

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrich Koszinowski

Charakterisierung des murinen Zytomegalovirus MicroRNA Clusters m21/m22/M23

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sheila Isabella Karola Kothe
aus
Weiden i.d.Opf.
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrich H. Koszinowski

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Georg W. Bornkamm
Priv. Doz. Dr. Diethilde Theil
Prof. Dr. Reinhard Zeidler

Mitbetreuung durch den
habilitierten Mitarbeiter: Dr. med. habil. Lars Dölken

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2013

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass diese Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist.

Neuried, den 25.05.2012

Danksagung

Bedanken möchte ich mich v.a. bei meinem Doktorarbeitsbetreuer **Dr. med. habil. L. Dölken**, ohne dessen unermüdliche und selbstlose Hilfe diese Arbeit in vorliegender Form niemals möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Doktorvater **Prof. Dr. Dr. U. Koszinowski**, der es mir ermöglicht hat in einem so herzlichen Team mit viel Unterstützung diese Arbeit anzufertigen.

Danke auch an euch, **Mama, Papa, Lara** und insbesondere dich **Jan**, ihr wart zu jeder Zeit an meiner Seite und habt mich immer tatkräftig unterstützt.

*Diese Arbeit widme ich
meinem Vater*

Veröffentlichungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Juli 2006 bis zum Februar 2009 im Genzentrum des Max von Pettenkofer-Instituts in München angefertigt.

Im Verlauf der Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Cytomegalovirus microRNAs facilitate persistent virus infection in salivary glands.

Dölken L, Kmpotic A, **Kothe S**, Tuddenham L, Tanguy M, Marcinowski L, Ruzsics Z, Elefant N, Altuvia Y, Margalit H, Koszinowski UH, Jonjic S, Pfeffer S.

PLoS Pathog. 2010 Oct 14;6(10):e1001150.

Systematic analysis of viral and cellular microRNA targets in cells latently infected with human gamma-herpesviruses by RISC immunoprecipitation assay.

Dölken L, Malterer G, Erhard F, **Kothe S**, Friedel CC, Suffert G, Marcinowski L, Motsch N, Barth S, Beitzinger M, Lieber D, Bailer SM, Hoffmann R, Ruzsics Z, Kremmer E, Pfeffer S, Zimmer R, Koszinowski UH, Grässer F, Meister G, Haas J.

Cell Host Microbe. 2010 Apr 22;7(4):324-34.

Inhaltsverzeichnis

Ehrenwörtliche Versicherung	3
Danksagung	4
Veröffentlichungen	5
Inhaltsverzeichnis	6
1 Zusammenfassung	10
2 Einleitung	12
2.1 Herpesviren	12
2.2 Das humane Zytomegalovirus (HCMV)	14
2.2.1 Entdeckung und Verbreitung von HCMV	14
2.2.2 CMV-assoziierte Erkrankungen.....	15
2.2.3 Genexpression und Replikation des HCMV	18
2.2.4 Das murine Zytomegalovirus (MCMV)	19
2.3 Micro-RNAs	20
2.3.1 Die Entdeckung von miRNAs und ihrer regulatorische Funktion.....	20
2.3.2 Biogenese und Wirkungsweise von miRNAs	21
2.3.3 Methoden der Identifizierung von Ziel-Genen viraler miRNAs	23
2.4 Herpesvirale microRNAs	25
2.4.1 miRNAs bei Alphaherpesviren	25
2.4.2 miRNAs bei Betaherpesviren.....	26
2.4.3 miRNAs bei Gammaherpesviren	27
2.4.4 Identifikation von miRNA Zielgenen mittels Immunopräzipitation von RISC-Komplexen gefolgt von Microarray Analysen (RIP-Chip)	27
2.5 Vorarbeiten und Ziele der Arbeit	28
2.5.1 Die Identifizierung der MCMV miRNAs	28
3 Material und Methoden	31
3.1 Material	31
3.1.1 Laborgeräte	31
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	31
3.1.3 Reagenzien	32
3.1.4 Enzyme	33
3.1.5 Kommerzielle Komplettsysteme (Kits).....	33
3.1.6 Bakterienstämme.....	33

