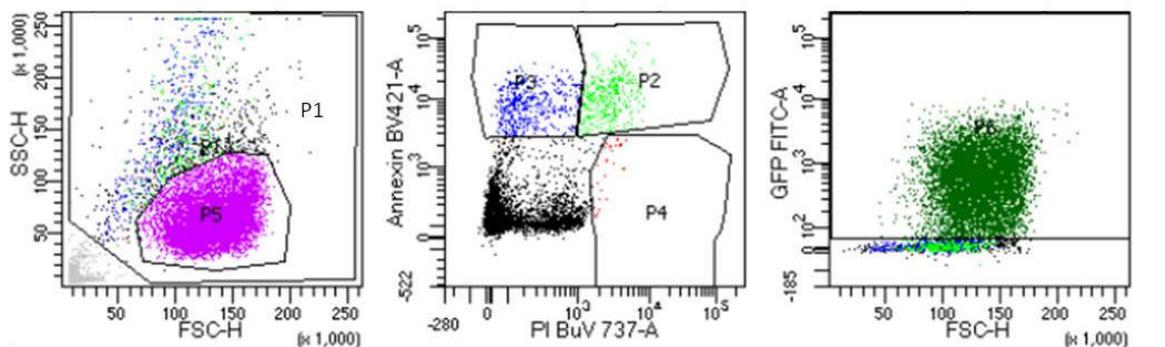
Abbildung 5-27: Relative Quantifizierung des TNFRSF1b Western-Blot.

Es ist die Intensität der Banden des P-NF- κ B relativ zu der Intensität der Banden des NF- κ B dargestellt. Für die KSHV-infizierten Replikate wurde jeweils der Mittelwert der Intensitäten gebildet. Die Intensität der Banden wurde mit dem Programm ImageJ bestimmt.

Zum frühen Zeitpunkt 15 min nach Stimulation lässt sich ein schwacher Anstieg der Menge an P-NF- κ B in den TNF- α behandelten Zellen feststellen, jedoch kaum Anstieg an P-I κ B α . Zum Zeitpunkt 15 min nach Stimulation sind die Actin-Signale in den stimulierten Zellen schwächer, was auf eine geringfügig geringere Menge an aufgetragenem Protein hindeutet, sodass hier vermutlich ein geringer Anstieg an P-I κ B α vorliegt. Zum späten Zeitpunkt 2 h nach Stimulation zeigt sich keine Änderung der P-NF- κ B- oder P-I κ B α -Level in den TNF- α behandelten Zellen. Das TNF- α zeigt somit zum frühen Zeitpunkt (15 min) den erwarteten Effekt, welcher jedoch in Anbetracht der verwendeten Konzentration äußerst schwach ausfällt. Es konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied in den P-NF- κ B- oder P-I κ B α -Leveln zwischen den infizierten und nicht-infizierten Zellen festgestellt werden. Auf Grund der geringeren Transkription des TNFRSF1b wäre zu erwarten gewesen, dass in den infizierten Zellen geringere Mengen P-NF- κ B und P-I κ B α vorliegen, da die Ausbildung dieser Phosphorylierung unter anderem über den TNFRSF1b vermittelt wird. Die Mengen an unphosphoryliertem NF- κ B waren unabhängig von den Konditionen konstant, lediglich 30 min nach Stimulation scheinen diese in den stimulierten Zellen etwas niedriger.

Da die verminderte Transkription des TNFRSF1b anscheinend nur einen geringen Einfluss auf die Aktivierung des NF- κ B hat, sollte im Folgenden untersucht werden, in wie weit die Zellen bezüglich der Apoptose ein unterschiedliches Verhalten aufweisen. Zwar wird das apoptotische Signal, welches durch TNF- α ausgelöst wird, vor allem über den TNFR1 vermittelt, jedoch gibt es diverse Beeinflussungen und Überschneidungen zwischen den beiden Signalwegen, sodass eine Reduktion des TNFRSF1b einen Einfluss auf die Apoptose bzw. den Eintritt in diese haben könnte. Für die Untersuchung wurde das "Annexin A5 Apoptosis Detection Kit" (BioLegend) verwendet (siehe 4.3.6). Für den Versuch wurden infizierte und nicht-infizierte MC116-Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Mengen TNF- α (3 - 30 ng/mL) stimuliert, entsprechend den Anweisungen des Kits behandelt und mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert. In Abbildung 5-28 wird die Auswahl der Fenster (*gating*) für die Analyse am Durchflusszytometer erläutert, die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 5-29 dargestellt. Farbstoffe und Parameter wurden so gewählt, dass es zu möglichst geringen Interferenzen mit den Fluoreszenzproteinen (GFP, RFP) des rKSHV in den infizierten Zellen kam.

A



B

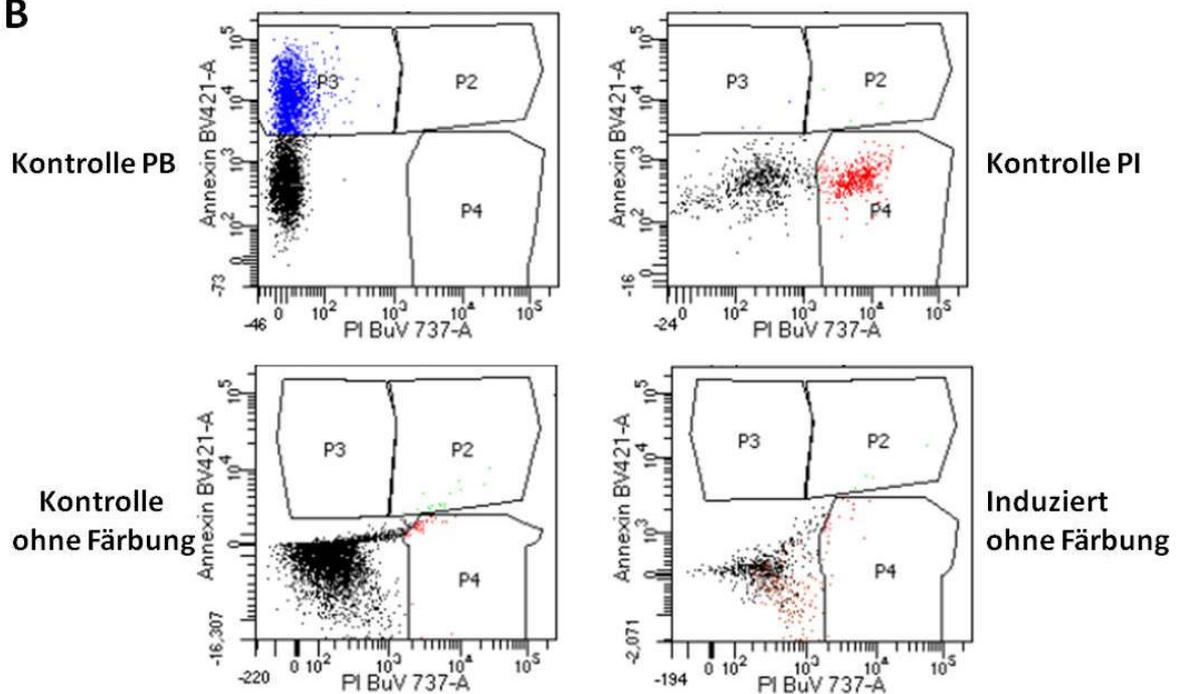


Abbildung 5-28: Erläuterung zur Auswertung und Fensterwahl bei der Analyse des Annexin V-Assays mittels Durchflusszytometer.

In der Abbildung sind exemplarisch Dot-Plots und Fenster dargestellt, die für die Analyse verwendet wurden. **A:** Im linken Diagramm erfolgt zunächst die Selektion der intakten Zellen sowie von Zellfragmenten durch das Fenster P1. Kleine Fragmente und Artefakte werden mit Hilfe dieses Fensters ausgespart. Das Fenster P5 zeigt die lebenden Zellen an. Im mittleren Diagramm erfolgt die Unterscheidung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe Pacific Blue (apoptotische Zellen) und Propidiumiodid (nekrotische Zellen). Das Fenster P3 (blau) beschreibt die PB-positiven, apoptotischen Zellen, das Fenster P2 (grün) die PB- und PI-positiven, nekrotischen Zellen. Das Fenster P4 dient der Kontrolle. In diesem sollten ausschließlich PI-positive Zellen angezeigt werden, welche bei gleichzeitiger Verwendung von Annexin-PB nicht vorhanden sein sollten. Das rechte Diagramm dient der Überprüfung der GFP-Expression in den rKSHV-infizierten Zellen. **B:** Dargestellt sind die vier Kontroll-Ansätze, die zur Bestimmung der unterschiedlichen Populationen und Anpassung der Fenster verwendet wurden. Gezeigt sind nur die Kontrollen der rKSHV-infizierten Zellen. Die beiden oberen Diagramme zeigen die Positivkontrollen. Die Zellen wurden mit Staurosporin behandelt, um Apoptose und Nekrose auszulösen, und anschließend mit jeweils einem von beiden Farbstoffen behandelt. An Hand der ungefärbten Proben (unten) ist erkennbar, dass die Fluoreszenzproteine des rKSHV die Messung der Fluoreszenzfarbstoffe des Kits nicht verfälschen. Auch eine erhöhte RFP-Expression in Folge der Induktion des Virus beeinflusst die Messung nicht (siehe rechts unten).

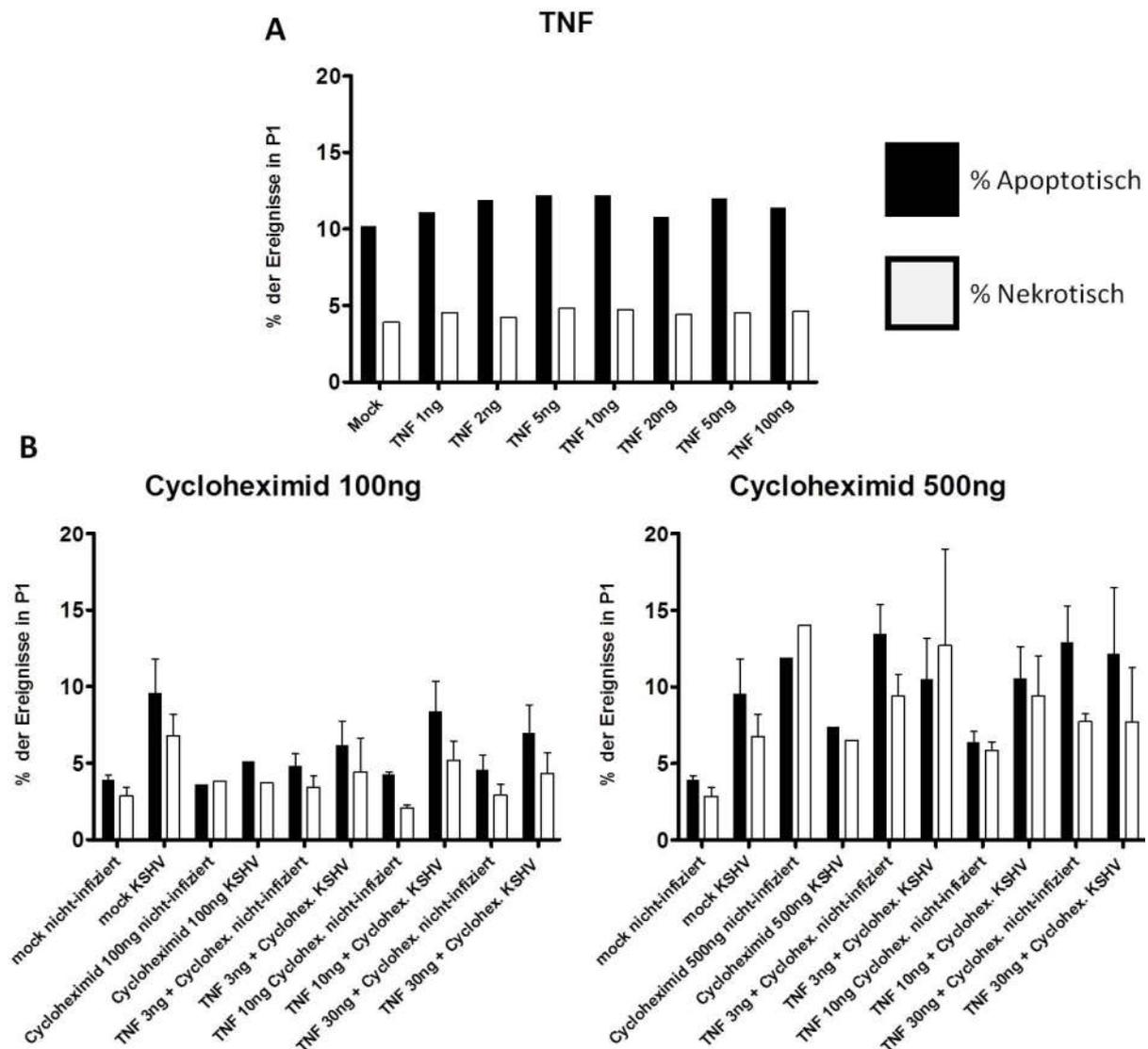


Abbildung 5-29: Auswertung des Annexin-Apoptose-Assays.

In schwarz sind die apoptotischen (PB-positiv) und in weiß die nekrotischen (PB- und PI-positiv) Zellen als Prozentzahl der Ereignisse im Fenster P1 dargestellt. **A:** Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen TNF- α bei nicht-infizierten MC116-Zellen. **B:** Vergleich infizierter und nicht-infizierter MC116-Zellen unter Einfluss unterschiedlicher Cycloheximid- (links 100 ng/mL, rechts 500 ng/mL) und TNF- α -Konzentrationen.

Zunächst wurde der Effekt des TNF- α auf die Apoptoserate in nicht-infizierten MC116-Zellen bei unterschiedlichen Konzentration untersucht (siehe Abbildung 5-29 A). Hierbei zeigte sich ein nur äußerst geringer Effekt des TNF- α . Um die Aktivierung der anti-apoptotischen Signalwege zu blockieren bzw. einzuschränken, welche ebenfalls durch TNF- α ausgelöst werden, wurden die Zellen mit Cycloheximid inkubiert. Hierbei handelt es sich um ein Antibiotikum, welches als genereller Translationshemmer bei Eukaryoten wirkt. Somit werden in Folge der Aktivierung von anti-apoptotischen Transkriptionsfaktoren keine oder deutlich geringere Mengen anti-apoptotischer Proteine bzw. Peptide exprimiert. Die Aktivierung der Apoptose hingegen ist von der Translation unabhängig, da die benötigten Proteine bereits in

inaktiven Vorstufen vorliegen (z.B. pro-Caspasen). Auf Grund seiner translationshemmenden Wirkung ist Cycloheximid toxisch und löst in höheren Konzentrationen die Apoptose aus. Daher wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen verwendet. Die geringere (100 ng/mL) zeigte keinen Einfluss auf die Apoptoserate, wohingegen die höhere (500 ng/mL) bereits zu einem deutlichen Anstieg führte.

Bei den unbehandelten Proben fiel zunächst auf, dass bereits die Infektion mit rKSHV zu einer gesteigerten Apoptose- und Nekroserate führte. Die Inkubation mit TNF- α führte bei keiner der beiden Cycloheximid-Konzentrationen zu einer differentiellen Apoptoserate zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen. Darüber hinaus konnte weder für infizierte noch für nicht-infizierte Zellen ein allgemeiner Anstieg der Apoptoserate durch Inkubation mit TNF- α festgestellt werden.

Trotz differentieller Transkription des TNFRSF1b ließen sich in der funktionellen Analyse bezüglich der NF- κ B-Aktivierung und der Apoptoserate keine Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen feststellen. Da es auch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen gibt, wäre es möglich, dass die differentielle Transkription über diese ausgeglichen wird, sodass die Levels an tatsächlich vorhandenen Rezeptoren keine Unterschiede aufweisen. Daher sollte im nächsten Schritt die Menge an TNFRSF1b in infizierten und nicht-infizierten Zellen bestimmt werden. Um dies zu untersuchen, wurden infizierte und nicht-infizierte MC116-Zellen parallel kultiviert und Proteinlysate erstellt. Unter Verwendung eines TNFRSF1b-spezifischen Antikörpers wurden diese per Western-Blot analysiert. Der Versuch wurde mit jeweils getrennt aufgetauten und kultivierten Zellen wiederholt.

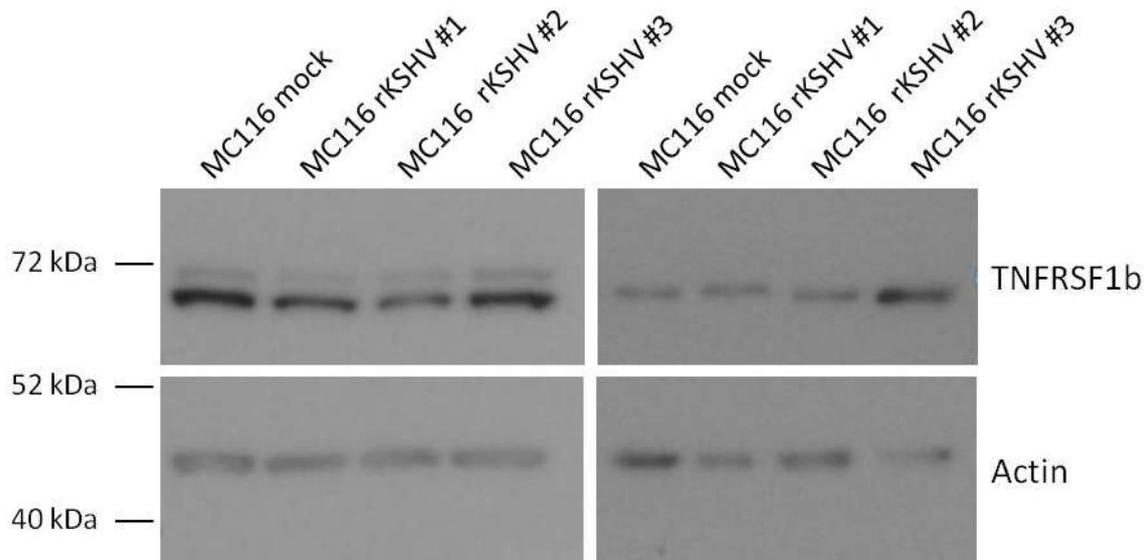


Abbildung 5-30: Western-Blot zur Analyse der Protein-Level des TNFRSF1b in infizierten und nicht-infizierten MC116-Zellen.

Linkes und rechtes Bild zeigen jeweils getrennt aufgetaute und kultivierte Ansätze der gleichen Kulturen. Es wurden die Proteinmengen des TNFRSF1b in rKSHV-infizierten (#1 - #3) und nicht-infizierten Zellen verglichen. Pro Bahn wurden 30 µg Protein aufgetragen. Als Referenz wurden die Level des Proteins Actin bestimmt.

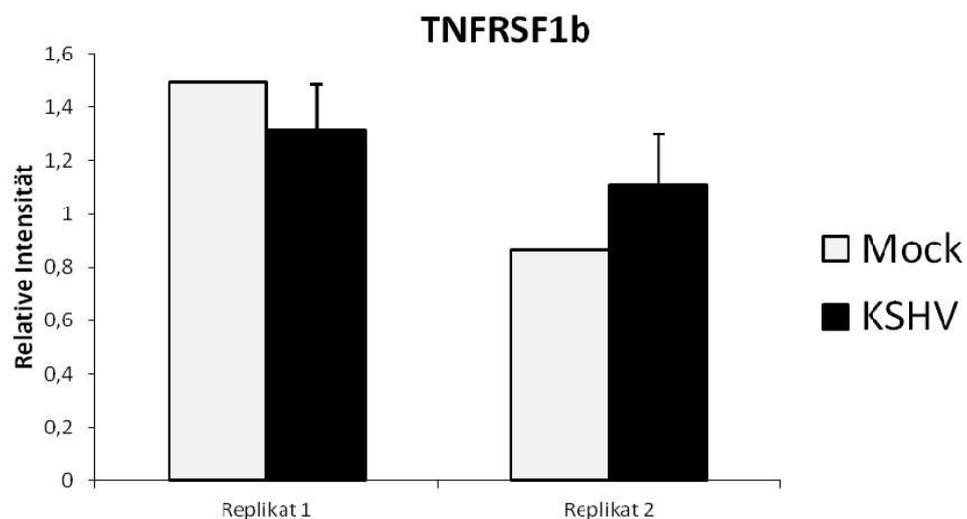


Abbildung 5-: Quantifizierung des TNFRSF1b Western Blot.

Dargestellt ist die Intensität der Banden des TNFRSF1b normalisiert auf die Intensität der Actin-Banden. Für die KSHV-Replikate ist jeweils der Mittelwert angegeben. Die Intensität der Banden wurde mit dem Programm ImageJ bestimmt.

Die Bestimmung der Proteinmengen des TNFRSF1b zeigte keine Reduktion in rKSHV-infizierten MC116-Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten. Trotz differentieller Transkription scheinen die Proteinlevel des Rezeptors in infizierten Zellen unverändert.

5.2.7 Zusammenfassung

Ähnlich wie für die HDF-Zellen ergab auch der Vergleich rKSHV-infizierter und nicht-infizierter MC116-Zellen auf Ebene der Transkription und der Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 nur relativ wenige Differenzen. Insgesamt konnten 102 Gene mit differentieller Transkription detektiert werden. Unter diesen konnten funktionale Cluster bezüglich der Zell-Adhäsion und der B- und T-Zell-Aktivierung bzw. Differenzierung identifiziert werden sowie einzelne Gene mit tumorrelevanten Funktionen wie beispielsweise NME1. Die Analyse der Histonmodifikationen ergab eine ähnliche Anzahl an differentiellen genassoziierten Fenstern wie in HDF-Zellen, 50 für die H3K4me3- und 145 für die H3K27me3-Modifikation. Obwohl die generelle Korrelation der Transkription mit den Histonmodifikationen bestätigt werden konnte, zeigte sich kaum Schnittmenge bei den Genen mit differentieller Transkription und differentiellen Histonmodifikationen in infizierten Zellen. Beispielsweise zeigte keines der Gene aus den Clustern zur B- und T-Zell-Aktivierung/Differenzierung eine Änderung der Histonmodifikationen. Jedoch konnte für die Gene TNFRSF1b und LHFPL2 sowohl für die Transkription als auch die Histonmodifikationen unterschiede festgestellt werden. Bei der funktionellen Analyse hinsichtlich der reduzierten TNFRSF1b-Transkription zeigten infizierte MC116-Zellen jedoch kein abweichendes Verhalten unter Behandlung mit TNF- α . Obwohl die verringerte Transkription bestätigt werden konnte ließ sich kein Unterschied in den Protein-Mengen des TNFRSF1b zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen feststellen.

6 Diskussion

Das Gammaherpesvirus KSHV etabliert eine lebenslange latente Infektion in seinem Wirt. In Folge dieser kann es in seltenen Fällen, meist durch Eintreten bestimmter Begleitumstände wie z.B. der Immunsuppression, zur Entstehung von Tumoren kommen. Dabei sind diverse Interaktionen des Virus bzw. viraler Proteine mit zellulären Proteinen wie z.B. Tumorsuppressoren von Relevanz. Vermutlich schafft das Virus über verschiedenste Manipulationen ein Milieu, welches die Tumorentstehung begünstigt. Welche dieser Interaktionen jedoch für die Tumorentstehung vorwiegend relevant sind ist unklar. Des Weiteren ist es wahrscheinlich, dass abseits der bekannten Interaktionen des Virus mit der Wirtszelle, wie z.B. bezüglich der Immunevasion oder der Tumorsuppressoren (siehe 1.2.4, z.B. Radkov et al. 2000; Friberg et al. 1999), noch weitere vorliegen, die auch auf anderen Ebenen ansetzen könnten. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der KSHV-Infektion auf die Transkription und die Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 der Wirtszelle untersucht, speziell in Hinsicht auf die Tumorentstehung.

Nach Infektion von HDF- und MC116-Zellen etablierten das wt KSHV bzw. das rKSHV eine latente Infektion. Dies konnte sowohl anhand des viralen Transkriptionsprofiles wie auch der Abwesenheit von RTA gezeigt werden. Die Profile zeigten außerhalb der Latenzkassette nur geringe transkriptionelle Aktivität, welche über die Zeit weiter nachließ. Ursache hierfür ist vermutlich die unvollständig etablierte Latenz früh nach Infektion. Mit zunehmender Zeit wird die Latenz stärker gefestigt und die Transkription der nicht-Latenzproteine lässt nach. Des Weiteren wies das virale Genom die erwarteten Profile der H3K4me3- und H3K27me3-Histonmodifikationen auf, wie sie aus Untersuchungen von PEL-Zelllinien bekannt sind. Da das Virus keine eigenen Proteine besitzt um diese Modifikationen zu etablieren, muss dies durch zelluläre Proteine erfolgen. Somit scheint das Virus in den untersuchten Zelltypen entsprechend mit den zellulären Komponenten zu interagieren und so die distinkten epigenetischen Profile zu etablieren. Wie schon unter 1.4.3 beschrieben sind diese Muster vermutlich einer der entscheidenden Mechanismen zu Regulation der Latenz. Auch für andere Gammaherpesviren, wie z.B. EBV, konnten entsprechende epigenetische Muster für die Regulation der Latenz gezeigt werden. Speziell für dieses Virus wird vermutlich nicht nur die Regulation zwischen Latenz und lytischer Phase über epigenetische Modifikationen

etabliert, sondern auch die Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Latenzprogrammen (Tao et al. 1999; Fejer et al. 2008). Im EBV spielen vor allem die DNA-Methylierung und die H3K27me3-Besetzung von frühen lytischen Promotoren eine Rolle, sowie Histon-Acetylierungen als aktivierende Modifikation. Wie auch das KSHV besitzt EBV keine viralen Proteine zur Etablierung dieser Modifikationen und muss daher auf zelluläre Proteine zurückgreifen (Woellmer & Hammerschmidt 2013; Ghosh Roy et al. 2016).

Für KSHV konnten bereits diverse Interaktionen viraler Proteine mit zellulären Proteinen nachgewiesen werden, welche in Etablierung bzw. Regulation von Histonmodifikationen involviert sind. So konnte beispielsweise für LANA die Assoziation mit dem HMT-Komplex hSET1 gezeigt werden, welcher für die Etablierung der H3K4me3-Modifikation zuständig ist (Hu et al. 2014). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von LANA zu einer Relokalisierung von Sp100 führt, welches Einfluss auf repressive Histonmodifikationen hat (Günther et al. 2014). Die Manipulation der zellulären Proteine zur Etablierung distinkter Muster auf dem viralen Genom kann auch die Histonmodifikationen auf dem zellulären Genom beeinflussen. Diese potenziellen Veränderungen wiederum können zu einer direkten Änderung der Transkription oder aber zu einer Prädisposition für eine veränderte Transkription führen, welche erst später mit dem Eintreten weiterer Faktoren zum Tragen kommt. Zunächst werden die Ergebnisse der Transkriptionsanalysen diskutiert.

6.1 Interpretation der Transkriptionsanalyse de novo-infizierter HDF- und MC116-Zellen

Die Untersuchung der Änderungen der Transkription in HDF- und MC116-Zellen zeigte, dass der Einfluss der KSHV-Infektion allgemein sehr gering ist. Zwar zeigte eine beträchtliche Anzahl von Genen (2230) in HDF-Zellen zwei Tage nach Infektion eine veränderte Transkription, jedoch nahm diese Anzahl über den Verlauf der Infektion immer weiter ab, bis nach 14 Tagen nur noch 158 Gene eine differentielle Transkription aufwiesen. Nur 44 von diesen zeigten bereits 2 d.p.i. eine differentielle Transkription, die übrigen 114 erst im späteren Verlauf. Die hohe Anzahl differentiell transkribierter Gene früh nach Infektion ist wahrscheinlich auf die zelluläre Reaktion auf die Infektion zurückzuführen. Durch den Eintritt in die Zelle und der damit

verbundenen Freisetzung des viralen Genoms und viraler Proteine, sowie durch die Expression nicht-latenzassoziierter Gene früh nach Infektion vor Etablierung der Latenz, beeinflusst das Virus die Zelle massiv. Diese reagiert mit der Expression antiviraler Proteine in Form einer Interferon-Antwort. Schlussendlich führte die Infektion mit KSHV zu einer erhöhten Anzahl toter Zellen im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen in den ersten Tagen nach Infektion. Die oben geschilderten Effekte sind vermutlich für die höhere Anzahl differentiell transkribierter Gene zum Zeitpunkt 2 d.p.i. verantwortlich. Dies wird untermauert durch Gen-Ontologie-Analysen. Die prominentesten Cluster unter den hochregulierten Genen 2 d.p.i. betreffen die Immunreaktion auf einen externen Stimulus im Allgemeinen (130 Gene, AW = 1,58) bzw. ein Virus im Spezifischen (38 Gene, AW = 2,82) sowie die Immunantwort (97 Gene, AW = 1,51) und die zelluläre Antwort auf Typ I Interferon (20 Gene, AW = 5,71). Die Expression dieser Gene führt zu weiteren zellulären Reaktionen, da einige wiederum als Transkriptionsfaktoren fungieren. Unter den geringer transkribierten Genen hingegen finden sich hauptsächlich Gene die mit dem Zellzyklus (328 Gene, AW = 3,2) oder dem DNA-Metabolismus (185 Gene, AW = 3,21) assoziiert sind. Vermutlich reagieren die Zellen auf Grund der Infektion mit einem Arrest des Zellzyklus. Tatsächlich war die Anzahl der Zellen 2 d.p.i. in den infizierten Proben geringer als in den Mock-Proben. In wie weit dieser Unterschied auf einen Arrest des Zellzyklus zurückgeht oder aber lediglich durch die erhöhte Anzahl abgestorbener Zellen verursacht wird ist unklar. Des Weiteren ist es möglich, dass es sich hierbei nicht um eine zellulär gesteuerte Reaktion handelt, sondern eine durch das Virus ausgelöste. So ist für einige Viren beschrieben, dass diese Zellen in bestimmten Phasen des Zellzyklus arretieren um beispielsweise dem Zelltod vorzubeugen (Bagga & Bouchard 2014). Zu späteren Zeitpunkten, wenn die latente Infektion etabliert ist, wird der Zellzyklusarrest wieder aufgehoben und die Zellen proliferieren normal bis zur vollständigen Konfluenz. Dies wird aktiv durch das Virus unterstützt, indem virale Latenzproteine wie LANA oder vFLIP mit Proteinen interagieren, die den Zellzyklus regulieren (Chang et al. 1996; Godden-Kent et al. 1997; Radkov et al. 2000; Friborg et al. 1999). Auch die Transkription der Gene der Immunantwort lässt stark nach, da sich das Virus auf Grund der geringen Expression viraler Proteine und der Immunevasion vor den zellulären Reaktionen schützt.

Zur Analyse der transkriptionellen Varianz der einzelnen Proben und Zeitpunkte wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt (siehe 5.1.2). Im Zuge dieser

wurde festgestellt, dass infizierte und nicht-infizierte Zellen keine distinkten Cluster bilden. Die einzelnen Replikate der Zeitpunkte hingegen bilden Cluster, unabhängig ob infiziert oder nicht-infiziert. Diese generellen Unterschiede in der Transkription zwischen den Zeitpunkten sind vermutlich eine Folge des Versuchsaufbaus. Wie unter 5.1 erklärt wurden die HDF-Zellen nach der Infektion nicht ausgedünnt und subkultiviert, da bei stetiger Proliferation die Infektionsrate zu stark abfällt. Mit zunehmender Konfluenz nahm die Proliferation auf Grund von zellulärer Kontaktinhibition ab. Dies hat einen wesentlichen Einfluss auf das Transkriptionsprogramm der Zellen. So zeigte der Gen-Ontologie-Vergleich differentiell exprimierter Gene nicht-infizierter Zellen zwischen den Zeitpunkten 14 d.p.i und 2 d.p.i., dass vor allem Gene assoziiert mit Morphologie, Entwicklung und Adhäsion (höher transkribiert) und Zellzyklus und Mitose (geringer transkribiert) eine differentielle Transkription aufwiesen. Die unterschiedlichen Konditionen zu den Zeitpunkten scheinen einen größeren Einfluss auf die Zellen zu haben als die KSHV-Infektion.

Der Vergleich der Transkriptionsdifferenzen zwischen infizierten und nicht-infizierten HDF-Zellen zeigte nur 30 Gene, die zu allen drei Zeitpunkten verändert waren und somit eine konsistente Änderung über den Verlauf der Infektion aufwiesen. Bei diesen handelte es sich hauptsächlich um Gene, die mit der Immunantwort assoziiert sind. Die Expression immunassoziiertes Gene trotz etablierter Latenz ist ungewöhnlich. Mit Hilfe der Repression der viralen Genexpression und viralen Mechanismen zur Immunevasion soll die Expression antiviraler Proteine und Signale im Normalfall unterbunden werden. Zudem zeigten die detektierten Gene wenige Zusammenhänge innerhalb antiviraler Signalwege, vielmehr handelte es sich um einzelne Proteine verschiedener Wege. Dies führte zu der anfänglichen Annahme, dass die Expression bestimmter Gene der Immunantwort die Latenz des Virus positiv beeinflussen könnte und deren Expression daher gezielt vom Virus stimuliert wird. Ein Hinweis hierauf war, dass wie oben erwähnt nur einzelne Gene von Signalwegen differentiell transkribiert waren. Bei einer vollständigen antiviralen Reaktion sollten auch die im Signalweg vor- bzw. nachgeschalteten Gene eine differentielle Transkription aufweisen. Jedoch nimmt die Transkription der differentiellen Gene über den Verlauf der Infektion bis 14 d.p.i. im Mittel ab (siehe Abbildung 6-1). Andere immunassoziierte Gene, die zu den früheren Zeitpunkten eine differentielle Transkription aufwiesen, zeigten 14 d.p.i. keine differentielle Transkription jenseits

der Grenzwerte. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich vielmehr um Überreste der initialen Reaktion auf die Virusinfektion handelt, was die Abnahme der Expression über die Zeit erklärt. Die den differentiellen Genen in den Signalwegen vorgeschalteten, frühen antiviralen Gene sind 14 d.p.i. schon wieder auf ihren Ausgangslevel zurückgekehrt und werden daher nicht mehr als differentiell detektiert. Nachgeschaltete Gene können aus unterschiedlichen Gründen keine Differenzen in der Transkription aufweisen. So ist die Stabilität der mRNA ein kritischer Faktor. Wird die mRNA der nachgeschalteten Gene schneller abgebaut, so kehren die gemessenen Transkriptionswerte schneller auf den Ausgangswert zurück. Des Weiteren weisen die Gene des Immunassoziierten-Clusters nur relativ geringe Änderungen der Transkription auf. Nötige Grenzwerte zur Aktivierung folgender Stufen der Signalkaskaden werden somit womöglich nicht erreicht.

Verlauf der Transkription differentieller Gene

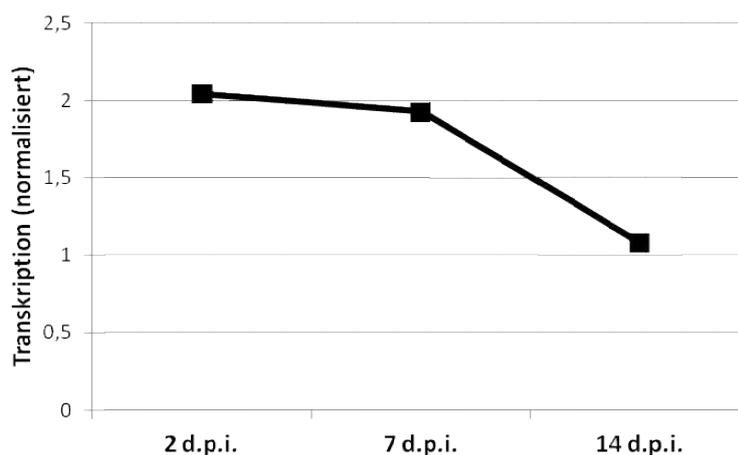


Abbildung 6-1: Verlauf der Transkription der differentiellen Gene über die betrachteten Zeitpunkte.

Dargestellt ist der Mittelwert der normalisierten Transkriptionswerte der differentiellen Gene der immunassoziierten Cluster. Einzelne Gene weisen einen abweichenden Verlauf auf, im Mittel nimmt die Transkription dieser Gene über die Zeit jedoch ab.

Das KSHV induzierte vor allem früh nach der Infektion Änderungen in der Transkription von HDF-Zellen. Diese betrafen vor allem Gene der Immunantwort und des Zellzyklus. Über die Zeit normalisierte sich die Transkription wieder, sodass die Anzahl differentiell transkribierter Gene abnahm. Gleichzeitig nahm auch die Höhe der Transkriptionsänderung der Gene, die zu allen Zeitpunkten eine erhöhte Transkription aufwiesen, 14 d.p.i. ab. Somit scheint die KSHV-Infektion nach Etablierung der Latenz nur äußerst geringen Einfluss auf die Transkription der Wirtszelle auszuüben.

Ähnlich scheint es sich für die MC116-Zellen zu verhalten. Auf Grund des unter 5.2 beschriebenen Versuchsaufbaus erfolgte für diese Zelllinie keine Analyse zu den Zeitpunkten 2 d.p.i. und 7 d.p.i. Bei der Interpretation der Ergebnisse gilt es zu beachten, dass die MC116-Zellen im Gegensatz zu den HDF-Zellen im Zuge der Antibiotika-Selektion rKSHV-positiver Zellen beständig proliferierten und subkultiviert wurden. Entsprechend sollten die Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die zelluläre Transkription hinsichtlich Zellzyklus und Proliferation nehmen. In wie weit das Antibiotikum bzw. eine erhöhte Anzahl abgestorbener Zellen die Ergebnisse beeinflussen ist schwierig abzuschätzen. Um den Einfluss unterschiedlicher Zelldichten zwischen infizierten und nicht-infizierten Proben zu minimieren, wurden die Proben nach der initialen Selektionsphase mit gleichen Zelldichten subkultiviert. Während der initialen Phase kam es in Folge der Selektion zu Schwankungen der Zelldichte der infizierten Proben. Diese durch den Versuchsaufbau bedingten Effekte können zu einer infektionsunabhängigen Varianz zwischen den Proben beitragen. Die Analyse der Transkription nach Abschluss der Antibiotikaselektion ergab, bezüglich der Anzahl der Gene, die eine differentielle Transkription aufwiesen, ein ähnliches Bild wie bei den HDF-Zellen. Insgesamt wiesen 33 Gene eine erhöhte und 69 eine verringerte Transkription in rKSHV-infizierten MC116-Zellen auf. Die funktionelle Analyse der differentiell transkribierten Gene ergab, wie schon in den HDF-Zellen, unter anderem ein immunassoziiertes Cluster. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass es sich um Überreste der initialen Reaktion auf die KSHV-Infektion handelt. Darüber hinaus konnten jedoch weitere funktionelle Cluster detektiert werden, die im Zusammenhang mit der Regulation und Differenzierung von Immunzellen stehen. Vermutlich beeinflusst das Virus diese Gene im Zusammenhang mit der Immunevasion. Beispielsweise weisen die Gene des T-Zell-Aktivierungs-Clusters eine verringerte Transkription auf (Ausnahme IL7R).

Die Gene dieser Cluster (siehe Tabelle 5-5) stellen eine interessante Zielgruppe hinsichtlich der Entstehung von B-Zell Tumoren in Folge einer KSHV-Infektion dar. Jedoch weisen viele eine Veränderung ihrer Transkription auf, die nicht zu der erwarteten Veränderung passt (basierend auf dem beschriebenen Verhalten in anderen Tumoren). Beispielsweise ist eine erhöhte Expression des TPD52 in einigen Tumorarten beschrieben (Shehata et al. 2008; Byrne et al. 2014), in den rKSHV-infizierten MC116 ist die Transkription jedoch reduziert. Bei anderen Genen ist das tumorigene Potential mit einer Translokation assoziiert (CBFA2T3, Gamou et al.