3.1.7	Zellen und Zelllinien	33
3.1.7.1	Primäre Zellen	33
3.1.7.2	Zelllinien	33
3.1.8	Antikörper	33
3.1.9	Oligonukleotide und Primer	34
3.1.10	Kulturmedien/Seren	36
3.1.10.1	Grundmedien	36
3.1.10.2	Zusätze/Seren	36
3.1.11	Antibiotika	36
3.1.12	Puffer und selbst hergestellte Medien/Nährböden	36
3.2.	Methoden	38
3.2.1	Arbeiten mit Bakterien.....	38
3.2.1.1	Kultivierung von Bakterien	38
3.2.1.2	Anfertigen von Glycerolstocks	38
3.2.1.3	Transformation von Bakterien	38
3.2.2	DNA- und RNA-Techniken	39
3.2.2.1	Präparation von Plasmid- und BAC-DNA aus E.coli	39
3.2.2.1.1	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)	40
3.2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA (Midipräparation).....	40
3.2.2.1.3	Analytische Isolierung von BAC-DNA (Minipräparation)	41
3.2.2.1.4	Präparative Isolierung von BAC-DNA (Midipräparation)	41
3.2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA	41
3.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und deren Reinheit	42
3.2.2.4	Klonierungen und Konstrukt-Analysen	42
3.2.2.4.1	Restriktionsenzymverdau und Aufreinigung.....	42
3.2.2.4.2	Gelelektrophorese und DNA-Isolierung aus dem Gel.....	43
3.2.2.4.3	Dephosphorylierung des Vektors.....	43
3.2.2.4.4	Ligation.....	43
3.2.2.4.5	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
3.2.2.4.6	Oligoklonierung (Annealing von synthetischen Oligonukleotiden).....	45
3.2.2.4.7	Sequenzierung.....	45
3.2.2.5	Reverse Transkription und Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR	45
(real-time PCR, qPCR)	45	
3.2.2.5.1	Real-time PCR-Quantifizierung von miRNAs im Light-Cycler™	45
3.2.2.5.2	Real-time Quantifizierung von RNA Transkripten mittels TaqMan™ PCR.....	47
3.2.3.1	Kultivierung von Zellen	49
3.2.3.2	Auftauen von Zellen	49
3.2.4	Arbeit mit MCMV.....	49
3.2.4.1	Herstellung von rekombinanten MCMV-BACs	50
3.2.4.1.1	BAC-Mutagenese	50

3.2.4.1.2	Positiv- und Negativselektion anhand der galk/Kn-Kassette.....	51
3.2.4.2	Virusrekonstituierung.....	56
3.2.4.3	Virusstockpräparation.....	57
3.2.4.4	Erstellen einer Wachstumskurve.....	59
3.2.4.5	Virustiterbestimmung mittels Plaque-Assay	59
3.2.5	Pull Down von RISC-Komplexen und Isolierung von RNA	60
3.2.6	<i>In vivo</i> Arbeiten	61
3.2.6.1	Vorarbeiten.....	61
3.2.6.1.1	Infektion und Organentnahme.....	61
3.2.6.1.2	Homogenisation der Mausorgane und Titration (Plaque Assay).....	62
3.2.6.2	Hauptexperimente	62
3.2.6.2.1	Mausaufzucht und Behandlung.....	62
3.2.6.2.2	<i>In vivo</i> Depletion von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen, sowie NK- Zellen.....	63
3.2.7	Dual Luciferase Assays	63
4.1	Der Genlokus m21/m22/M23 des murinen CMV	64
4.2	Die Herstellung der Knock-out Mutanten und deren Revertanten.....	64
4.2.1.	Revertierung der publizierten Mutanten	65
4.2.2	Herstellung einer zweiten („subtilen“) Mutante von miR-M23-2/m21-1 sowie deren Revertante	66
4.3	Charakterisierung der Mutanten.....	71
4.3.1	Das Gen m22 und die miRNAs des m21/m22/M23 Clusters sind für das Virus nicht essentiell	71
4.3.2	Der subtile miR-M23-2 Knock-out zeigt <i>in vitro</i> keinen Effekt.....	72
4.3.3	Beide miR-M23-2 knock-out Viren sind spezifisch in der Speicheldrüse von C57BL/6 Mäusen attenuiert.....	73
4.3.4	Das Ausmaß der Attenuierung ist abhängig von der Virusdosis	76
4.3.5	Das Ausmaß der Attenuierung variiert mit dem genetischen Background	77
4.3.6	Der Phänotyp in den Speicheldrüsen wird durch eine kombinierte Depletion von NK-Zellen und CD4 ⁺ T-Zellen revertiert	78
4.4	Identifikation von Zielgenen der MCMV-miRNAs mittels RIP-Chip.....	80
4.4.1	Etablierung der RISC-Immunopräzipitation.....	81
4.4.2	Virale miRNAs akkumulieren in RISC-Komplexen	82
4.4.3	Anreicherung von miRNAs in der RISC-IP.....	83
4.4.4	Identifizierung von zellulären und viralen miRNA Zielgenen.....	85
4.4.4.1	Microarray-Analysen der RISC-IP (RIP-Chip)	85
4.4.4.2	Validierung zellulärer MCMV miRNA Zielgene durch TaqMan PCR	87
4.4.5	GO-Analysen (Gen-Ontologie) der identifizierten Zielgene.....	89
4.4.6	Virale miRNAs sind während der lytischen Infektion funktional	90