1998). Interessantester Ansatzpunkt ist allerdings das Gen NME1, da es wie beschrieben als Tumorsuppressor fungiert und eine verringerte Transkription aufweist (Hartsough & Steeg 2000). Jedoch weist es bezüglich der Histonmodifikationen keine Änderungen in infizierten Zellen auf. Des Weiteren ist die Reduktion der Transkription mit $\log_2FC = -0,57$ relativ gering ausgeprägt. Daher erfolgte im Rahmen dieser Arbeit keine weitere Analyse.

Da jedoch die bisherigen tumorrelevanten Interaktionen und Eigenschaften dieser Gene im Zusammenhang mit anderen Tumorarten untersucht wurden, ist es möglich, dass die beschriebenen Transkriptionsänderungen dennoch relevant für die B-Zell-Tumorentstehung sind. In vielen Fällen ist die Rolle zellulärer Proteine stark von der Tumorart abhängig. So können Gene in einer Tumorart als Suppressor fungieren und eine verringerte Expression aufweisen. In anderen Tumoren wiederum kann es sich gegensätzlich verhalten. Ein Beispiel für eine solche Situation stellt ebenfalls das NME1-Gen da. So wurde es ursprünglich als Tumorsuppressor beschrieben (s.o.). Neuere Untersuchungen ergaben jedoch ein kontroverseres Bild bezüglich der Rolle des Gens in Tumoren. So konnte in bestimmten Tumorarten auch eine gesteigerte Expression von NME1 gezeigt werden (Almgren et al. 2004).

Die durch KSHV ausgelösten Tumore unterscheiden sich stark voneinander. Dennoch wäre es möglich, dass zumindest teilweise die gleichen viralen Einflüsse zur Tumorentstehung führen könnten. Ein Vergleich der differentiell transkribierten Gene in HDF- (zu allen Zeitpunkten) und MC116-Zellen ergab jedoch lediglich eine Übereinstimmung (CXCL10). Da es sich bei diesem um ein interferonassoziiertes Gen der Immunantwort handelt, ist die Ursache für die differentielle Transkription in beiden Zelllinien vermutlich auf die Reaktion auf die *de novo* KSHV-Infektion zurückzuführen. Die geringe Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Zelllinien legt nahe, dass entweder unterschiedliche Mechanismen für die Tumorentstehung verantwortlich sind oder aber die in der Analyse detektierten Gene nicht mit der Tumorentstehung im Zusammenhang stehen. Da der allgemeine Einfluss des latenten Virus auf die zelluläre Transkription und die Höhe der detektierten Transkriptionsunterschiede gering sind, ist es möglich, dass andere Faktoren, welche die Transkription relevanter Gene erst später oder nur unter bestimmten Bedingungen beeinflussen, für die Tumorentstehung entscheidend sind.

Die geringen Unterschiede in der Transkription nach Etablierung der Latenz sind, in Anbetracht der Fähigkeit des Virus eine lebenslange latente Infektion in seinem Wirt zu etablieren, nicht verwunderlich. Die Latenz zeichnet sich dadurch aus, dass sie dem Virus ermöglicht von der Wirtszelle unbemerkt, d.h. ohne eine Immunantwort auszulösen, in dieser zu persistieren und bei Bedarf zu reaktivieren. Entsprechend würden eine zu starke Beeinflussung der Transkription bzw. die dafür nötigen viralen Proteine zu einer zellulären Reaktion führen. Veränderungen epigenetischer Modifikationen wie Histonmodifikationen hingegen könnten die Grundlage für spätere Entartungen der Zelle legen, ohne die Transkription akut zu beeinflussen. Zudem werden diese durch zelluläre Proteine etabliert, von denen für einige bereits Interaktionen mit viralen Latenzproteinen wie z.B. LANA nachgewiesen werden konnten. Grundlage dieser Überlegung ist die Beobachtung, dass für das Gammaherpesvirus EBV Veränderungen der zellulären Modifikationen im Zuge der Manipulation der epigenetischen Maschinerie zur Regulation der viralen Genexpression festgestellt werden konnten (Paschos et al. 2009; Skalska et al. 2010). Wie bei KSHV konnten für zahlreiche EBV-Proteine, vor allem die EBNA-Proteine, Interaktionen mit Komponenten der epigenetischen Maschinerie nachgewiesen werden. Die Relevanz der Veränderungen epigenetischer Modifikationen auf dem Wirtszellgenom hinsichtlich EBV-assoziiierter Tumorentstehung ist jedoch unklar (Woellmer & Hammerschmidt 2013; Ghosh Roy et al. 2016).

6.2 Interpretation der Analyse der Histonmodifikationen *de novo* infizierter HDF- und MC116-Zellen

Die Suche nach genassoziierten Bereichen mit differentieller Besetzung der Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 zwischen infizierten und nicht-infizierten HDF-Zellen erfolgte mit dem Programm diffReps. Dabei wurden 10-150 genassoziierte Bereiche pro Zeitpunkt detektiert. Im Vergleich zur Analyse der Transkription ist der Einfluss der Infektion auf epigenetischer Ebene also geringer, bezogen auf die Anzahl beeinflusster Gene. Des Weiteren lässt sich kein Trend zur Verringerung der Anzahl differentieller Bereiche über die Dauer der Infektion feststellen. In 6.1 wurde ausgeführt, dass es sich bei den zahlreichen differentiell transkribierten Genen früh nach der Infektion vermutlich um die zelluläre Reaktion

auf das Virus, insbesondere die Interferon-Antwort handelt. Folglich scheinen die untersuchten Histonmodifikationen nur geringen Einfluss auf diese Reaktion zu haben. Dies ist insofern erstaunlich, da die Interferon-Reaktion zwar primär durch Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1, IRFs und STATs (Hess et al. 2004) vermittelt wird, die Chromatinstruktur und damit epigenetische Modifikationen jedoch eine wesentliche Rolle spielen. So ist beschrieben, dass der Chromatin-remodellierende Komplex BAF sowie diverse Interaktionen mit HATs bzw. HDACs und somit Histon-Acetylierungen von großer Bedeutung für die Interferon-Reaktion sind (H. Liu et al. 2002; Ramirez-Carrozzi et al. 2006; Qiao et al. 2013). Des Weiteren wurde die Ubiquitylierung von H2B im Rahmen der Interferon-Reaktion auf eine Adenovirus-Infektion gezeigt (Fonseca et al. 2012). Viele dieser über epigenetische Mechanismen kontrollierten Gene werden jedoch erst im späteren Verlauf der Interferon-Reaktion aktiviert. Diese Aktivierung wird zumeist durch frühe Proteine der Interferon-Antwort ausgelöst. Somit besteht die Möglichkeit, dass diese späteren Effekte auf Grund der schnellen Etablierung der Latenz des KSHV nicht ausgelöst werden, sondern nur die frühe, nicht primär von epigenetischen Mechanismen gesteuerte Reaktion. Darüber hinaus ist die Relevanz der hier untersuchten Histonmodifikationen für die virale Immunantwort nicht geklärt. Somit ist es ebenso möglich, dass die H3K4me3- und H3K27me3-Modifikation für die Interferon-Reaktion auf eine *de novo* Infektion nur von geringer Bedeutung sind.

Die Änderungen der Histonmodifikationen in MC116-Zellen bewegen sich in ähnlichen Größenordnungen wie in den HDF-Zellen. So konnten für die H3K4me3-Modifikation 50 und für die H3K27me3-Modifikation 146 differentielle genassoziierte Bereiche detektiert werden. Die Analyse der Gen-Ontologie mittels WebGestalt führte zu keinen überrepräsentierten Clustern mit Bezug zur Tumorgenese. Jedoch befanden sich unter den assoziierten Genen drei Wachstumsfaktoren bzw. Wachstumsfaktorrezeptoren, welche in tumorrelevante Signalwege involviert sind. Dabei wiesen EGFR und IGF1R eine erhöhte Besetzung mit H3K27me3 auf, FGF12 jedoch eine geringere. Eine differentielle Transkription der Gene konnte nicht festgestellt werden. Da die Gene eine inkonsistente Änderung der Histonmodifikationen aufweisen ist es fraglich in wie weit diese relevant für die Tumorgenese sind. Interessant wäre eine Verringerung der H3K27me3-Level in den drei Genen gewesen, welche zu einer erhöhten Expression der Rezeptoren bzw. einer Prädisposition dafür führen könnte. So weist jedoch nur eines der drei Gene

verringerte H3K27me3 Level auf. Außerdem konnten in der Analyse der Signalwege mittels WebGestalt keine weiteren Gene der entsprechenden Signalwege ermittelt werden, die eine Veränderung der Histonmodifikationen aufwiesen.

Der Vergleich der Histonmodifikationen zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion in HDF-Zellen ergab keine Gene mit einer konsistenten Veränderung der H3K4me3-Modifikation und nur fünf mit einer erhöhten Besetzung der H3K27me3-Modifikation. Es wäre möglich, dass die Etablierung bzw. Änderung der Histonmodifikationen auf zellulärer Ebene länger benötigt und somit nach 2 d.p.i. nicht ausreichend fortgeschritten ist. Doch auch wenn nur die beiden späteren Zeitpunkte 7 und 14 d.p.i. betrachtet werden ergeben sich keine Gemeinsamkeiten für die H3K4me3-Modifikation, die Anzahl der gemeinsamen Bereiche mit erhöhter H3K27me3-Besetzung erhöht sich um 13, Bereiche mit geringerer Besetzung sind nach wie vor nicht vorhanden. Unter den fünf identifizierten Bereichen mit zu allen drei Zeitpunkten erhöhten H3K27me3-Leveln befindet sich ein mit dem Gen TSHZ2 assoziierter Bereich. Dieses Gen ist insofern interessant, als dass eine mögliche Funktion als Tumorsuppressor im Zusammenhang mit Brust- und Prostatakarzinom beschrieben ist (Yamamoto et al. 2011). Da jedoch keine konsistente differentielle Transkription vorliegt, erfolgte keine weitere Analyse des entsprechenden Proteins. Jedoch kann es sich bei dieser Veränderung um eine Prädisposition für spätere Veränderung der Transkription handeln.

6.3 Einschätzung der Bedeutung der schwachen Korrelation differentieller Transkription und Histonmodifikationen

Die Analyse der Histonmodifikationen mit diffReps zeigte nur wenige Differenzen in der Besetzung mit Histonmodifikationen zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. Des Weiteren wiesen die detektierten differentiellen Bereiche nur eine geringe Korrelation mit den RNA-seq Daten auf (siehe Abbildung 5-10 und Abbildung 5-23). Besonders für die H3K27me3-Modifikation zeigten die mit den differentiellen Bereichen assoziierten Gene meist keine signifikanten Unterschiede in der Transkription und umgekehrt. Für die H3K4me3-Modifikation war die Korrelation differentieller Expression und differentieller Histonmodifikationen zwar stärker ausgeprägt, jedoch immer noch sehr schwach. Da die Transkription auf unterschiedliche Arten reguliert werden kann liegt die Vermutung nahe, dass die

Regulation der differentiellen Gene, zumindest im betrachteten zeitlichen Rahmen, durch andere Mechanismen erfolgt. Umgekehrt können die Änderungen in den Levels der Histonmodifikationen durch andere Mechanismen kompensiert werden, sodass keine differentielle Transkription resultieren muss.

Für die MC116-Zellen konnte ein Gen identifiziert werden, welches sowohl für die H3K4me₃- als auch die H3K27me₃-Modifikation Veränderungen aufwies, die mit der erhöhten Transkription korrelierten. Bei diesem handelt es sich um DLG2, welches für ein Protein codiert, das als Teil eines multimeren Komplexes das Clustering von Rezeptoren, Ionenkanälen und Signalproteinen vorwiegend in Synapsen unterstützt (Kim et al. 1996). Eine Assoziation mit bösartigen Tumorerkrankungen ist nicht beschrieben, jedoch wurde eine differentielle Expression im renalen Onkozytom beschrieben, einem gutartigen, epithelialen Tumor der Niere (Zubakov et al. 2006). In wie weit diese eine funktionale Bedeutung für die Entstehung des Onkozytoms hat ist unklar, da die entsprechende Untersuchung ausschließlich auf die Identifikation von potentiellen Biomarkern abzielte. Funktionale Untersuchungen des Gens wurden in dieser Arbeit auf Grund der geringen Informationslage hinsichtlich der Funktion des Proteins nicht vorgenommen.

Zusätzlich wurden speziell die Promotorbereiche differentiell transkribierter Gene auf Veränderungen der Histonmodifikationen untersucht. In den HDF-Zellen wurden hierbei speziell die Promotorbereiche der Gene der Immun-Cluster untersucht. Es zeigten sich nur wenige signifikante Änderungen in den Promotorbereichen. Des Weiteren waren diese stets nur für einen einzelnen Zeitpunkt pro Gen vorhanden. Jedoch war für die H3K4me₃-Modifikation eine allgemeine Tendenz festzustellen. So zeigten nahezu alle untersuchten Promotorbereiche infizierter Zellen leicht erhöhte Level. Für die H3K27me₃-Modifikation konnte keine solche Tendenz festgestellt werden. Da die H3K27me₃-Level weitgehend konstant blieben scheint diese Modifikation keinen Einfluss auf die Transkription der untersuchten Gene zu haben. Die geringen Änderungen der H3K4me₃-Modifikation legen die Vermutung nahe, dass es sich hierbei nicht um den Mechanismus handelt, der die Transkription reguliert. Jedoch wäre es möglich, dass die Expression der immunassoziierten Proteine nur in einer Teilmenge der Zellen stattfindet. Bei einer sehr hohen Transkription in nur wenigen Zellen würden diese Gene mit einer geringen differentiellen Transkription detektiert werden. Da die Besetzung der Histone mit

Modifikationen jedoch schnell ein Plateau erreicht (siehe Abbildung 5-11) wären Veränderungen in nur wenigen Zellen vermutlich nicht detektierbar, bzw. würden nur zu sehr geringen, nicht signifikanten Änderungen führen.

In MC116-Zellen wurden die Promotorbereiche aller Gene mit differentieller Transkription untersucht. Wie schon für die HDF-Zellen waren auch hier nur wenige signifikante Änderungen der beiden untersuchten Histonmodifikationen festzustellen. Viele dieser Gene mit signifikanten Änderungen wiesen eine äußerst geringe Besetzung mit der jeweiligen Modifikation auf, die in der Höhe dem Hintergrund entspricht. Bei sehr niedriger Besetzung im Bereich des Hintergrundes kann es schon durch geringe Schwankungen der Read-Zahlen zu relativ hohen \log_2FC -Werten kommen. Daher ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um falsch Positive handelt. Wie für die HDF-Zellen scheinen die Histonmodifikationen für den überwiegenden Teil der untersuchten Gene nicht der relevante Mechanismus für die erhöhte Transkription zu sein.

Zwar zeigten differentielle Transkription und die Bereiche differentieller Histonmodifikationen kaum Korrelation, das generelle Verhalten von Histonmodifikationen und Transkription korrelierte jedoch wie erwartet. So reicherte sich die H3K4me3-Modifikation vor allem in Promotorbereichen an wohingegen die H3K27me3-Modifikation eine breite Verteilung über das gesamte Genom aufwies. Des Weiteren zeigten Gene, die eine hohe Transkription aufwiesen, vermehrt hohe H3K4me3- und niedrige H3K27me3-Level. Ebenso verhielt es sich andersherum (siehe Abbildung 5-11 und Abbildung 5-24). Wie in den Abbildungen zu erkennen ist wichen jedoch zahlreiche Gene von dieser generellen Korrelation ab und wiesen eine hohe Transkription trotz niedriger H3K4me3- bzw. hoher H3K27me3-Level auf oder umgekehrt. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in anderen Studien geschildert und die Vermutung geäußert, dass beispielsweise auch der CpG-Gehalt des Promotors einen Einfluss auf die Besetzung mit Histonmodifikationen hat (Bhandare et al. 2010). Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut, dass die Histonmodifikationen nur einer von vielen Mechanismen sind um die Transkription zu regulieren. Des Weiteren wurden in den Experimenten nur zwei der vielen verschiedenen Histonmodifikationen betrachtet. So könnte das Vorhandensein und damit das Zusammenspiel anderer Modifikationen ebenso für das abweichende

Transkriptionsverhalten verantwortliche sein wie Transkriptionsfaktoren oder weitere Mechanismen der Regulation.

Im Zuge der Analyse der generellen Korrelation von Transkription und Histonmodifikationen für HDF- und MC116-Zellen wurde festgestellt, dass der überwiegende Teil der differentiell transkribierten Gene eine mittlere Besetzung mit Histonmodifikationen aufwies. Sie befanden sich also in einem dynamischen Bereich zwischen dem Hintergrund und dem Plateau (siehe Abbildung 5-11 und Abbildung 5-24). Umso überraschender ist es, dass keine differentiellen Histonmodifikationen für diese Gene detektiert werden konnten. Doch unabhängig von Änderungen der Histonmodifikationen gibt es eine mögliche Begründung weswegen die differentiell transkribierten Gene im dynamischen Bereich der Histonmodifikationen liegen. So weisen Gene, die konstitutiv exprimiert werden (z.B. Haushaltsgene) oder generell reprimiert sind, häufig eine entsprechend stabile und sehr hohe bzw. sehr niedrige Besetzung der Histonmodifikationen auf (Pan et al. 2007; Bhandare et al. 2010; Mikkelsen et al. 2007). Möglicherweise handelt es sich bei den Genen, die moderate Expressionslevel aufweisen um dynamisch regulierte bzw. zelltypspezifische Gene. In diesem Falle wäre eine ebenfalls dynamische Besetzung mit Histonmodifikationen, womöglich sogar bivalente Besetzung, zur Regulation der Transkription möglich. Da die Höhe der Modifikations-Level recht schnell ein Plateau erreichen ist eine weitere Regulation über diesen Mechanismus schwierig. Entsprechend passt dieses Profil zu den konstitutiv exprimierten Haushaltsgenen wohingegen dynamische Modifikations-Level bei situativ exprimierten Genen eine weitere Möglichkeit der Regulation der Expression darstellen könnten. Die Höhe der Besetzung mit Histonmodifikationen ist jedoch nur einer der möglichen Faktoren, die sich auf die Transkription auswirken können. Auch die in dieser Arbeit nicht untersuchte Breite der Peaks hat einen Einfluss auf die Transkription, vor allem für die H3K4me3-Modifikation (Chen et al. 2015).

Zwar konnte die Korrelation der Transkription mit den entsprechenden Histonmodifikationen in dieser Arbeit bestätigt werden, jedoch zeigten die Differenzen keine Korrelation. Zwar wird im allgemeinen ein kausaler Zusammenhang zwischen Transkription und Histonmodifikationen angenommen, jedoch ist keinesfalls gesichert ob Histonmodifikationen die Ursache oder die Folge der vorhandenen oder nicht vorhandenen Transkription sind (Henikoff & Shilatifard

2011; Ng et al. 2003; Clouaire et al. 2012; Margaritis et al. 2012). Letztlich wäre auch dies eine mögliche Erklärung für die mangelnde Schnittmenge zwischen Differenzen in Transkription und Histonmodifikationen.

6.4 Funktionelle Analyse des differentiellen Gens TNFRSF1b

Die Auswertung der RNA-seq- und ChIP-seq-Daten der MC116-Zellen führte zu der Identifikation von acht Genen, welche sowohl eine Änderung der Transkription aufwiesen, als auch eine signifikante Änderung mindestens einer der untersuchten Histonmodifikationen. Die Gene LHFPL2 und TNFRSF1b wiesen beide eine geringere Transkription und eine signifikant verringerte H3K4me3-Besetzung in infizierten Zellen auf. Des Weiteren zeigten auch die H3K27me3-Level für beide Gene eine leichte, wenn auch nicht signifikante, Steigerung. Das Gen DLG2 hingegen wies eine erhöhte Transkription auf sowie erhöhte H3K4me3- und verringerte H3K27me3-Level. Diese drei Gene weisen die deutlichsten Transkriptionsunterschiede auf und wurden daher für die funktionale Analyse in Erwägung gezogen. Da nur wenig über die Funktion des LHFPL2 und des DLG2 bekannt ist wurde der Fokus weiterer Analysen auf das TNFRSF1b gelegt.