5	<i>Diskussion</i>	94
5.1	Kinetik miRNA bedingter Regulationsmechanismen	94
5.2	Das Ausmaß der Attenuierung zeigt Abhängigkeit von Mausstamm und Dosierung	95
5.3	Kombinierte Depletion von NK- Zellen und CD4 ⁺ T-Zellen revertiert den Phänotyp aber beeinflusst die infizierten Zelltypen in den Speicheldrüsen	97
5.4	Identifizierung von miRNA Zielgenen mittels RIP-Chip	98
5.4.1	Kooperation von viralen Proteinen und miRNAs bei der Regulation von aktivierenden NK-Zell Liganden	99
5.4.2	Identifikation von viralen miRNAs in KSHV/EBV mittels RIP-Chip	100
5.4.3	Ausblick.....	101
6	<i>Anhang</i>	102
6.1	Abkürzungen	102
6.2	Lebenslauf	104
7	<i>Referenzen</i>	106

1 Zusammenfassung

Herpesviren sind große, doppelsträngige DNA-Viren. Im Anschluss an die Primärinfektion etablieren alle Herpesviren eine lebenslange, latente Infektion mit dem ständigen Risiko von symptomatischen Reaktivierungen. Das humane Zytomegalovirus (HCMV) ist ein Mitglied der β -Herpesvirusfamilie und ein bedeutendes Pathogen für immungeschwächte Patienten. Bei Neugeborenen ist es die häufigste kongenitale virale Infektion, die z.T. schwere bleibende Schäden verursacht; 1/1000 Neugeborener wird infiziert [1]. Während der langen Evolution mit ihrem Wirt haben Zytomegaloviren ein breites Spektrum an Abwehrmechanismen entwickelt um dem angeborenen und erworbenen Immunsystem ihrer Wirte zu entgehen [2]. Mit der Entdeckung viraler microRNAs Im Jahre 2004 wurde ein fundamental neuer Mechanismus entdeckt mit dem diese Viren die von ihnen infizierten Zellen zu ihren Gunsten beeinflussen. MicroRNAs sind nicht-kodierende, ~22nt lange RNA Moleküle, die sowohl über eine Hemmung der Translation als auch durch Verringerung der Stabilität der von ihnen regulierten Transkripte die Expression ihrer Zielgene regulieren [3]. Eine einzelne miRNA ist in der Lage eine Vielzahl von z.T. mehr als 100 verschiedenen Zielgenen zu regulieren. Die beobachteten Effekte auf die Proteinspiegel ihrer Zielgene sind in der Regel aber nur gering (<2-fach), was deren Identifizierung und funktionelle Charakterisierung erschwert [4-5]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass die meisten Herpesviren eine Vielzahl von verschiedenen miRNAs sowohl während der produktiven Infektion als auch in Latenz bilden [6]. Über deren Funktion und die von ihnen regulierten zellulären und viralen Gene ist allerdings immer noch wenig bekannt. Allerdings deutet die Vielzahl der inzwischen identifizierten viralen miRNAs, die offensichtlich unabhängig voneinander bei fast allen Herpesviren entstanden sind, auf eine wichtige Rolle dieser kleinen RNA Moleküle für diese Viren hin. Hierbei ist insbesondere von Bedeutung, dass miRNAs geradezu ideale – da nicht immunogene – Werkzeuge für diese Viren darstellen, die latent infizierte Zelle zu ihren Gunsten umzuprogrammieren.

MicroRNAs bieten einen attraktiven, möglichen Angriffspunkt für dringend benötigte antivirale Medikamente mittels sogenannter AntagomiRs [6]. Voraussetzung für deren Entwicklung und Einsatz ist jedoch ein gutes Verständnis der Funktion der viralen miRNAs. Hierfür sind Tiermodelle zwingend erforderlich. Mit der Identifizierung und Charakterisierung der miRNAs des murinen Zytomegalovirus wurden im Koszinowski Labor hierfür die notwendigen Voraussetzungen geschaffen [7]. Zu Beginn dieser Arbeit war noch für keine virale miRNA ein Phänotyp *in vivo* beschrieben worden. Des Weiteren waren bisher nur eine Handvoll Zielgene viraler miRNAs identifiziert. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnenen Daten

fürten zu einer zur Erstpublikation eines funktionalen Phänotyps bei einer Maus-Zytomegalovirusmutante (MCMV), bei der zwei miRNAs ausgeschaltet wurden. Während der subakuten Infektion war die Produktion der Virusmutante in den Speicheldrüsen selektiv reduziert [8]. Dies ist von besonderem Interesse, da die Speicheldrüsen des Wirtes während der persistierenden CMV-Infektion die Hauptquelle für die Weitergabe des Virus von Wirt zu Wirt darstellen [9-10]. Interessanterweise zeigte der beobachtete Phänotyp Abhängigkeit von mehreren Parametern, wie Viruslast und dem genetischen Hintergrund der Mäuse, und konnte durch die kombinierte Depletion von Natürlichen Killerzellen (NK) und CD4⁺ T-Zellen aufgehoben werden. Insgesamt ergeben sich so erste Hinweise auf einen miRNA-basierten Immunevasions-Mechanismus in einem Organ, das für die Aufrechterhaltung einer persistierenden Infektion sowie der horizontalen Virustransmission von entscheidender Bedeutung ist.

Zum anderen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Immunopräzipitation von miRNA/Ziel-RNA Komplexen gefolgt von Microarray Analysen, RIP-Chip genannt, etabliert. Dies führte zur Identifizierung einer Vielzahl von interessanten Zielgenen der MCMV miRNAs. An deren funktionaler Charakterisierung wird derzeit gearbeitet. Des Weiteren wurde die entwickelte Methode erfolgreich eingesetzt um den ersten Atlas von miRNA Zielgenen für die beiden humanen Gammaherpesviren, Epstein-Barr-Virus und Kaposi-Sarkoma-Virus, zu erstellen [11]. Diese Arbeiten bieten somit die Grundlage für ein tieferes Verständnis der Funktion viraler miRNAs bei verschiedenen humanen und murinen Herpesviren – insbesondere der koordinierten Regulation zentrale zellulärer Prozesse durch die konzertierte Wirkung von viralen Proteinen und viralen miRNAs.