Der TNFRSF1b (auch TNFR2) ist einer von zwei Membranrezeptoren des TNF- α . Bei diesem handelt es sich um ein Zytokin, welches an verschiedenen immunassoziierten Reaktionen beteiligt ist, allen voran im Prozess der Inflammation sowie bei Apoptose und Zellproliferation. Das Zytokin wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet und kann systemisch oder lokal wirken. Es bindet an die auf der Zelloberfläche präsentierten Rezeptoren TNFRSF1a und TNFRSF1b, welche in der Folge unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden auslösen. Das apoptotische Signal wird über den TNFRSF1a vermittelt, welcher über die Bindung von FADD Caspasen aktiviert und so die Apoptose auslösen kann. Gleichzeitig wird jedoch auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, welcher vor allem inflammatorische und anti-apoptotische Signale vermittelt. Verglichen mit anderen Systemen ist die apoptotische Wirkung des TNF- α daher eher gering. Der TNFRSF1b vermittelt im Gegensatz zum TNFRSF1a keine apoptotischen Funktionen. Er stimuliert primär die Aktivierung von NF- κ B. Im Gegensatz zum TNFRSF1a, welcher auf nahezu allen Zellen vorhanden ist, wird der TNFRSF1b nur in bestimmten Zelltypen exprimiert, u.a. in T- und B-Zellen. Auf Grund der Beteiligung

an diesen regulatorischen Signalen ist die Veränderung der TNFRSF1b-Transkription hinsichtlich der Fragestellung dieser Arbeit sehr interessant.

Trotz der reduzierten Transkription des TNFRSF1b in KSHV-infizierten MC116 konnte in Folge der Stimulation mit TNF- α weder eine Reduktion der Aktivierung des NF- κ B noch eine Veränderung der Apoptoserate festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liefert die Überprüfung der Proteinlevel des TNFRSF1b. So konnten keine Differenzen in der Proteinmenge des Rezeptors festgestellt werden. Da die Reduktion der Transkription sowohl im RNA-seq als auch in der qPCR in jeweils unabhängigen Proben nachgewiesen wurde, ist es unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein falsch-positives Ergebnis handelt. Da für die Analysen der Proteinmenge der gleiche Antikörper verwendet wurde ist es nicht auszuschließen, dass dieser eine Kreuzreaktion mit einem Protein ähnlicher Größe aufweist. Eine andere mögliche Ursache besteht darin, dass die Zelle die geringere Transkription des Rezeptors kompensiert. Dies wäre beispielsweise durch einen geringeren Umsatz, d.h. eine höhere Lebensdauer des Proteins möglich. Zum einen kann dies durch eine Stabilisation des Rezeptors erreicht werden, zum anderen durch eine Inhibition des Abbaus. Auch auf Ebene der mRNA kann durch vergleichbare Mechanismen eine Kompensation erfolgen. So kann durch eine Stabilisation der mRNA bzw. eine Verringerung des Abbaus die Anzahl an translatierten Proteinen pro mRNA erhöht werden.

Bei der Analyse des Annexin V-Assays zur Bestimmung der Apoptoserate konnte nicht nur kein Unterschied in der Apoptoserate zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen festgestellt werden, es konnte generell keine Steigerung der Apoptoserate bei Inkubation mit TNF- α mit oder ohne Cycloheximid festgestellt werden. Bei einer Inkubation mit TNF- α allein ist dies insofern zu erklären, dass hier die durch das Zytokin ausgelösten anti-apoptotischen Signale überwiegen und die pro-apoptotischen somit neutralisiert werden. Die Inkubation mit Cycloheximid, welches die eukaryotische Translation hemmt, sollte diese anti-apoptotischen Signale jedoch unterbinden. Zwar erfolgt nach wie vor die Aktivierung anti-apoptotischer Transkriptionsfaktoren, jedoch werden die entsprechenden Zielgene auf Grund der Hemmung der Translation nicht exprimiert. Der apoptotische Signalweg hingegen greift auf bereits translatierte Proteine zurück, die in einer inaktiven pro-Form vorliegen und ist somit von der Translation unabhängig.

Entsprechend bemerkenswert ist die Beobachtung, dass in MC116-Zellen kein apoptotischer Effekt eintritt. Die Funktionalität des TNF- α und des Cycloheximid wurde in einem identischen Versuchsaufbau mit SLK-Zellen überprüft. Bereits 24 h nach Inkubation mit beiden Reagenzien war ein Großteil der Zellen abgestorben. Die Inkubation mit TNF- α ohne Cycloheximid hingegen führte auch hier zu keiner Steigerung der Apoptose. Da das Cycloheximid alleine in höheren Konzentrationen wie erwartet toxisch wirkt geht der mangelnde Effekt vermutlich nicht von einer Resistenz der MC116-Zellen gegen das Antibiotikum aus. Vielmehr scheinen die Zellen insensitiv gegenüber TNF- α zu sein. Darauf deutet auch die äußerst schwache Reaktion auf TNF- α bezüglich der Aktivierung des NF- κ B hin. Da das Zytokin eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von B-Zellen spielt liegt vermutlich keine Insensitivität auf Grund des Zelltyps vor (Rieckmann et al. 1997). Jedoch handelt es sich bei den MC116-Zellen um eine vollständig transformierte Lymphomzelllinie. Entsprechend wäre es möglich, dass die Zellen gegenüber apoptotischen Signalen unempfindlich sind, womöglich auf Grund von Mutationen in regulatorischen Proteinen oder Bestandteilen der Signalkaskade.

6.5 Einfluss der gewählten Zellsysteme und des Versuchsaufbaus auf die Ergebnisse

Die Auswahl eines geeigneten Zellkultursystems ist von entscheidender Bedeutung für die Untersuchung eines Virus bzw. der Auswirkungen der Infektion auf die Zelle. Viele Viren haben sich auf bestimmte Zelltypen spezialisiert. Dies kann sich zum Beispiel darin äußern, dass das Virus nur bestimmte Zelltypen infizieren kann. Ursache hierfür ist häufig eine Spezialisierung auf bestimmte, zelltypspezifische Oberflächenproteine, welche das Virus für die Anlagerung oder als Rezeptor zum Eintritt in die Zelle benötigt. Doch auch Zellen die die notwendigen Oberflächenproteine exprimieren können unempfindlich für die Infektion sein. Dies liegt zumeist in der Präsenz intrazellulärer Restriktionsfaktoren begründet, wie beispielsweise TRIM5 α oder SAMHD1 bei HIV (Marsh & Helenius 2006; Laguette et al. 2011). Doch auch nach erfolgter Infektion kann das Verhalten des Virus stark zelltypabhängig sein. Gerade Herpesviren können ein breites Spektrum an Zelltypen infizieren. Dabei hat der Zelltyp zum einen Auswirkungen auf das Verhalten des Virus, beispielsweise hinsichtlich der Replikation oder der Persistenz. So kann das

VZV während der initialen Infektion verschiedene Zelltypen infizieren, die Etablierung der Latenz erfolgt jedoch ausschließlich in Neuronen (Gilden et al. 1983; Hyman et al. 1983). Zum anderen reagiert auch die Wirtszelle abhängig vom Zelltyp unterschiedlich auf die virale Infektion und Persistenz. Ein gutes Beispiel hierfür sind Tumoviren, die diverse Zelltypen infizieren können, jedoch in nur wenigen Typen infizierter Zellen zur Entstehung spezifischer Tumore führen können.

Das KSHV zeigt das für Herpersviren typische breite Spektrum infizierbarer Zellen. So lassen sich die Mehrzahl der bislang getesteten adhärenenten humanen Zellen *in vitro* mit KSHV infizieren. Jedoch verlieren die Zellen im Zuge der Proliferation das Virus zumeist wieder. Auch *in vivo* gelingt es dem Virus diverse Zelltypen zu infizieren (Ganem 2007). Doch auch hier kann die Persistenz nicht in allen Zelltypen etabliert werden. Auch wenn der genaue Zelltyp der dem KSHV als Reservoir dient noch nicht vollständig geklärt ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um B-Lymphozyten (speziell CD19+) handelt.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss des KSHV auf Transkription und Histonmodifikationen der Wirtszelle wurden zwei unterschiedliche Zellkultur-Systeme verwendet. Dabei handelt es sich um dermale Zellen und B-Zellen, also die Zelltypen in denen das KSHV *in vivo* Tumore verursachen kann. Bei den HDF-Zellen handelt es sich um primäre humane dermale Fibroblasten. Primäre Zellen bieten den Vorteil, dass diese im Gegensatz zu etablierten Zelllinien nicht immortalisiert oder transformiert sind. Die Untersuchung primärer Zellen entspricht somit eher der tatsächlichen Situation *in vivo* als die Untersuchung stabiler Zelllinien. Dermale Fibroblasten sind vor allem hinsichtlich der Entstehung des KS relevant. Jedoch ist zu beachten, dass die Herkunft der Spindelzelle nicht vollständig geklärt ist. So gibt es Hinweise, dass die Spindelzelle endothelialer Herkunft sein könnte, wohingegen es sich bei HDFs um mesenchymale Zellen handelt (Weninger et al. 1999). Die Klärung der Herkunft der Spindelzelle gestaltet sich insofern schwierig, da in Folge der Transformation eine aberrante Expression von Markerproteinen stattfindet. Das Expressionsprofil der Spindelzelle erlaubt daher keine eindeutige Zuordnung hinsichtlich ihrer Herkunft, da sowohl endotheliale wie auch mesenchymale Markerproteine präsentiert werden. Somit besteht die Möglichkeit, dass es sich bei dem verwendeten Zelltyp hinsichtlich des KS nicht um ein geeignetes System handelt. Beispielsweise könnte es sein, dass die KSHV-

induzierten Veränderungen, welche *in vivo* zur KS-Entstehung führen, in den verwendeten Zellen nicht erfolgen bzw. ohne Auswirkung sind, besonders vor dem Hintergrund, dass Fibroblasten *in vitro* schwierig zu transformieren sind.

Als zweiter Zelltyp wurde in dieser Arbeit die stabile Zelllinie MC116 verwendet. Diese ist von einem KSHV und EBV negativem B-Zell-Lymphom abgeleitet. Entsprechend diente die Verwendung dieses Zelltyps dazu die KSHV-assoziierten B-Zell-Erkrankungen abzubilden. Im Gegensatz zu den HDF-Zellen handelt es sich also um eine bereits vollständig transformierte Zelllinie. Dies ist nicht unproblematisch, da in dieser Arbeit vor allem Änderungen der Transkription oder der Histonmodifikationen tumorrelevanter Gene untersucht wurden. So ist es möglich, dass entsprechend Proteine bzw. Signalwege, welche für die Entstehung des PEL oder der MCD relevant sind, in diesem Zelltyp bereits von Beginn an, also in der nicht-infizierten Kontrolle, verändert sind. Der Einsatz primärer B-Zellen ist jedoch nicht möglich, da sich diese *in vitro* nicht oder nur äußerst schlecht infizieren lassen. Auch andere stabile B-Zelllinien weisen nur äußerst geringe Infektionsraten auf. Entsprechend musste für die Untersuchung von B-Zellen die Zelllinie MC116 verwendet werden. Trotz vollständiger, KSHV-unabhängiger Transformation ist es möglich die Veränderung der Transkription und Histonmodifikationen tumorrelevanter Gene in MC116-Zellen zu untersuchen. Jedoch ist die Untersuchung der Auswirkungen limitiert, da diese Veränderungen natürlich nicht mehr zur Transformation führen.

Mit der Auswahl der Zelllinien bzw. Zelltypen wurde versucht die Versuchsbedingungen so zu gestalten, dass sie möglichst der natürlichen Situation entsprechen. Dennoch ist es auf Grund der oben geschilderten Gründe möglich, dass die verwendeten Systeme keine adäquate Darstellung der untersuchten Zusammenhänge ermöglichen. Da es derzeit keine weiteren B-Zelllinien bekannt sind, welche sich *in vitro* adäquat mit KSHV infizieren lassen bzw. keine Methodik zur effektiven Infektion primärer B-Zellen bekannt ist, sind die Möglichkeiten hinsichtlich der zukünftigen Untersuchung der Thematik in B-Zellen stark eingeschränkt. Die Untersuchung epigenetischer Ursachen der KS-Entstehung bietet hingegen ein breites Spektrum relevanter Zelllinien bzw. Zelltypen, vor allem auf Grund der Tatsache, dass die Herkunft der KSHV-positiven Spindelzelle nicht abschließend

geklärt ist. Für zukünftige Untersuchungen böte sich die Verwendung primärer und etablierter dermaler Zellen sowie endothelialer Zellen an.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es die Transkription und die Histonmodifikationen KSHV-infizierter Zellen zu untersuchen und eventuelle Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen zu analysieren. Da es sich bei KSHV um ein humanes Tumovirus handelt sollte auf diesem Weg untersucht werden, ob das Virus während der Latenz die Transkription oder die Histonmodifikationen H3K4me3 bzw. H3K27me3 der Wirtszelle beeinflusst, wodurch die Entstehung von Tumoren begünstigt werden könnte. Vor diesem Hintergrund waren vor allem Veränderungen relevant, die über die Zeit konstant waren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der Einfluss des Virus auf die Transkription während der Latenz äußerst gering ist. Zwar waren in HDF-Zellen früh nach Infektion zahlreiche Änderungen der Transkription vorhanden, jedoch ließen diese mit zunehmender Zeit nach Infektion nach bis 14 d.p.i. nur noch 158 Gene eine differentielle Transkription aufwiesen. Nur 30 Gene zeigten eine differentielle Transkription zu allen drei untersuchten Zeitpunkten. Von diesen sind 14 mit der Immunantwort assoziiert und gehen vermutlich auf die auslaufende Antwort der Zelle auf das initiale Infektionsereignis zurück. Auch in MC116-Zellen konnten nur 102 Gene mit einer differentiellen Transkription ermittelt werden. Unter diesen konnte ebenfalls ein Cluster von Genen, die mit der Immunantwort assoziiert sind, festgestellt werden. Des Weiteren wurden Cluster von Genen mit Bedeutung für die Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten ermittelt. Entsprechend interessant sind diese Gene, da sie speziell mit dem untersuchten Zelltyp in Zusammenhang stehen und viele auf Grund ihrer Funktion in der Zell-Differenzierung im Zusammenhang mit Tumoren stehen. Mit Ausnahme des CXCL10 gab es keine Schnittmenge der Ergebnisse der Transkriptionsanalyse zwischen HDF- und MC116-Zellen. Bei diesem handelt es sich um ein Chemokin, welches in die Immunantwort involviert ist. Daher ist die Ursache für die erhöhte Transkription vermutlich die KSHV *de novo* Infektion.

Der geringe Einfluss auf die Transkription während der Latenz ist insofern nicht verwunderlich, als das Virus durch ein Minimum an Aktivität der Immunantwort des Wirtes zu entgehen und so in der Zelle zu persistieren. Dennoch konnte die differentielle Transkription einiger Gene ermittelt werden. Für weitere Analysen sind vor allem die tumorassoziierten Gene CCND2, EPSTI1 und TGFA (in HDF-Zellen

detektiert) sowie NME1 (in MC116-Zellen detektiert) relevant. So könnte die Expression dieser Gene in KSHV-assoziierten Tumoren überprüft werden sowie ein Einfluss eines knockouts der Gene auf entsprechende Tumorzelllinien untersucht werden.

Auch der Einfluss auf die untersuchten Histonmodifikationen war sehr gering. In infizierten HDF-Zellen konnten nur fünf genassoziierte Bereiche detektiert werden, die zu allen untersuchten Zeitpunkten verringerte H3K27me3-Level zeigten. Auf Grund seiner Eigenschaften als Tumorsuppressor ist vor allem das Gen TSHZ2 für weitere Untersuchungen relevant, auch wenn im untersuchten Zeitrahmen keine differentielle Expression festgestellt werden konnte. So wäre es interessant die Expression in langzeit-infizierten- oder KS-Zellen zu überprüfen. Ausgelöst durch weitere, unbekannte Faktoren könnte es dazu kommen, dass die erhöhten H3K27me3-Level schlussendlich zum Tragen kommen und so die Expression des Transkriptionsfaktors inhibieren. Auch eine Erhöhung der Level des Tshz2-Proteins in KSHV-infizierten Tumorzelllinien, beispielsweise per lentiviraler Transduktion, könnte zu Erkenntnissen hinsichtlich der Relevanz des Proteins für die Tumorentstehung führen. Des Weiteren könnte die Infektion von TSHZ2 negativen Zellen oder Zellen mit verminderter Expression des Gens hinsichtlich Faktoren wie z.B. der Proliferationsrate untersucht werden.

In MC116 Zellen konnten drei Gene mit differentiellen H3K27me3-Leveln identifiziert werden, welche in tumorassoziierte Signalwege involviert sind. Da es sich um Rezeptoren für Wachstumsfaktoren handelt ist entsprechend vor allem eine Reduktion von H3K27me3 interessant, da diese zu einer erhöhten Expression führen kann. Jedoch weist nur FGF12 eine solche auf. Insofern ist für weitere Untersuchungen vor allem dieses Gen interessant. Jedoch deutet die erhöhte Besetzung der anderen beiden Gene darauf hin, dass es sich hierbei um Gene handeln könnte, welche relativ dynamische H3K27me3-Level aufweisen.

Die Analyse des TNFRSF1b, welches sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf Ebene der Histonmodifikationen signifikante Veränderungen aufwies, ergab keinen funktionellen Einfluss auf die untersuchten Parameter NF- κ B und Apoptose in Folge von TNF- α Stimulation. Die Analyse der Proteinlevel zeigte, dass es trotz reduzierter Transkription nicht zu einer Reduktion in der Menge des Rezeptors kam. Auf welche Art und Weise die Zelle diese Kompensation ausübt ist unklar.

Entsprechend wären Untersuchungen zum Umsatz bzw. zur Stabilität des Proteins und der mRNA interessant. Außerdem wäre eine Untersuchung des Effekts von reduzierten Rezeptorleveln bei KSHV-Infektion interessant, beispielsweise per knockdown. Auf diesem Weg könnte ein Ausfall der Kompensationsmechanismen der Zelle simuliert werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
AW	Anreicherungs Wert
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cART	Antiretrovirale Kombinationstherapie (<i>combined anti-retroviral therapy</i>)
cDNA	Komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CO ₂	Kohlendioxid
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DE	Später exprimierte, frühe Gene (<i>delayed early</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos's modified eagle medium
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
d.p.i.	Tage nach Infektion (<i>days post infecetion</i>)
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EBM2	Endotheliales basales Medium 2
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FLIP	FLICE inhibierendes Protein (<i>FLICE inhibitory protein</i>)
h	Stunde(n)
H2AK119ub	Monoubiquitylierung des Histon 2A an Lysin 119
H3K4me3	Trimethylierung des Histon 3 an Lysin 4
H3K27me3	Trimethylierung des Histon 3 an Lysin 27

HAT	Histon-Acetyltransferase
HCl	Hydrogenchlorid, Salzsäure
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HDAC	Histon-Deacetylase
HDF	Humane dermale Fibroblasten
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes-Immundefizienz-Virus
HMT	Histon-Methyltransferase
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IE	unmittelbar exprimierte, frühe Gene (<i>immediate early</i>)
I κ B α	Inhibitor des NF- κ B alpha
kDa	kilo Dalton
KDM	Lysin-spezifische Demethylase
KOH	Kaliumhydroxid, Kalilauge
KS	Kaposi-Sarkom
KSHV	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus
L	Späte Gene des lytischen Zyklus (<i>late</i>)
LANA	Latenz-assoziiertes nukleäres Antigen
LiCl	Lithiumchlorid
M	molar
mA	Milliampere
MCD	Multizentrische Morbus Castleman (<i>multicentric castleman's disease</i>)
mg	Milligramm
mio	Millionen
min	Minute(n)
miRNA	micro-RNA
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat

ncRNA	nicht-codierende RNA
NF- κ B	<i>nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NPC	Nukleärer Porenkomplex (<i>nuclear pore complex</i>)
nt	Nukleotide
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ORI	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEL	Primäres Effusionslymphom
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>quantitative real-time PCR</i>)
Rb	Retinoblastom-Protein
RC	Replikationskomplex (<i>replication complex</i>)
RIN	RNA Integritäts-Wert (<i>RNA integrity number</i>)
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
rKSHV	rekombinantes KSHV
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	Roswell park memorial institute
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TNFRSF1b	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TR	Terminale Repetitionen (<i>terminal repeats</i>)
V	Volt
VZV	Varizella-Zoster-Virus

9 Literatur

- Ahmed, B. et al., 2007. Cutaneous castleman's disease responds to anti interleukin-6 treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(9), pp.2386–2390. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17766835> [Accessed January 19, 2017].
- Akula, S.M. et al., 2001. Human herpesvirus 8 envelope-associated glycoprotein B interacts with heparan sulfate-like moieties. *Virology*, 284(2), pp.235–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11384223>.
- Akula, S.M. et al., 2001. Human herpesvirus 8 interaction with target cells involves heparan sulfate. *Virology*, 282(2), pp.245–55. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682200908511>.
- Akula, S.M. et al., 2002. Integrin $\alpha 3\beta 1$ (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) entry into the target cells. *Cell*, 108(3), pp.407–419.
- Akula, S.M. et al., 2003. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) infection of human fibroblast cells occurs through endocytosis. *Journal of virology*, 77(14), pp.7978–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=161913&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Almgren, M. a E. et al., 2004. Nucleoside diphosphate kinase A/nm23-H1 promotes metastasis of NB69-derived human neuroblastoma. *Molecular cancer research : MCR*, 2(7), pp.387–394.
- Anders, S. & Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11, p.R106. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
<https://genomebiology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/gb-2010-11-10-r106?site=genomebiology.biomedcentral.com>.
- AuCoin, D.P. et al., 2002. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) contains two functional lytic origins of DNA replication. *Journal of virology*, 76(15), pp.7890–7896.
- Bagga, S. & Bouchard, M.J., 2014. Cell Cycle Regulation During Viral Infection. In *Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols, 2nd Edition*. pp. 165–227.
- Ballestas, M.E. et al., 1999. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5414), pp.641–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10213686>.
- Ballestas, M.E. & Kaye, K.M., 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mediates episome persistence through cis-acting terminal repeat (TR) sequence and specifically binds TR DNA. *Journal of virology*, 75(7), pp.3250–3258.
- Bechtel, J., Grundhoff, A. & Ganem, D., 2005. RNAs in the Virion of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Journal of Virology*, 79(16), pp.10138–10146. Available at: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.16.10138-10146.2005>.
- Bechtel, J.T., Winant, R.C. & Ganem, D., 2005. Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology*, 79(8), pp.4952–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15795281>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1069574>.
- Bélanger, C. et al., 2001. Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein inhibits Fas-mediated apoptosis through binding and prevention of procaspase-8 maturation. *Journal of human virology*, 4(2), pp.62–73.
- Beral, V. et al., 1990. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet*, 335(8682), pp.123–128.
- Bergbauer, M. et al., 2010. CpG-methylation regulates a class of Epstein-Barr virus promoters. *PLoS*

Pathogens, 6(9).

- Berger, S.L. et al., 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes and Development*, 23(7), pp.781–783.
- Bernstein, B.E. et al., 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, 120(2), pp.169–181.
- Bhandare, R. et al., 2010. Genome-wide analysis of histone modifications in human pancreatic islets. *Genome Research*, 20(4), pp.428–433.
- Birkmann, A. et al., 2001. Cell surface heparan sulfate is a receptor for human herpesvirus 8 and interacts with envelope glycoprotein K8.1. *J Virol*, 75(23), pp.11583–11593. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11689640.
- Boshoff, C. et al., 1998. Establishing a KSHV+ cell line (BCP-1) from peripheral blood and characterizing its growth in Nod/SCID mice. *Blood*, 91(5), pp.1671–9. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/91/5/1671.abstract>.
- Boshoff, C. et al., 1995. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nature medicine*, 1(12), pp.1274–1278.
- Brooks, J.J., 1986. Kaposi's sarcoma: a reversible hyperplasia. *Lancet (London, England)*, 2(8519), pp.1309–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2878178> [Accessed January 18, 2017].
- Brown, H.J. et al., 2003. NF-kappaB inhibits gammaherpesvirus lytic replication. *Journal of virology*, 77(15), pp.8532–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=165238&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brown, J.C. & Newcomb, W.W., 2011. Herpesvirus capsid assembly: Insights from structural analysis. *Current Opinion in Virology*, 1(2), pp.142–149.
- Byrne, J.A. et al., 2014. Tumor protein D52 (TPD52) and cancer???oncogene understudy or understudied oncogene? *Tumor Biology*, 35(8), pp.7369–7382.
- Cai, X. et al., 2005. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(15), pp.5570–5575. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800047%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC556237/pdf/pnas-0408192102.pdf>.
- Carroll, K.D. et al., 2007. Direct interactions of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 ORF50/Rta protein with the cellular protein octamer-1 and DNA are critical for specifying transactivation of a delayed-early promoter and stimulating viral reactivation. *Journal of virology*, 81(16), pp.8451–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537858> [Accessed March 1, 2017].
- Carter, J.B. & Saunders, V.A., 2013. *Virology: Principles and Applications*,
- Castleman, B., Iverson, L. & Menendez, V.P., 1956. Localized mediastinal lymph???node hyperplasia resembling thymoma. *Cancer*, 9(4), pp.822–830.
- Cattelan, A.M. et al., 2001. Acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma regression after highly active antiretroviral therapy: biologic correlates of clinical outcome. *J Natl Cancer Inst Monogr*, (28), pp.44–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158206>.
- Cesarman, E., Moore, P.S., et al., 1995. In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences. *Blood*, 86(7), pp.2708–14. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/86/7/2708.abstract>.

- Cesarman, E., Chang, Y., et al., 1995. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med*, 332(18), pp.1186–1191.
- Chambeyron, S. & Bickmore, W.A., 2004. Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes and Development*, 18(10), pp.1119–1130.
- Chang, J. & Ganem, D., 2000. On the control of late gene expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8). *Journal of General Virology*, 81(8), pp.2039–2047.
- Chang, Y. et al., 1996. Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature*, 382(6590), pp.410–410. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8684480> [Accessed January 10, 2017].
- Chaudhary, P.M. et al., 1999. Modulation of the NF-kappa B pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins. *Oncogene*, 18(42), pp.5738–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523854>.
- Chen, J. et al., 2001a. Activation of latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by demethylation of the promoter of the lytic transactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), pp.4119–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=31189&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chen, J. et al., 2001b. Activation of latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by demethylation of the promoter of the lytic transactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), pp.4119–24.
- Chen, K. et al., 2015. Broad H3K4me3 is associated with increased transcription elongation and enhancer activity at tumor-suppressor genes. *Nature Genetics*, 47(10), pp.1149–1157.
- Christensen, J. et al., 2007. RBP2 Belongs to a Family of Demethylases, Specific for Tri- and Dimethylated Lysine 4 on Histone 3. *Cell*, 128(6), pp.1063–1076.
- Chugh, P. et al., 2005. Constitutive NF-kappaB activation, normal Fas-induced apoptosis, and increased incidence of lymphoma in human herpes virus 8 K13 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), pp.12885–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1200255&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Clouaire, T. et al., 2012. Cfp1 integrates both CpG content and gene activity for accurate H3K4me3 deposition in embryonic stem cells. *Genes and Development*, 26(15), pp.1714–1728.
- Cook-Mozaffari, P. et al., 1998. The geographical distribution of Kaposi's sarcoma and of lymphomas in Africa before the AIDS epidemic. *British journal of cancer*, 78(11), pp.1521–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2063225&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cotter, M. a, Subramanian, C. & Robertson, E.S., 2001. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen binds to specific sequences at the left end of the viral genome through its carboxy-terminus. *Virology*, 291(2), pp.241–259.
- Deng, H.Y. et al., 2002. Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). *Journal of Virology*, 76, pp.8252–8264.
- Dillon, S.C. et al., 2005. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome biology*, 6(8), p.227. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16086857>.
- Dittmer, D. et al., 1998. A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, 72(10), pp.8309–8315. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9733875.
- Dobin, A. et al., 2013. STAR: ultrafast universal RNA -seq aligner. *Bioinformatics*, pp.1–7. Available at:

<http://code.google.com/p/rna-star/>.

- Dollery, S.J. et al., 2014. Efficient infection of a human B cell line with cell-free Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology*, 88(3), pp.1748–57. Available at: <http://jvi.asm.org/content/88/3/1748.abstract>.
- Dou, Y. et al., 2006. Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nature structural & molecular biology*, 13(8), pp.713–719.
- Edelstein, A. et al., 2010. Computer control of microscopes using manager. *Current Protocols in Molecular Biology*, (SUPPL. 92).
- Ensoli, B. et al., 1989. AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells express cytokines with autocrine and paracrine growth effects. *Science*, 243(4888), pp.223–226. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2643161.
- Ezhkova, E. et al., 2011. EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair. *Genes and Development*, 25(5), pp.485–498.
- Fanelli, M.F. et al., 2012. The influence of transforming growth factor- β , cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-9 and CXCR4 proteins involved in epithelial-mesenchymal transition on overall survival of patients with gastric cancer. *Histopathology*, 61(2), pp.153–161.
- Fejer, G. et al., 2008. Latency type-specific distribution of epigenetic marks at the alternative promoters Cp and Qp of Epstein-Barr virus. *Journal of General Virology*, 89(6), pp.1364–1370.
- Fenig, E. et al., 1998. Classic Kaposi sarcoma: experience at Rabin Medical Center in Israel. *American journal of clinical oncology*, 21(5), pp.498–500.
- Field, N. et al., 2003. KSHV vFLIP binds to IKK-gamma to activate IKK. *J Cell Sci*, 116(Pt 18), pp.3721–3728. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12890756.
- Fields, B.N. et al., 2001. Fields Virology. *Antiviral Therapy*, 2(August), p.3177.
- Fonseca, G.J. et al., 2012. Adenovirus evasion of interferon-mediated innate immunity by direct antagonism of a cellular histone posttranslational modification. *Cell Host and Microbe*, 11(6), pp.597–606.
- Friberg, J. et al., 1999. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature*, 402(6764), pp.889–894. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v402/n6764/abs/402889a0.html>.
- Friedman-Kien, A.E. & Saltzman, B.R., 1990. Clinical manifestations of classical, endemic African, and epidemic AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Journal Of The American Academy Of Dermatology*, 22(6 Pt 2), pp.1237–1250. Available at: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&AN=2193952&site=ehost-live>.
- Gamou, T. et al., 1998. The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8(ETO) family. *Blood*, 91(11), pp.4028–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9596646>.
- Ganem, D., 2007. KSHV-induced oncogenesis. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21348069>.
- Garber, A.C., Hu, J. & Renne, R., 2002. Latency-associated Nuclear Antigen (LANA) Cooperatively Binds to Two Sites within the Terminal Repeat, and Both Sites Contribute to the Ability of LANA to Suppress Transcription and to Facilitate DNA Replication. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), pp.27401–27411. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015325> [Accessed January 10, 2017].

- Geddes, M. et al., 1994. Kaposi's sarcoma in Italy before and after the AIDS epidemic. *Br. J. Cancer*, 69, pp.333–336.
- Ghosh Roy, S., Robertson, E.S. & Saha, A., 2016. Epigenetic Impact on EBV Associated B-Cell Lymphomagenesis. *Biomolecules*, 6(4). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27886133> [Accessed July 1, 2017].
- Gilden, D.H. et al., 1983. Varicella-zoster virus DNA in human sensory ganglia. *Nature*, 306(5942), pp.478–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6316159>.
- Gill, J. et al., 2002. Prospective study of the effects of antiretroviral therapy on Kaposi sarcoma--associated herpesvirus infection in patients with and without Kaposi sarcoma. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 31(4), pp.384–390.
- Glaser, S. et al., 2006. Multiple epigenetic maintenance factors implicated by the loss of Mll2 in mouse development. *Development (Cambridge, England)*, 133(8), pp.1423–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540515>.
- Godden-Kent, D. et al., 1997. The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. *Journal of virology*, 71(6), pp.4193–4198.
- Godfrey, A. et al., 2005. Inhibiting primary effusion lymphoma by lentiviral vectors encoding short hairpin RNA. *Blood*, 105(6), pp.2510–2518.
- Goo, Y.H. et al., 2003. Activating signal cointegrator 2 belongs to a novel steady-state complex that contains a subset of trithorax group proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), pp.140–149. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC140670/pdf/0920.pdf>.
- Gradoville, L. et al., 2000. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50/Rta protein activates the entire viral lytic cycle in the HH-B2 primary effusion lymphoma cell line. *Journal of virology*, 74(13), pp.6207–6212.
- Gray, K.S., Forrest, J.C. & Speck, S.H., 2010. The de novo methyltransferases DNMT3a and DNMT3b target the murine gammaherpesvirus immediate-early gene 50 promoter during establishment of latency. *Journal of virology*, 84(10), pp.4946–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200245> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2863815>.
- Grulich, A.E., Beral, V. & Swerdlow, A.J., 1992. Kaposi's Sarcoma in England and Wales before the AIDS epidemic. *British Journal of Cancer*, 66(6), pp.1135–1137. Available at: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L23006156>.
- Grundhoff, A. & Ganem, D., 2003. The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus permits replication of terminal repeat-containing plasmids. *Journal of virology*, 77(4), pp.2779–83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=141125&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Guasparri, I., Keller, S. a & Cesarman, E., 2004. KSHV vFLIP is essential for the survival of infected lymphoma cells. *The Journal of experimental medicine*, 199(7), pp.993–1003.
- Günther, T. et al., 2014. Influence of ND10 Components on Epigenetic Determinants of Early KSHV Latency Establishment. *PLoS Pathogens*, 10(7).
- Günther, T. et al., 2016. Investigation of Viral and Host Chromatin by ChIP-PCR or ChIP-Seq Analysis. In *Current Protocols in Microbiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 1E.10.1-1E.10.21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26855283> [Accessed January 4, 2017].
- Günther, T. & Grundhoff, A., 2010. The epigenetic landscape of latent kaposi sarcoma-associated herpesvirus genomes. *PLoS Pathogens*, 6(6).

- Gwack, Y. et al., 2002. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50 stimulates the transcriptional activity of STAT3. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), pp.6438–6442.
- Hahn, A. et al., 2012. The Ephrin Receptor Tyrosine Kinase A2 is a Cellular Receptor for Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Nature medicine*, 18(6), pp.961–966. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3645317/> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3645317/pdf/nihms448950.pdf>.
- Hamamoto, R. et al., 2004. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nature cell biology*, 6(8), pp.731–740.
- Hamon, M.A. & Cossart, P., 2008. Histone Modifications and Chromatin Remodeling during Bacterial Infections. *Cell Host & Microbe*, 4(2), pp.100–109. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193131280800228X> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193131280800228X/pdf?md5=97748f73cdc4dd1ba5afbc73dcf380f1&pid=1-s2.0-S193131280800228X-main.pdf>.
- Hartsough, M.T. & Steeg, P.S., 2000. Nm23/nucleoside diphosphate kinase in human cancers. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 32(3), pp.301–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11768314>.
- Henikoff, S. & Shilatifard, A., 2011. Histone modification: Cause or cog? *Trends in Genetics*, 27(10), pp.389–396.
- Herndier, B. & Ganem, D., 2001. The biology of Kaposi's sarcoma. *Cancer treatment and research*, 104, pp.89–126. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11191137> [Accessed January 17, 2017].
- Herndier, B.G. et al., 1994. Characterization of a human Kaposi's sarcoma cell line that induces angiogenic tumors in animals. *AIDS*, 8(5), pp.575–582. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002030-199405000-00002>.
- Hess, J., Angel, P. & Schorpp-Kistner, M., 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of cell science*, 117(Pt 25), pp.5965–5973.
- Hjalgrim, H. et al., 1996. Epidemiology of Kaposi's sarcoma in the Nordic countries before the AIDS epidemic. *British journal of cancer*, 74(9), pp.1499–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8912552> [Accessed January 18, 2017].
- Hu, J. et al., 2014. LANA Binds to Multiple Active Viral and Cellular Promoters and Associates with the H3K4Methyltransferase hSET1 Complex. *PLoS Pathogens*, 10(7).
- Hu, J., Garber, A.C. & Renne, R., 2002. The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus supports latent DNA replication in dividing cells. *Journal of virology*, 76(22), pp.11677–87. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=136756&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hughes, C.M. et al., 2004. Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the Hoxc8 locus. *Molecular Cell*, 13(4), pp.587–597.
- Hyman, R., Ecker, J. & Tenser, R., 1983. Varicella-Zoster Virus RNA in Human Trigeminal Ganglia. *The Lancet*, 322(8354), pp.814–816. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673683907365>.
- Inoue, N. et al., 2003. Characterization of entry mechanisms of human herpesvirus 8 by using an Rta-dependent reporter cell line. *Journal of virology*, 77(14), pp.8147–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=161930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Iscovich, J. et al., 2000. Classic kaposi sarcoma: epidemiology and risk factors. *Cancer*, 88(3), pp.500–517. Available at:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10649240.
- Iwase, S. et al., 2007. The X-Linked Mental Retardation Gene SMCX/JARID1C Defines a Family of Histone H3 Lysine 4 Demethylases. *Cell*, 128(6), pp.1077–1088.
- Kaleeba, J.A.R. & Berger, E.A., 2006. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus fusion-entry receptor: cystine transporter xCT. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5769), pp.1921–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16574866> <http://www.sciencemag.org/content/311/5769/1921.abstract>.
- Kaposi, 1872. Idiopathisches multiples Pigmentsarkom der Haut. *Archiv für Dermatologie und Syphilis*, 4(2), pp.265–273. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF01830024> [Accessed January 4, 2017].
- Kim, E. et al., 1996. Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron*, 17(1), pp.103–113.
- Komanduri, K. V et al., 1996. The natural history and molecular heterogeneity of HIV-associated primary malignant lymphomatous effusions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 13(3), pp.215–226. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898666>.
- Krishnan HH, Naranatt PP, Smith MS, Zeng L, Bloomer C, C.B., 2004. Concurrent Latent and Lytic KSHV Gene Expression. *J. Virol.* Available at: <http://jvi.asm.org/content/78/7/3601.long>.
- Kumar, B. & Chandran, B., 2016. KSHV entry and trafficking in target cells??? Hijacking of cell signal pathways, actin and membrane dynamics. *Viruses*, 8(11).
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Laguette, N. et al., 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*, 474(7353), pp.654–657. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature10117>.
- Lagunoff, M. & Ganem, D., 1997. The structure and coding organization of the genomic termini of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology*, 236(1), pp.147–154.
- Lan, K. et al., 2005. Induction of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen by the lytic transactivator RTA: a novel mechanism for establishment of latency. *Journal of virology*, 79(12), pp.7453–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1143691&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Langmead, B., Trapnell, C. & Pop, M., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10(3), p.R25.
- Lebbe, C. et al., 1998. Clinical and biological impact of antiretroviral therapy with protease inhibitors on HIV-related Kaposi's sarcoma. *AIDS (London, England)*, 12(7), pp.F45-9.
- Lee, M.G. et al., 2007. Physical and Functional Association of a Trimethyl H3K4 Demethylase and Ring6a/MBLR, a Polycomb-like Protein. *Cell*, 128(5), pp.877–887.
- Li, T. et al., 2014. Identification of epithelial stromal interaction 1 as a novel effector downstream of Krüppel-like factor 8 in breast cancer invasion and metastasis. *Oncogene*, 33(39), pp.4746–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24096480>.
- Liang, Y. et al., 2002. The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-J?? (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes and Development*, 16(15), pp.1977–1989.
- Liang, Y. & Ganem, D., 2003. Lytic but not latent infection by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus requires host CSL protein, the mediator of Notch signaling. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), pp.8490–5. Available at: <http://www.pnas.org/content/100/14/8490.full>.
- Lim, C. et al., 2002. Functional dissection of latency-associated nuclear antigen 1 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus involved in latent DNA replication and transcription of terminal repeats of the viral genome. *Journal of virology*, 76(20), pp.10320–10331.
- Lim, C. et al., 2000. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) binds ATF4/CREB2 and inhibits its transcriptional activation activity. *Journal of General Virology*, 81(11), pp.2645–2652.
- Lin, C.L. et al., 2003. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lytic Origin (ori-Lyt)-Dependent DNA Replication: Identification of the ori-Lyt and Association of K8 bZip Protein with the Origin. *Journal of Virology*, 77(10), pp.5578–5588. Available at: <http://jvi.asm.org/content/77/10/5578.short>.
- Liu, H. et al., 2002. Maximal induction of a subset of interferon target genes requires the chromatin-remodeling activity of the BAF complex. *Molecular and cellular biology*, 22(18), pp.6471–6479.
- Liu, L. et al., 2002. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the I κ B kinase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), pp.13745–13751.
- Lu, F. et al., 2003. Chromatin remodeling of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50 promoter correlates with reactivation from latency. *J Virol*, 77(21), pp.11425–11435. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557628>.
- Lu, K. et al., 2010. Structural characterization of formaldehyde-induced cross-links between amino acids and deoxynucleosides and their oligomers. *Journal of the American Chemical Society*, 132(10), pp.3388–3399.
- Luger, K. et al., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), pp.251–260.
- Lukac, D.M. et al., 2001. DNA binding by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein is necessary for transcriptional activation of two viral delayed early promoters. *Journal of virology*, 75(15), pp.6786–99. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=114405&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lukac, D.M. et al., 1998. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology*, 252(2), pp.304–12. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682298994867>.
- Lukac, D.M., Kirshner, J.R. & Ganem, D., 1999. Transcriptional Activation by the Product of Open Reading Frame 50 of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Is Required for Lytic Viral Reactivation in B Cells. *Journal of Virology*, 73(11), pp.9348–9361.
- Luna, R.E. et al., 2004. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus glycoprotein K8.1 is dispensable for virus entry. *J Virol*, 78(12), pp.6389–6398.
- Luppi, M. et al., 2000. Bone marrow failure associated with human herpesvirus 8 infection after transplantation. *The New England journal of medicine*, 343(19), pp.1378–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11070102>.
- Magrath, I.T. et al., 1980. Characterization of lymphoma-derived cell lines: comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen. II. Surface markers. *Journal of the National Cancer Institute*, 64(3), pp.477–483.
- Margaritis, T. et al., 2012. Two Distinct Repressive Mechanisms for Histone 3 Lysine 4 Methylation through Promoting 3'-End Antisense Transcription. *PLoS Genetics*, 8(9).

- Margueron, R. et al., 2008. Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms. *Molecular Cell*, 32(4), pp.503–518.
- Margueron, R. & Reinberg, D., 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330), pp.343–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3760771&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Marsh, M. & Helenius, A., 2006. Virus entry: Open sesame. *Cell*, 124(4), pp.729–740.
- Martin, D. & Gutkind, J.S., 2008. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene*, 27 Suppl 2(S2), pp.S31–S42. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.351>.
- Matta, H. et al., 2003. Molecular genetic analysis of human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein-induced NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry*, 278(52), pp.52406–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561765>.
- McGeoch, D.J. et al., 1995. Molecular Phylogeny and Evolutionary Timescale for the Family of Mammalian Herpesviruses. *Journal of Molecular Biology*, 247(3), pp.443–458.
- Mikkelsen, T.S. et al., 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448(7153), pp.553–560.
- Misiewicz-Krzeminska, I. et al., 2016. Post-transcriptional modifications contribute to the upregulation of cyclin D2 in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 22(1), pp.207–217.
- Molden, J. et al., 1997. A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), pp.19625–19631.
- Naranatt, P.P. et al., 2003. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC-zeta-MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: implications for infectivity. *Journal of virology*, 77(2), pp.1524–1539.
- Naranatt, P.P. et al., 2005. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus modulates microtubule dynamics via RhoA-GTP-diaphanous 2 signaling and utilizes the dynein motors to deliver its DNA to the nucleus. *Journal of virology*, 79(2), pp.1191–206. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613346><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC538527>.
- Nealon, K. et al., 2001. Lytic replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus results in the formation of multiple capsid species: isolation and molecular characterization of A, B, and C capsids from a gammaherpesvirus. *Journal of virology*, 75(6), pp.2866–78. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=115913&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nelson, J.D., Denisenko, O. & Bomsztyk, K., 2006. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nature protocols*, 1(1), pp.179–185.
- Ng, H.H. et al., 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Molecular Cell*, 11(3), pp.709–719.
- Nielsen, H.L. et al., 2002. Identification of EPSTI1, a novel gene induced by epithelial-stromal interaction in human breast cancer. *Genomics*, 79(5), pp.703–710.
- O'Carroll, D. et al., 2001. The polycomb-group gene Ezh2 is required for early mouse development. *Molecular and Cellular Biology*, 21(13), pp.4330–4336. Available at: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.21.13.4330-4336.2001><http://pubmedcentral.nih.gov/publication/doi/10.1128/MCB.21.13.4330-4336.2001>.
- Oliveros, J.C., 2007. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. *BioinfoGP of CNB-CSIC*, p.<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.ht>. Available at:

- <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Olsen, S.J. et al., 1998. Increasing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus seroprevalence with age in a highly Kaposi's sarcoma endemic region, Zambia in 1985. *AIDS (London, England)*, 12(14), pp.1921–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792393>.
- Osborne, J., Moore, P.S. & Chang, Y., 1999. KSHV-encoded viral IL-6 activates multiple human IL-6 signaling pathways. *Human Immunology*, 60(10), pp.921–927.
- Pan, G. et al., 2007. Whole-Genome Analysis of Histone H3 Lysine 4 and Lysine 27 Methylation in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 1(3), pp.299–312.
- Pantry, S.N. & Medveczky, P.G., 2009. Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication. *Seminars in Cancer Biology*, 19(3), pp.153–157.
- Parravicini, C. et al., 2000. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *The American journal of pathology*, 156(3), pp.743–9. Available at: <http://ajp.amjpathol.org/article/S0002944010649401/fulltext>.
- Paschos, K. et al., 2009. Epstein-Barr virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpG methylation of the tumour suppressor gene Bim. *PLoS Pathogens*, 5(6).
- Pasini, D. et al., 2004. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *The EMBO Journal*, 23(20), pp.4061–4071. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7600402>.
- Penn, I., 1979. Kaposi's sarcoma in organ transplant recipients: report of 20 cases. *Transplantation*, 27(1), pp.8–11. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=442191.
- Pertel, P.E., 2002. Human herpesvirus 8 glycoprotein B (gB), gH, and gL can mediate cell fusion. *Journal of virology*, 76(9), pp.4390–4400. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=155071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Picchio, G.R. et al., 1997. The KSHV/HHV8-infected BCBL-1 lymphoma line causes tumors in SCID mice but fails to transmit virus to a human peripheral blood mononuclear cell graft. *Virology*, 238(1), pp.22–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9375005>.
- Pirot, T. et al., 2001. Close but distinct regions of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen 1 are responsible for nuclear targeting and binding to human mitotic chromosomes. *J Virol*, 75(8), pp.3948–3959. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11264383.
- Portela, A. & Esteller, M., 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, 28(10), pp.1057–1068. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944598%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/nbt.1685>.
- Purushothaman, P., Uppal, T. & Verma, S.C., 2015. Molecular biology of KSHV lytic reactivation. *Viruses*, 7(1), pp.116–153.
- Qiao, Y. et al., 2013. Synergistic Activation of Inflammatory Cytokine Genes by Interferon- γ -Induced Chromatin Remodeling and Toll-like Receptor Signaling. *Immunity*, 39(3), pp.454–469. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761313003373>.
- Quinlan, A.R. & Hall, I.M., 2010. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), pp.841–842.
- R Development Core Team, 2013. R Software. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.

- Radkov, S. a, Kellam, P. & Boshoff, C., 2000. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nature medicine*, 6(10), pp.1121–1127.
- Raghu, H. et al., 2009. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells. *Journal of virology*, 83(10), pp.4895–911. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2682094&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ramirez-Carrozzi, V.R. et al., 2006. Selective and antagonistic functions of SWI/SNF and Mi-2 β nucleosome remodeling complexes during an inflammatory response. *Genes and Development*, 20(3), pp.282–296.
- Rappocciolo, G. et al., 2008. Human herpesvirus 8 infects and replicates in primary cultures of activated B lymphocytes through DC-SIGN. *Journal of virology*, 82(10), pp.4793–806. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2346758&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Renne, R., Zhong, W., et al., 1996. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med*, 2(3), pp.342–346. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8612236>.
- Renne, R., Lagunoff, M., et al., 1996. The Size and Conformation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) DNA in Infected Cells and Virions. *Journal of Virology*, 70(11), pp.8151–8154.
- Rieckmann, P., Tuscano, J.M. & Kehrl, J.H., 1997. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) in B-lymphocyte function. *Methods (San Diego, Calif.)*, 11(1), pp.128–32. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202396903965>.
- Rivas, C. et al., 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. *Journal of virology*, 75(1), pp.429–38. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=113935&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- RStudio, 2012. RStudio: Integrated development environment for R. *The Journal of Wildlife Management*, 75(8). Available at: <http://www.rstudio.org>.
- Russo, J.J. et al., 1996. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), pp.14862–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=26227&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ruthenburg, A.J., Allis, C.D. & Wysocka, J., 2007. Methylation of Lysine 4 on Histone H3: Intricacy of Writing and Reading a Single Epigenetic Mark. *Molecular Cell*, 25(1), pp.15–30.
- Sadler, R. et al., 1999. A complex translational program generates multiple novel proteins from the latently expressed kaposin (K12) locus of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology*, 73(7), pp.5722–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=112632&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sakakibara, S. et al., 2001. Octamer-binding sequence is a key element for the autoregulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50/Lyta gene expression. *J Virol*, 75(15), pp.6894–6900. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11435569.
- Samols, M.A. et al., 2005. Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology*, 79(14),

- pp.9301–5. Available at: <http://jvi.asm.org/content/79/14/9301.short>.
- Santos-Rosa, H. et al., 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419(6905), pp.407–411.
- Sathish, N., Wang, X. & Yuan, Y., 2012. Tegument Proteins of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and Related Gamma-Herpesviruses. *Frontiers in microbiology*, 3, p.98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22435068> [Accessed January 5, 2017].
- Schneider, R. et al., 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature Cell Biology*, 6(1), pp.73–77.
- Schwam, D.R. et al., 2000. Carboxy terminus of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen mediates dimerization, transcriptional repression, and targeting to nuclear bodies. *Journal of virology*, 74(18), pp.8532–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=116365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sewalt, R.G. et al., 1998. Characterization of interactions between the mammalian polycomb-group proteins Enx1/EZH2 and EED suggests the existence of different mammalian polycomb-group protein complexes. *Molecular and cellular biology*, 18(6), pp.3586–3595.
- Sharma-Walia, N. et al., 2004. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus/Human Herpesvirus 8 Envelope Glycoprotein gB Induces the Integrin-Dependent Focal Adhesion Kinase-Src-Phosphatidylinositol 3-Kinase-Rho GTPase Signal Pathways and Cytoskeletal Rearrangements. *Journal of Virology*, 78(8), pp.4207–4223. Available at: <http://jvi.asm.org/content/78/8/4207.long>.
- Shehata, M. et al., 2008. Nonredundant functions for tumor protein D52-like proteins support specific targeting of TPD52. *Clinical Cancer Research*, 14(16), pp.5050–5060.
- Shen, L. et al., 2013. diffReps: Detecting Differential Chromatin Modification Sites from ChIP-seq Data with Biological Replicates. *PLoS ONE*, 8(6).
- Skalska, L. et al., 2010. Epigenetic repression of p16INK4A by latent epstein-barr virus requires the interaction of EBNA3A and EBNA3C with CtBP. *PLoS Pathogens*, 6(6).
- Soulier, J. et al., 1995. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood*, 86(4), pp.1276–80. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/86/4/1276.abstract>.
- Stürzl, M. et al., 1997. Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classical and African Kaposi's sarcoma. *International Journal of Cancer*, 72(1), pp.68–71.
- Sun, Q., Matta, H. & Chaudhary, P.M., 2003. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein protects against growth factor withdrawal-induced apoptosis via NF- κ B activation. *Blood*, 101(5), pp.1956–1961.
- Sun, R. et al., 1998. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Medical Sciences*, 95, pp.10866–10871.
- Sun, R. et al., 1996. Polyadenylated nuclear RNA encoded by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), pp.11883–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8876232> [Accessed January 5, 2017].
- Swanton, C. et al., 1997. Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature*, 390(6656), pp.184–7.
- Tang, S., Yamanegi, K. & Zheng, Z.-M., 2004. Requirement of a 12-base-pair TATT-containing sequence and viral lytic DNA replication in activation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K8.1 late promoter. *Journal of virology*, 78(5), pp.2609–2614.

- Tao, Q. et al., 1999. Methylation status of the Epstein-Barr virus major latent promoter C in iatrogenic B cell lymphoproliferative disease. Application of PCR-based analysis. *The American journal of pathology*, 155(2), pp.619–25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1866850&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tarhini, A.A. et al., 2014. A four-marker signature of TNF-RII, TGF- α , TIMP-1 and CRP is prognostic of worse survival in high-risk surgically resected melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), p.19. Available at: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-12-19>.
- Tavares, L. et al., 2012. RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell*, 148(4), pp.664–678.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T. & Mesirov, J.P., 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), pp.178–192.
- Toth, Z. et al., 2010. Epigenetic analysis of KSHV latent and lytic genomes. *PLoS Pathogens*, 6(7), pp.1–17.
- Toth, Z., Brulois, K. & Jung, J.U., 2013. The chromatin landscape of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Viruses*, 5(5), pp.1346–1373.
- Trus, B.L. et al., 2001. Capsid structure of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, a gammaherpesvirus, compared to those of an alphaherpesvirus, herpes simplex virus type 1, and a betaherpesvirus, cytomegalovirus. *J Virol.*, 75(0022–538X (Print)), pp.2879–2890.
- Uppal, T. et al., 2014. KSHV LANA--the master regulator of KSHV latency. *Viruses*, 6(12), pp.4961–4998.
- Veettil, M. V. et al., 2008. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Forms a Multimolecular Complex of Integrins (V5, V3, and 31) and CD98-xCT during Infection of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells, and CD98-xCT Is Essential for the Postentry Stage of Infection. *Journal of Virology*, 82(24), pp.12126–12144. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18829766> [Accessed January 6, 2017].
- Veettil, M.V. et al., 2006. RhoA-GTPase facilitates entry of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus into adherent target cells in a Src-dependent manner. *Journal of virology*, 80(23), pp.11432–46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1642608&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Verma, S.C., Choudhuri, T. & Robertson, E.S., 2007. The minimal replicator element of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus terminal repeat supports replication in a semiconservative and cell-cycle-dependent manner. *Journal of virology*, 81(7), pp.3402–13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1866078&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wang, F.-Z. et al., 2003. Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein B mediates cell adhesion via its RGD sequence. *Journal of virology*, 77(5), pp.3131–47. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=149745&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wang, H. et al., 2001. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Molecular Cell*, 8(6), pp.1207–1217.
- Wang, J. et al., 2013. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic acids research*, 41(Web Server issue).
- Wang, L. et al., 2016. The silencing of CCND2 by promoter aberrant methylation in renal cell cancer and analysis of the correlation between CCND2 methylation status and clinical features. *PLoS ONE*, 11(9).

- Weninger, W. et al., 1999. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 79(2), pp.243–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068212>.
- Woellmer, A. & Hammerschmidt, W., 2013. Epstein-Barr virus and host cell methylation: Regulation of latency, replication and virus reactivation. *Current Opinion in Virology*, 3(3), pp.260–265.
- Wu, L. et al., 2000. Three-Dimensional Structure of the Human Herpesvirus 8 Capsid. *Journal of Virology*, 74(20), pp.9646–9654. Available at: <http://jvi.asm.org/content/74/20/9646.full>.
- Wysocka, J. et al., 2003. Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes and Development*, 17(7), pp.896–911.
- Wysocka, J. et al., 2005. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell*, 121(6), pp.859–872.
- Yamamoto, M. et al., 2011. Rare and frequent promoter methylation, respectively, of TSHZ2 and 3 genes that are both downregulated in expression in breast and prostate cancers. *PLoS ONE*, 6(3).
- Yoo, K.H. & Hennighausen, L., 2011. EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 8(1), pp.59–65.
- Youngster, I. et al., 2006. An unusual cause of pleural effusion. *Age and Ageing*, 35(1), pp.94–96.
- Yu, G., Wang, L.G. & He, Q.Y., 2015. ChIP seeker: An R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics*, 31(14), pp.2382–2383.
- Zeev-Ben-Mordehai, T., Hagen, C. & Grünewald, K., 2014. A cool hybrid approach to the herpesvirus "life" cycle. *Current Opinion in Virology*, 5(1), pp.42–49.
- Zhang, B., Kirov, S. & Snoddy, J., 2005. WebGestalt: An integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2).
- Zhong, W. et al., 1996. Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), pp.6641–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zhong, W. & Ganem, D., 1997. Characterization of ribonucleoprotein complexes containing an abundant polyadenylated nuclear RNA encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *Journal of Virology*, 71(2), pp.1207–1212. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8995643.
- Zhu, F.X. et al., 2005. Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology*, 79(2), pp.800–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613308%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC538588>.
- Zubakov, D., Stupar, Z. & Kovacs, G., 2006. Differential expression of a new isoform of DLG2 in renal oncocyoma. *BMC Cancer*, 6.

10 Anhang

Auf Grund des Umfangs wurden die Listen der Gene mit differentieller Transkription in HDF-Zellen für die einzelnen Zeitpunkte nicht abgebildet. Die Liste der Gene, welche zu allen drei Zeitpunkten nach Infektion eine differentielle Transkription aufwiesen ist in Tabelle 10-1 aufgeführt.

Tabelle 10-1: Gene mit signifikant differentieller Transkription über alle drei untersuchten Zeitpunkte in infizierten HDF-Zellen gegenüber nicht-infizierten HDF-Zellen.

Als Grenzwerte wurden $\log_2FC = 0,5/-0,5$ und $p\text{-value} = 0,05$ verwendet.

Gen-Name	2 d.p.i.		7 d.p.i.		14 d.p.i.	
	log ₂ FC	pvalue	log ₂ FC	pvalue	log ₂ FC	pvalue
CCND2	0,90	0,0314	1,26	0,0022	0,95	0,0207
CXCL10	0,94	0,0333	1,57	0,0004	1,10	0,0133
CXCL11	1,00	0,0223	1,48	0,0007	0,91	0,0373
DCAF12L2	1,06	0,0202	0,95	0,0377	1,33	0,0038
EPSTI1	0,70	0,0233	1,24	0,0001	0,76	0,0138
HERC5	0,80	0,0142	1,18	0,0003	0,66	0,0400
HERC6	0,83	0,0057	1,37	0,0000	0,82	0,0062
HIST1H1C	1,31	0,0001	1,04	0,0015	0,68	0,0376
IFI6	1,10	0,0127	2,00	0,0000	1,38	0,0018
IFI44	0,73	0,0133	1,40	0,0000	0,59	0,0428
IFI44L	1,07	0,0068	2,51	0,0000	1,75	0,0000
IFIT1	1,66	0,0000	1,46	0,0000	0,90	0,0100
IFITM1	1,40	0,0002	0,95	0,0104	0,94	0,0116
ISG15	1,60	0,0000	1,28	0,0005	0,79	0,0304
LEP	2,80	0,0000	1,98	0,0000	1,48	0,0002
LOC645638	1,39	0,0000	0,61	0,0362	0,78	0,0113
MX1	1,75	0,0001	1,37	0,0017	1,20	0,0061
MX2	1,89	0,0000	1,26	0,0001	0,93	0,0040
NAP1L2	1,32	0,0016	2,27	0,0000	1,72	0,0000
OAS1	1,47	0,0013	1,46	0,0014	1,00	0,0280
OAS2	0,94	0,0046	1,39	0,0000	0,83	0,0132
OASL	2,31	0,0000	1,77	0,0001	1,03	0,0265
PCDHA10	0,96	0,0391	1,40	0,0025	1,33	0,0041
PCDHB16	1,63	0,0000	1,00	0,0041	0,85	0,0140
PCDHB8	1,12	0,0025	1,31	0,0000	0,94	0,0011
PEG3	1,29	0,0000	1,54	0,0000	1,25	0,0000
PTPRN2	0,81	0,0202	0,79	0,0233	0,72	0,0376
RSAD2	2,06	0,0000	1,86	0,0001	1,29	0,0053
TGFA	1,32	0,0000	1,87	0,0000	0,94	0,0082
ZNF560	0,81	0,0252	1,11	0,0021	1,04	0,0046

Tabelle 10-2: Genassoziierte Fenster mit signifikant differentieller H3K4me3-Besetzung in infizierten HDF-Zellen 2 d.p.i. nach Analyse mit diffReps.

Als Grenzwert wurde ein $\log_2FC = 0,25/-0,25$ verwendet.

Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue
ACAD8	0,53	0,0003	GEM	-0,49	0,0000	REV3L	0,56	0,0000
ACVR1	0,62	0,0000	GLCCI1	0,69	0,0000	RHOB	-0,67	0,0000
ADAM23	0,66	0,0001	GPSM2	0,26	0,1831	RPRD2	-0,35	0,0000
AFF4	0,3	0,0000	HCFC2	-0,48	0,0000	RPS25	0,33	0,0000
ALPK2	0,54	0,0001	HERC4	0,33	0,2106	RRAGD	0,6	0,0000
ANXA7	-0,31	0,0000	IPO11	0,67	0,0000	RRBP1	0,61	0,0000
ARHGEF11	0,58	0,0000	ITGA5	0,36	0,0000	RUFY3	0,53	0,0001
ARPC2	0,34	0,0000	JARID2	0,41	0,0007	S100A6	-0,69	0,0729
ATP11A	0,44	0,0000	KCNK2	1,09	0,0000	SGOL1	0,42	0,0000
BBC3	0,67	0,0000	KDM5B	0,29	0,0000	SLC12A2	0,58	0,0000
BCL2L11	0,61	0,0001	KIF2A	0,52	0,0002	SLC35B4	0,51	0,0000
BZW2	0,6	0,0000	LGALS1	-0,53	0,0000	SRFBP1	-0,38	0,0000
C2Oorf177	0,78	0,0000	LMNA	-0,54	0,0000	SRP19	0,53	0,0001
C3orf58	0,57	0,0000	LNP1	0,52	0,0000	STC2	0,52	0,0000
CCT6P1	0,35	0,0000	LOC100506451	0,51	0,0000	SUGT1	0,33	0,0000
CDC42EP3	0,27	0,0000	LOX	0,29	0,0000	SVEP1	0,68	0,0000
CDC42SE2	0,35	0,0000	LRRFIP2	0,28	0,8043	TBCD	0,6	0,0001
CHCHD6	0,63	0,0001	LUM	-1,36	0,0000	TIMP3	-0,61	0,0000
CHD1L	0,59	0,0000	MIR143HG	-0,59	0,0000	TLE4	0,29	0,0000
CHD6	0,7	0,0000	MIR193A	-0,53	0,0000	TMSB10	-0,74	0,0000
COX18	-0,84	0,0000	MIS18BP1	-0,42	0,0000	TPRG1L	0,55	0,0000
CPEB2	0,4	0,0820	MRPL47	0,37	0,0000	TRIB1	0,87	0,0000
CRIM1	0,27	0,0001	MYL6	-0,85	0,0000	TRIO	0,31	0,0215
CRYZ	0,32	0,0155	NACA	-0,59	0,0001	TSC1	-0,27	0,0001
CTBP2	0,51	0,0000	NBPF1	0,28	0,0000	TXNRD1	0,8	0,0000
CYP20A1	0,64	0,0000	NDRG1	0,26	0,0000	UBR3	0,65	0,0000
CYR61	-0,35	0,0059	NUCKS1	0,3	0,0001	UBXN2A	0,7	0,0000
DNAJB14	0,55	0,0000	PARD3	0,64	0,0000	UCK2	0,59	0,0000
DSP	0,3	0,0000	PCNX	0,39	0,0000	VGLL3	0,7	0,0000
DYNC2H1	-0,36	0,0309	PDCD4	0,75	0,0000	XKR6	0,88	0,0000
EIF4A2	0,43	0,0000	PFKFB3	0,72	0,0000	YAE1D1	-0,52	0,0000
EIF6	-0,48	0,0001	PHF23	0,35	0,0001	YAF2	0,5	0,0000
ENPP2	-0,67	0,0000	PNRC1	0,51	0,0004	YEATS2	0,36	0,0000
EPC2	0,55	0,0000	PPFIBP2	0,54	0,0000	ZEB2	-1,12	0,0000
FAM36A	0,6	0,0000	PPP3R1	0,49	0,0001	ZEB2	0,54	0,0001
FANCI	-0,3	0,0000	PRPF40B	0,65	0,0001	ZNF485	0,66	0,0000
FGF2	0,82	0,0000	PYGO1	0,51	0,0000	ZNF592	0,78	0,0000
FLJ43663	0,69	0,0000	RCOR1	0,59	0,0001	ZNF655	-0,29	0,0000
FN1	-0,27	0,0000						

Tabelle 10-3: Genassoziierte Fenster mit signifikant differentieller H3K4me3-Besetzung in infizierten HDF-Zellen 7 d.p.i. nach Analyse mit diffReps.

Als Grenzwert wurde ein $\log_2FC = 0,25/-0,25$ verwendet.

Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	Pvalue
ABHD2	0,29	0,0000	GLIPR1	0,72	0,0000	PITX3	-0,5	0,0000
ACOX3	-0,37	0,0000	GMPR	0,28	0,0000	PKIG	0,3	0,0000
ADCY5	-0,83	0,0000	GPANK1	-0,55	0,0001	PLEKHM2	-0,27	0,0412
ALPK2	0,85	0,0000	GPRIN3	-0,53	0,0001	PODXL	0,78	0,0001
ANK2	-0,6	0,0000	HNRNPF	-0,51	0,0000	PPP1R12A	0,32	0,0006
ANKRD13A	0,26	0,0000	HSPB3	0,61	0,0001	PTGS2	-0,39	0,0000
ARPC1B	-0,28	0,0359	HSPE1	0,47	0,0000	PTPRU	-0,59	0,0000
ASH2L	0,28	0,0000	IFT52	0,26	0,0550	RASSF1	0,3	0,0000
B4GALT5	-0,33	0,0136	IPO7	0,32	0,0000	RBM14	0,29	0,0000
BCL2L11	-0,46	0,0000	ISG15	0,47	0,0000	RCC2	-0,27	0,0000
BMP2	-0,66	0,0000	ITGA3	0,6	0,0000	RGMA	-0,5	0,0000
BMS1	0,29	0,0000	ITPR3	0,45	0,0003	ROR2	-0,38	0,0008
C13orf33	-0,79	0,0000	JUNB	-0,26	0,2706	RPP14	0,27	0,0000
C1S	-0,72	0,0001	KCNK2	0,53	0,0000	SCFD2	0,29	0,0000
C5orf30	0,72	0,0000	KIAA1530	-0,35	0,0000	SLC1A2	-0,5	0,0000
C7orf63	0,31	0,0000	KIF11	0,56	0,0000	SLC25A29	-0,27	0,0317
CCDC85B	-0,63	0,0000	KLF6	0,32	0,0000	SLC27A3	-0,39	0,0000
CENPH	0,3	0,0759	LDB2	-0,73	0,0000	SLC35E4	0,31	0,0034
CENPL	0,34	0,0000	LHFP	0,26	0,0184	SLC41A3	-0,39	0,0000
CEP135	0,3	0,0000	LHFPL2	0,94	0,0000	SOCS3	-0,58	0,0000
CKAP2L	0,27	0,0000	LMNB1	-0,34	0,0000	SOX4	-0,26	0,0092
CLN8	-0,45	0,0000	LMO4	-0,27	0,0000	SPIRE1	0,29	0,0000
COPE	0,28	0,0000	LOC283335	-0,55	0,0049	SPRY2	0,45	0,0000
CTDNBP1	-0,33	0,0000	LONRF1	-0,28	0,0048	SRXN1	0,34	0,0000
CTSK	-1,04	0,0000	LOX	0,29	0,0000	SSX2IP	0,36	0,0120
CXCL12	-0,53	0,0000	LRRC59	0,27	0,0000	STAM	0,28	0,0036
DCN	-1,34	0,0000	MAFB	-0,68	0,0000	STC1	0,3	0,0299
DCN	-0,81	0,0002	MAP3K1	0,34	0,0000	THBS1	-0,61	0,0000
DNA2	0,64	0,0000	MARCKSL1	-0,67	0,0000	TIPARP	0,69	0,0000
DUSP6	0,29	0,0000	MBLAC1	-0,33	0,0000	TMEM119	-0,53	0,0000
ENC1	0,65	0,0000	MCART1	0,32	0,0004	TNKS1BP1	-0,32	0,0000
EPSTI1	0,41	0,0028	MED28	-0,26	0,0000	TOP2A	0,68	0,0003
ERI1	0,29	0,0000	MIR100HG	0,54	0,0011	TPRA1	0,35	0,0000
ETV6	-0,34	0,0000	MPRIP	0,3	0,0000	TPX2	0,48	0,0000
EYA2	0,29	0,0000	MTSS1L	-0,28	0,0000	TSC22D2	0,27	0,0007
EYA2	0,4	0,0337	NEIL3	0,55	0,0000	TSNARE1	-0,52	0,0000
FAM120AOS	0,26	0,0000	NNMT	-0,57	0,0003	TSPAN13	0,41	0,0000
FAM20A	-0,68	0,0000	NR2F2	-0,32	0,0000	TTC3	0,33	0,0006
FAM20A	-0,35	0,0000	OAS2	0,81	0,0002	UROD	-0,3	0,0000
FAM54A	-0,26	0,0000	ODC1	-0,36	0,0001	USP33	0,26	0,0000
FANCD2	0,29	0,0000	OSR2	-0,44	0,0001	VPS37C	-0,37	0,0000
FANCM	0,35	0,0083	PAFAH1B1	-0,26	0,0000	XPOT	0,29	0,0000
FBXL14	-0,72	0,0000	PBX3	0,4	0,0000	ZNF187	-0,29	0,0868

FEM1B	0,27	0,0000	PCDH18	-0,8	0,0000	ZNF225	0,35	0,0019
FGF5	0,31	0,0000	PCNA	0,35	0,0000	ZNF276	-0,31	0,0004
FHL3	-0,33	0,0000	PDGFD	-0,6	0,0000	ZNF518A	0,26	0,0000
FLNB	0,26	0,0000	PDHB	-0,28	0,2344	ZNF569	0,26	0,0000
FMN2	0,53	0,0000	PFN2	0,57	0,0001	ZNF641	-0,28	0,0312
FOSL1	0,26	0,0000	PHLDB2	-0,27	0,0000	ZYX	0,26	0,0000
FOSL2	-0,36	0,0000						

Tabelle 10-4: Genassoziierte Fenster mit signifikant differentieller H3K4me3-Besetzung in infizierten HDF-Zellen 14 d.p.i. nach Analyse mit diffReps.

Als Grenzwert wurde ein $\log_2FC = 0,25/-0,25$ verwendet.

Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue
BAZ1B	0,45	0,0000	OBFC2A	0,43	0,0001	SNAI2	0,49	0,0000
DLG2	-0,47	0,0000	PDZRN3	0,37	0,0001	SOS1	0,47	0,0000
LINC00273	-0,32	0,0000	PLK2	0,52	0,0000	SPRED1	0,39	0,0000
MIR3687	-0,42	0,0000	ROCK1P1	-0,3	0,0000	TMEM140	0,54	0,0000
NNMT	0,56	0,0000	SLC7A8	0,45	0,0000			

Tabelle 10-5: Genassoziierte Fenster mit signifikant differentieller H3K27me3-Besetzung in infizierten HDF-Zellen 2 d.p.i. nach Analyse mit diffReps.

Als Grenzwert wurde ein $\log_2FC = 0,25/-0,25$ verwendet.

Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue
ABCB11	1,61	0,0001	EDN3	1,66	0,0001	PAIP2B	-2,09	0,0001
ADCYAP1	-1,78	0,0000	FAM182A	1,26	0,0000	PAK7	1,82	0,0000
AGBL4	2,04	0,0000	GNAS	1,47	0,0000	PAK7	1,41	0,0001
AIG1	2	0,0000	HS3ST4	1,96	0,0000	PALM2	1,5	0,0000
ANO2	1,41	0,0000	HS6ST3	-1,64	0,0001	PDE1C	-2,6	0,0000
ATP9A	1,45	0,0000	IL18R1	1,42	0,0001	PDE4D	1,24	0,0000
ATP9A	1,28	0,0000	IQCA1	1,97	0,0000	PIP5K1B	1,61	0,0000
ATP9A	1,35	0,0001	ISLR2	-1,8	0,0000	PNLIPRP3	1,91	0,0001
BANF2	1,87	0,0000	KCNC2	-2,28	0,0000	PNOC	-1,58	0,0001
BCAS1	1,64	0,0000	KCNE1	-1,48	0,0000	PRKG1	1,73	0,0000
BCAS1	1,35	0,0001	KCNQ1	1	0,0001	PTGER2	-2,15	0,0000
C20orf112	1,69	0,0000	LMX1A	-1,49	0,0001	RAB22A	1,31	0,0001
C20orf26	1,94	0,0000	LOC285000	-2,27	0,0000	RALGAPB	1,39	0,0001
CADPS	1,36	0,0016	LOC285501	1,8	0,0000	RALGAPB	1,38	0,0000
CAMK2B	-1,4	0,0001	LOC339568	1,26	0,0001	SC5DL	-1,47	0,0000
CASR	1,66	0,0000	LOC400238	-1,42	0,0001	SGCZ	-2,56	0,0000
CASS4	1,23	0,0001	MACROD2	1,58	0,0000	SLPI	1,53	0,0000
CLDN14	-1,54	0,0000	MACROD2	1,76	0,0000	ST6GALNAC3	1,46	0,0000
CLMN	2,17	0,0000	MIR3648	-0,39	0,0000	SUSD5	-1,36	0,0000
CNPY1	1	0,0000	MIR548H3	-1,76	0,0000	SVIL	-1,81	0,0000
CSDAP1	1,19	0,0001	MITF	1,69	0,0000	TH1L	1,69	0,0001
DBC1	1,56	0,0000	MLPH	-2,52	0,0000	TSHZ2	2,81	0,0000
DNAH11	1,52	0,0001	NDRG3	1,76	0,0000	TSHZ2	1,35	0,0000
DNAH8	1,74	0,0001	NFATC2	1,48	0,0002	WDR49	1,84	0,0000

DNER	1,41	0,0001	NFATC2	1,01	0,0000	YPEL4	1,51	0,0000
DRD1	1,3	0,0000	NRG1	2,07	0,0000	ZFP64	1,34	0,0000
DRD2	1,74	0,0000	NRXN3	1,51	0,0000	ZNF678	-1,93	0,0001
DSCAML1	2,21	0,0000	NTM	1,43	0,0001	ZNF883	-1,68	0,0000
DUSP4	-1,39	0,0001						

Tabelle 10-6: Genassoziierte Fenster mit signifikant differentieller H3K27me3-Besetzung in infizierten HDF-Zellen 7 d.p.i. nach Analyse mit diffReps.

Als Grenzwert wurde ein $\log_2FC = 0,25/-0,25$ verwendet.

Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue
ACCN1	1,19	0,0001	FLJ30838	1,23	0,0001	PREX1	1,7	0,0000
ACCN1	1,29	0,0001	FPR3	1,1	0,0001	PRRT4	-1,59	0,0001
ADAMTS20	1,28	0,0000	FYB	-1,69	0,0000	PRSS46	-1,82	0,0000
ADRA1A	1,34	0,0000	GALNTL4	1,33	0,0000	PTPRD	1,65	0,0000
AFAP1L2	1,44	0,0000	GCNT7	1,4	0,0000	PTPRT	1,38	0,0000
ANO2	1,32	0,0001	GIMAP8	1,34	0,0001	R3HDML	1,31	0,0000
ANO5	1,3	0,0000	GNAS-AS1	1,37	0,0000	RALGAPB	1,63	0,0000
ASB18	1,37	0,0000	GPC5	1,37	0,0000	RNASE10	1,3	0,0001
ATP9A	0,93	0,0000	GRIN2B	1,29	0,0000	RNF165	1,03	0,0001
ATP9A	1,22	0,0000	GRM1	1,65	0,0000	RRBP1	1,64	0,0000
BCAS4	1,09	0,0001	GSG1L	1,22	0,0001	RYR3	1,18	0,0001
BMP7	1,11	0,0003	HIVEP3	1,18	0,0000	RYR3	1,2	0,0001
BMP7	1,28	0,0001	HPSE2	1,38	0,0000	SALL4	1,2	0,0001
BPI	1,21	0,0000	HYDIN	0,86	0,0001	SAMHD1	1,44	0,0000
BPI	1,34	0,0000	HYDIN	1,49	0,0001	SORCS2	1,2	0,0001
BPIFA4P	1,33	0,0000	IGSF11	1,16	0,0000	SPAG6	-0,87	0,0001
C10orf67	1,35	0,0000	ILDR2	1,28	0,0000	SPTB	-2,27	0,0001
C20orf43	1,23	0,0000	IQCA1	1,31	0,0000	STK32A	-1,55	0,0000
C20orf72	1,34	0,0000	ISL1	1,13	0,0000	STK4	1,1	0,0001
C7orf72	1,34	0,0001	ITGAM	1,28	0,0001	SYBU	1,33	0,0000
CACNA1D	1,32	0,0000	JAKMIP2	1,47	0,0000	SYNDIG1	1,25	0,0001
CACNA1E	1,75	0,0000	KCNAB1	-1,62	0,0000	SYT1	1,48	0,0000
CACNA2D3	1,29	0,0001	KCNIP1	1,46	0,0000	TDRD12	1,6	0,0000
CAMTA1	1,48	0,0000	KCNQ5	1,6	0,0000	TFAP2C	1,56	0,0000
CASS4	0,93	0,0002	KIAA1239	1,58	0,0000	TFAP2D	1,26	0,0001
CCBP2	0,95	0,0001	KIF3B	1,78	0,0000	TGIF2	1,38	0,0000
CDH12	1,33	0,0001	LGR6	-2,13	0,0001	TH1L	1,26	0,0000
CEACAM5	1,33	0,0000	LHFPL3	1,57	0,0000	TMEM132D	1,74	0,0000
CHD6	1,56	0,0000	LHX1	-0,84	0,0000	TP53RK	-1,43	0,0000
CLNK	1,63	0,0000	LHX4	-0,84	0,0001	TPX2	1,18	0,0001
CLVS1	1,41	0,0000	LIN28B	-1,02	0,0001	TRIM24	-1,79	0,0000
COL14A1	1,35	0,0000	LOC253573	1,44	0,0000	TRPM3	1,05	0,0001
CRMP1	-1,61	0,0000	LOC388276	1,76	0,0000	TRPM3	1,2	0,0000
CRTAC1	1,41	0,0000	LOC399715	1,19	0,0001	TRPV5	1,28	0,0001
CSTF1	1,53	0,0000	MAPT	1,24	0,0000	TSHZ2	1,13	0,0001
CSTF1	1,68	0,0000	MIR5095	1,35	0,0001	TSHZ2	1,15	0,0000
CUX2	1,22	0,0001	MOB2	-1,57	0,0000	TSHZ2	1,22	0,0000

DAPK1	-1,18	0,0000	MYBL2	1,09	0,0001	TSHZ2	1,41	0,0000
DBX2	1,26	0,0000	MYBL2	1,19	0,0001	TSHZ2	1,46	0,0001
DEFB126	1,31	0,0000	MYO5B	-1,67	0,0000	TSHZ2	1,56	0,0000
DFNB31	-1,3	0,0001	NPFFR2	1,46	0,0001	UNC5C	1,35	0,0000
DHX35	1,09	0,0000	NRGN	-1,15	0,0001	VAT1L	1,09	0,0001
DKFZp686K1684	-1,24	0,0001	OPCML	1,33	0,0000	ZFP64	1,21	0,0000
DLG2	1,43	0,0001	PABPC1L	1,36	0,0000	ZGPAT	1,35	0,0000
DOCK8	1,58	0,0000	PCDH17	1,4	0,0000	ZIC2	-1,36	0,0000
DPP10	1,36	0,0001	PDE9A	1,32	0,0000	ZNF197	-1,68	0,0000
DSC3	1,16	0,0000	PHACTR3	1,57	0,0000	ZNF704	1,31	0,0000
EPHA3	1,83	0,0001	PHF21B	1,21	0,0000	ZNF737	-1,69	0,0000
FAM83D	1,09	0,0001	PIP5K1B	1,23	0,0001	ZNF831	1,18	0,0000
FBXO41	-1,24	0,0001	PPP1R16B	-1,73	0,0000	ZNF84	-1,81	0,0001
FBXW12	-0,92	0,0001	PPP1R16B	1,27	0,0001	ZZZ3	-1,52	0,0001
FGF14	1,27	0,0001						

Tabelle 10-7: Genassoziierte Fenster mit signifikant differentieller H3K27me3-Besetzung in infizierten HDF-Zellen 14 d.p.i. nach Analyse mit diffReps.

Als Grenzwert wurde ein $\log_2FC = 0,25/-0,25$ verwendet.

Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue
ADNP	1,57	0,0000	JAZF1-AS1	1,63	0,0001	PDZD2	1,2	0,0000
ANO2	1,43	0,0000	KCNB1	1,52	0,0000	PHACTR3	-1,73	0,0000
APCDD1L	1,34	0,0001	KCNC1	1,37	0,0001	PHACTR3	1,33	0,0001
ARSG	-0,96	0,0003	KCNIP1	0,93	0,0000	PIEZO2	1,1	0,0001
ATP9A	1,34	0,0000	KCNIP1	1,84	0,0000	PIWIL3	1,75	0,0001
ATP9A	1,69	0,0000	KCNQ1	-1,13	0,0002	PKNOX2	-1,08	0,0000
AURKA	1,37	0,0000	KLHL14	1,41	0,0001	PLEKHB1	-2,06	0,0000
AURKA	2	0,0000	L3MBTL1	1,17	0,0002	PLK5	-1,17	0,0000
BCAS1	1,04	0,0000	L3MBTL1	1,65	0,0000	PMEPA1	1,49	0,0000
BCAS4	1,68	0,0000	LBP	1,44	0,0000	PMEPA1	1,99	0,0000
C1orf95	-1,01	0,0000	LIMCH1	1,56	0,0000	PRHOXNB	-1	0,0001
C20orf26	1,96	0,0000	LINC00466	1,56	0,0000	PRKAG2	1,14	0,0000
CACNA1D	1,55	0,0000	LIPT2	-1,34	0,0001	PTPN1	1,34	0,0001
CHAT	1,32	0,0001	LMTK3	-1,04	0,0001	RBP3	1,56	0,0001
CLSTN2	1,78	0,0001	LMX1A	1,42	0,0001	RNF17	-1,18	0,0000
CLVS1	1,65	0,0000	LOC100129620	1,41	0,0001	RYR3	1,7	0,0000
COBL	1,38	0,0000	LOC100131289	1,38	0,0001	SLC12A1	1,53	0,0001
DEFB126	1,09	0,0001	LOC100507443	1,3	0,0000	SLC18A1	1,78	0,0000
DEFB129	-1,47	0,0001	LOC100507588	-1,9	0,0000	SLC22A31	-1,2	0,0001
DLGAP1	1,39	0,0001	LOC283194	1,49	0,0000	SLC29A2	-0,88	0,0001
DLGAP4	1,27	0,0001	LOC400456	-1,34	0,0001	SLC2A10	-1,7	0,0001
DMRT1	1,41	0,0001	LOC729911	1,3	0,0001	SLC30A8	1,26	0,0001
DMRT3	1,13	0,0000	LPO	1,61	0,0001	SLC35F1	-1,29	0,0000
DUSP15	-1,44	0,0001	MAFA	-1,38	0,0007	SLC5A1	1,52	0,0000
DYNLRB2	1,73	0,0000	MAFB	1,19	0,0001	SLC6A5	1,57	0,0001
DYSF	-1,12	0,0001	MARCO	1,47	0,0000	SMPD3	1,37	0,0000
EFHD1	1,38	0,0001	MCTP1	-1,16	0,0003	SNAP91	1,81	0,0001

EGFEM1P	1,78	0,0000	MEGF11	-1,14	0,0000	SNTG2	0,94	0,0000
FAM184B	1,63	0,0001	MYBL2	1,21	0,0002	SORCS2	1,41	0,0001
FAM3B	1,02	0,0001	MYBL2	1,97	0,0001	SPRR4	1,74	0,0000
FAM3B	1,54	0,0000	MYO5B	1,47	0,0000	STK4	1,15	0,0000
FETUB	1,13	0,0003	MYO5B	1,7	0,0000	TH1L	1,54	0,0001
FRMD4A	-1,15	0,0001	MYOM2	1,38	0,0000	TRPC7	1,49	0,0000
GPC5	1,48	0,0000	NFATC2	1,37	0,0001	TSHZ2	1,2	0,0000
GRAP2	1,23	0,0001	NOTCH4	-1,1	0,0000	TSHZ2	1,29	0,0000
HIVEP3	1,74	0,0000	NPEPL1	1,33	0,0000	TSHZ2	1,32	0,0000
HLF	-0,76	0,0000	NPY5R	1,19	0,0000	TSPAN9	-1,33	0,0001
HNF4A	1,76	0,0000	ODZ2	1,76	0,0000	TUBB4A	-1,65	0,0000
HYDIN	1,18	0,0001	ODZ2	2,01	0,0000	WBSCR17	-1,21	0,0001
IFNG	1,64	0,0000	OR4D10	1,37	0,0001	ZHX3	1,38	0,0000
IQCA1	1,68	0,0001						

Tabelle 10-8: Gene mit signifikant differentieller Transkription in infizierten MC116-Zellen gegenüber nicht-infizierten MC116-Zellen. Als Grenzwerte wurden $\log_2FC = 0,5/-0,5$ und $p\text{-value} = 0,05$ verwendet.

Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue
A4GALT	-0,59	0,0005	GPR114	-1,11	0,0000	MYEOV	-0,80	0,0002
ABI3	-0,56	0,0005	GRK5	-0,56	0,0086	NAPSA	-0,74	0,0006
ACY3	-0,58	0,0066	HERC2P3	0,58	0,0067	NAV1	-0,84	0,0001
AHSA2	0,51	0,0116	HIC1	-0,54	0,0028	NEAT1	0,75	0,0002
AMICA1	-0,52	0,0090	HOPX	-0,92	0,0000	NME1	-0,57	0,0010
ANKFN1	-0,72	0,0008	HSPA12A	-0,52	0,0110	NOD2	-0,81	0,0001
B3GNT7	-0,88	0,0000	HSPB1	-0,69	0,0006	PCMTD1	0,53	0,0078
BEND6	0,69	0,0012	IFIT2	0,53	0,0138	PLAUR	-0,83	0,0001
C11orf75	0,51	0,0173	IL1RAP	0,62	0,0024	PLEKHA2	-0,52	0,0015
CBFA2T3	-0,54	0,0090	IL27RA	-0,64	0,0021	POF1B	-0,59	0,0043
CCDC126	0,58	0,0030	IL7R	0,72	0,0007	PTPN7	-0,60	0,0036
CCDC86	-0,55	0,0025	IRF5	-0,71	0,0000	PTPRF	-0,62	0,0029
CCNI2	-0,74	0,0004	ISYNA1	-0,58	0,0062	RAB11FIP1	-0,52	0,0026
CD1A	-0,71	0,0007	ITGA3	-0,67	0,0017	RGS9	0,74	0,0006
CD200R1	-0,75	0,0005	JMJD7	0,63	0,0031	RHD	0,57	0,0036
CD3E	-0,58	0,0069	JUP	-0,83	0,0000	SCAMP5	-0,52	0,0020
CD96	-0,59	0,0050	LAMP3	0,57	0,0050	SCIMP	-1,06	0,0000
CELSR1	-0,59	0,0056	LAPTM4B	-0,83	0,0001	SCNN1G	-0,58	0,0015
CERK	-0,80	0,0001	LCK	-0,53	0,0033	SKAP1	-0,78	0,0001
CORO1A	-0,54	0,0018	LHFPL2	-0,88	0,0000	SLC6A20	-0,64	0,0002
CSRNP1	-0,59	0,0012	LOC100505648	0,51	0,0176	ST3GAL1	-0,63	0,0032
CXCL10	0,58	0,0056	LOC440461	0,53	0,0122	STRIP2	0,96	0,0000
CYP2U1	-0,52	0,0159	LOC653160	0,57	0,0076	SYNGR1	-0,58	0,0046
DFNA5	0,51	0,0163	LYL1	-0,50	0,0070	SYTL2	0,60	0,0053
DLG2	0,83	0,0001	LYSMD4	0,60	0,0035	TBC1D4	-0,51	0,0143
DNLZ	-0,60	0,0021	MAPKAPK3	-0,54	0,0033	THEM4	0,53	0,0135
DOK1	-0,51	0,0092	MB21D2	-0,78	0,0001	TNFRSF1B	-0,94	0,0000
DST	0,61	0,0033	MCTP1	0,50	0,0177	TPD52	-0,74	0,0000
ENC1	-0,51	0,0027	MKL2	0,57	0,0010	TRPM2	-0,75	0,0005

ENPP1	-0,59	0,0040	MOXD1	0,56	0,0037	TRPV2	0,67	0,0005
ETV4	-0,78	0,0003	MTUS1	-0,63	0,0029	TTC18	0,52	0,0162
FAM64A	-0,58	0,0014	MXD4	0,56	0,0092	VASP	-0,57	0,0004
GGT7	-0,53	0,0116	MYBPC2	-0,69	0,0009	ZAP70	-0,52	0,0051
GK5	0,51	0,0141	MYCT1	-0,93	0,0000	ZC2HC1A	0,58	0,0065

Tabelle 10-9: Genassoziierte Fenster mit signifikant differentieller H3K4me3-Besetzung in infizierten MC116-Zellen nach Analyse mit diffReps.

Als Grenzwerte wurden $\log_2FC = 0,25/-0,25$ und $p\text{-value} = 0,05$ verwendet.

Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue
ADAM19	-0,44	0,0000	ITGA3	-0,79	0,0000	RHOH	-0,34	0,0000
APEX1	0,28	0,0000	LARGE	0,42	0,0001	RRM2	-0,33	0,0001
ARHGAP25	-0,29	0,0034	LHFPL2	-0,87	0,0000	SCAF1	0,28	0,0000
ATP2C1	-0,35	0,0000	LOC100287722	-0,35	0,0000	ST3GAL1	-0,49	0,0000
C14orf119	0,34	0,0000	LOC730101	-0,26	0,0110	ST3GAL2	-0,36	0,0000
CCDC64	-0,48	0,0000	MOAP1	0,32	0,0005	STK17B	-0,26	0,0000
CD180	-0,27	0,0000	MPP6	0,34	0,0000	SURF1	0,31	0,0000
CHAMP1	-0,27	0,0000	MZB1	-0,3	0,0000	SYNGR1	-0,95	0,0000
CHST12	0,26	0,0000	NAP1L4	-0,5	0,0000	TAOK1	0,26	0,0000
CTDNEP1	0,33	0,0006	NDUFAB1	0,27	0,0000	TBC1D13	0,37	0,0000
DALRD3	-0,27	0,0000	NOM1	0,26	0,0003	TM6SF1	-0,52	0,0001
DFNB31	-0,46	0,0001	NSUN2	0,28	0,0000	TMEM150A	-0,35	0,0000
DLG2	0,58	0,0000	PLEKHA2	-0,53	0,0001	TMEM170B	-0,54	0,0000
FBXW7	-0,26	0,0000	PRDM10	-0,34	0,0004	TRAF3IP2-AS1	-0,37	0,0000
GORASP2	-0,27	0,0000	PRMT6	-0,78	0,0001	TXNRD1	-0,28	0,0000
HBS1L	-0,34	0,0001	PRR14	0,26	0,0000	WEE1	-0,55	0,0000
IFT140	0,28	0,0000	RAB8B	-0,67	0,0000			

Tabelle 10-10: Genassoziierte Fenster mit signifikant differentieller H3K27me3-Besetzung in infizierten MC116-Zellen nach Analyse mit diffReps.

Als Grenzwerte wurden $\log_2FC = 0,25/-0,25$ und $p\text{-value} = 0,05$ verwendet.

Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue	Gen-Name	Log2FC	pvalue
ABCA4	1,15	0,0001	FHOD3	1,29	0,0000	OTUD7A	1,09	0,0000
ABCG1	2,75	0,0000	FRMD6	1,09	0,0001	PAPPA2	1,21	0,0001
ADARB2	1,03	0,0001	FSIP1	1,19	0,0001	PAQR5	1,09	0,0000
ANKS1B	-1,27	0,0001	FZD3	-1,46	0,0000	PARD3	1,29	0,0000
ANO1	1,57	0,0000	GALNTL2	1,42	0,0001	PARN	1,3	0,0000
ANO2	1,49	0,0000	GPRC5A	1,13	0,0001	PDE7B	1,02	0,0000
AQP9	1,1	0,0000	GRHL2	-0,97	0,0000	PDE9A	0,87	0,0001
ARMC3	1,47	0,0000	GRIK1	1,46	0,0000	PHACTR1	-1,09	0,0000
ARNT2	1,24	0,0000	GUSBP1	1,08	0,0001	PKNOX2	-0,88	0,0000
ART1	1,17	0,0001	HERC2P3	0,8	0,0001	PPARG	-1,28	0,0000
ATP8B4	1,25	0,0001	HRH1	-1,14	0,0000	PRIM2	0,96	0,0001
AZGP1	1,33	0,0000	HTR1E	1,16	0,0001	PRKAG2	0,99	0,0001
BAGE	0,79	0,0001	HTR2A	1,47	0,0000	PTGFRN	1,27	0,0000
BAGE5	0,76	0,0000	HYDIN	1,05	0,0000	RFPL1-AS1	1,19	0,0001

BCAS3	1,16	0,0000	IGF1R	1,41	0,0000	RFX2	-1,07	0,0001
BEND6	-1,33	0,0000	IGSF5	1,14	0,0002	RGL1	0,93	0,0001
BMP7	0,97	0,0001	ITIH5	1,04	0,0001	RTN1	-1,06	0,0000
C10orf107	1,19	0,0001	ITSN1	1,26	0,0000	RYR3	1,18	0,0000
C14orf132	-0,93	0,0002	KCNAB1	1,27	0,0000	S100B	0,99	0,0001
C15orf50	1,24	0,0000	KCNIP1	-0,94	0,0000	SEZ6L	0,91	0,0001
C1orf127	1,26	0,0001	KCNJ18	1,22	0,0000	SGSM1	0,96	0,0001
C6orf186	-1,18	0,0001	KCNJ6	1,13	0,0001	SLC14A2	1,19	0,0000
CACNA1C	1,17	0,0000	LACRT	-1,16	0,0000	SLC26A9	-0,99	0,0001
CACNA1E	1,22	0,0001	LGR6	-1,4	0,0001	SLC6A11	1,28	0,0000
CAMSAP2	-1,19	0,0001	LINC00158	1,44	0,0000	SMOC1	1,33	0,0001
CAMTA1	1,22	0,0001	LINC00277	1,35	0,0000	SORCS2	1,09	0,0000
CAPSL	1,19	0,0000	LINC00299	-1,48	0,0000	SPIRE1	1,45	0,0000
CARD14	1,11	0,0001	LMX1A	1	0,0000	SPON1	-1,26	0,0001
CCBE1	1,46	0,0001	LOC100131208	1,37	0,0001	SRGAP2P2	1,13	0,0001
CLIC6	1,24	0,0000	LOC100289178	1,09	0,0001	SRGAP3	-1,11	0,0001
CLIP4	-1,4	0,0000	LOC100526771	1,32	0,0001	SRL	1,17	0,0001
CNGB1	1,14	0,0000	LOC100616530	1,24	0,0000	SV2B	0,85	0,0001
COL6A4P2	1,36	0,0000	LOC643339	1,62	0,0000	SVIL	1,34	0,0000
CPNE4	1,24	0,0002	LOC727924	1,24	0,0001	SYNE1	-1,23	0,0001
CYP19A1	0,94	0,0000	LOC728989	1,48	0,0001	TCF21	-1,05	0,0000
DDAH1	0,83	0,0001	LOC729911	1,08	0,0001	TFCP2L1	1,22	0,0001
DGKG	-0,96	0,0000	LOC90246	1,26	0,0000	THSD4	1,35	0,0000
DISC1	1,67	0,0000	MAGI3	1,37	0,0000	TIFAB	-1,02	0,0001
DLG2	-1,36	0,0000	MAML3	-0,99	0,0001	TIMP3	1,02	0,0004
DOK1	1,57	0,0001	MAP7	-1,46	0,0000	TMEM56	1,33	0,0001
DZIP1	-1,05	0,0000	MAPK4	1,12	0,0000	TRIM9	-1,72	0,0000
EDN1	-1,27	0,0000	MBOAT2	1,38	0,0001	TTC28	1,12	0,0001
EFCAB5	-1,01	0,0001	MCC	1,42	0,0001	TTC39B	1,28	0,0001
EGFR	1,39	0,0000	MLL3	1,09	0,0000	WDR96	1,6	0,0000
ERG	1,36	0,0000	MSRB2	1,17	0,0000	WFDC12	1,37	0,0001
ESRRB	-1,42	0,0000	MXRA7	-1,01	0,0002	YAP1	-0,96	0,0001
FAM124A	-1,02	0,0000	MYO3A	1,15	0,0001	ZNF595	0,96	0,0001
FANK1	0,79	0,0000	MYO5B	-1,17	0,0000	ZNF664- FAM101A	1,42	0,0000
FGF12	-1,14	0,0000						

11 Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich gerne bei denjenigen Bedanken, die mich unterstützt haben und diese Arbeit somit erst ermöglicht haben.

Zunächst möchte ich mich gerne bei Prof. Dr. Adam Grundhoff für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Vielen Dank für die zahlreichen Ideen und Anregungen und auch für das stets entspannte und freundliche Miteinander.

Weiterhin möchte ich bei Prof. Dr. Wolfgang Streit für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. Thomas Günther, der mit seinem großen Wissensschatz und seinen kreativen Einfällen stets hilfsbereit zur Seite stand. Mit seinem wissenschaftlichen Enthusiasmus wusste er stets neue Motivation zu wecken. Danke auch für spannende Squash-Duelle, die dabei halfen den Kopf wieder frei zu bekommen.

Dank auch an Prof. Dr. Nicole Fischer für die konstruktive Kritik zu Vorträgen und während der gemeinsamen Labortreffen.

Vielen Dank an das Team der NGS-Facility für die Unterstützung bei meinen zahlreichen Sequenzierungen: Dr. Daniela Indenbirken, Dr. Lia Burkhardt, Kerstin Reumann und Christina Herrde.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Malik Alawi und Michael Spohn für die Unterstützung bei der Datenauswertung sowie allen bioinformatischen Problemen und Fragestellungen bedanken.

Ich möchte mich bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Virus Genomik des Heinrich-Pette-Instituts und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicole Fischer bedanken. Bessere Kollegen kann man sich kaum wünschen, ich habe die Zeit mit euch sehr genossen. Und wenn ich die Zeit finde setze ich mein Engagement als "Eventmanager" gerne fort und hoffe auf weitere gemeinsame Abende: Malik Alawi, Dr. Lia Burkhardt, Dr. Manja Czech-Sioli, Jacqueline Fröhlich, Dr. Thomas Günther, Dr. Daniela Indenbirken, Emma Kraus, Dr. Friederike

Neumann, Kerstin Reumann, Svenja Siebels, Michael Spohn, Uwe Tessmer, Dr. Juliane Theiß und Marion Ziegler.

Für das Lesen und Korrigieren des Manuskripts möchte ich mich bei Jacqueline Fröhlich, Thomas Günther, Emma Kraus und Svenja Siebels bedanken.

Abschließend möchte ich einigen Menschen danken, die abseits des Labors die Zeit meiner Promotion und mein Leben geprägt haben: Dr. Marcel Kwiatkowski, Donata Stadion, Dr. Catharina Escales, Julia Nikoleit, Alex Xavier, Svantje Heins, Dr. Lina Hildebrandt sowie die Sportler des TV Fischbek und des TH Eilbeck. Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern Marita und Christian Pohlmann für ihre Unterstützung in allen Abschnitten meines Lebens bedanken.

12 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, den 06.03.2018

Daniel Pohlmann