2 Einleitung

2.1 Herpesviren

Herpesviren traten schon früh in der Evolution auf und sind im Tierreich weit verbreitet. Die Familie der Herpesviren umfasst ca. 120 verschiedene Spezies in Reptilien, Vögeln und Säugern [12]. Im Jahr 2009 neu geordnet, gehört die Familie der *Herpesviridae* zur Ordnung der *Herpesvirales*. Herpesviren sind große DNA-Viren. Die Einteilung in die drei Unterfamilien *Alphaherpesviridae*, *Betaherpesviridae* und *Gammaherpesviridae* basiert auf Homologien der Aminosäuresequenzen und anderen Eigenschaften, wie z.B. Zelltropismus [13]. Vier Komponenten bilden das klassische Virion eines Herpesvirus, welches aus mindestens 30 viral kodierten Proteinen zusammengesetzt ist. Der Kernbereich, der die virale DNA enthält, wird von einem, im Durchmesser ~100-110nm großen, ikosaedrischen Kapsid umgeben. Das Kapsid selbst besteht aus 12 pentameren und 150 hexameren Kapsomeren und wird aus lediglich fünf konservierten Proteinen gebildet [14]. Kapsid und DNA bilden zusammen das Nukleokapsid. Das sogenannte Tegument, eine Art Matrix aus mindestens 15 verschiedenen viralen Proteinen, umgibt das Nukleokapsid und trennt es von der Virushülle [15]. Die erste Virushülle wird bei der Kernausswanderung der Virionen an der inneren Zellkernmembran gebildet und durch die Fusion mit der äußeren Kernmembran wieder entfernt. Die zweite und endgültige Virushülle entsteht durch Knospung in Vesikel des Golgi-Apparates. Sie enthält mindestens zehn virale (Glyko-)Proteine. Diese spielen eine tragende Rolle, indem sie die Interaktion von extrazellulären Virionen mit den entsprechenden zellulären Rezeptoren ermöglichen.

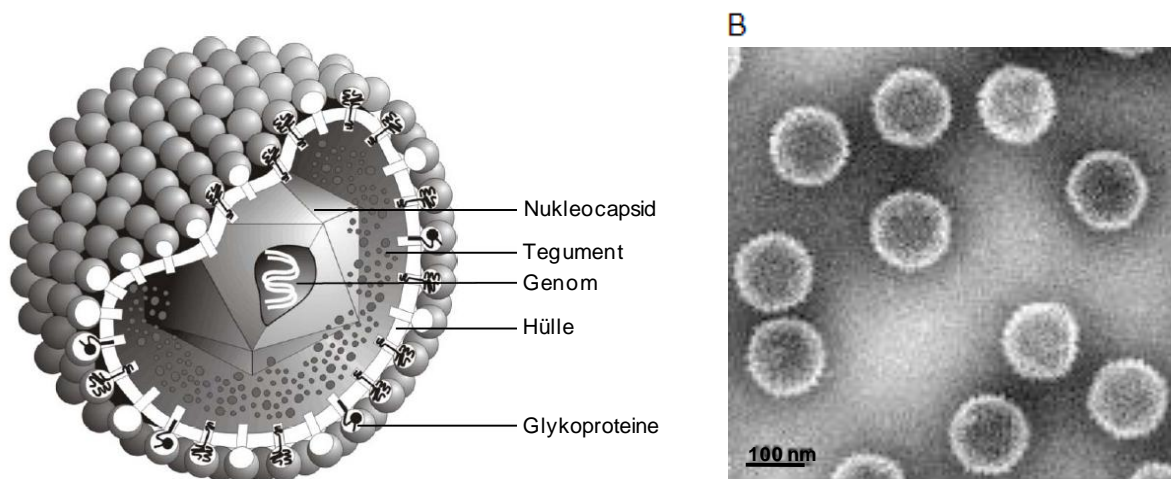


Abb. 1: Das Herpesvirus Partikel

(A) Schematisches Modell eines Herpesvirus Partikels und seiner wichtigsten Bestandteile

(B) Herpesvirale Nukleokapside von EHV-1 (Equines Herpesvirus 1) ohne Hülle in einer TEM-Aufnahme.

(Abbildungen aus „The big picture book of viruses“, http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAherpes.html).

Im Viruspartikel liegt das herpesvirale Genom als lineare, doppelsträngige DNA (130 bis 230 Kilobasenpaare [kbp] lang) vor. Je nach Herpesvirus kodiert dieses für 70 bis >200 verschiedene virale Proteine [13, 16]. Nach Infektion einer Zelle wird das lineare Genom im Zellkern in ein zirkuläres Molekül überführt, so dass es als sogenanntes Episom im Kernplasma vorliegt. Hier erfolgen die virale DNA-Synthese sowie der Zusammenbau der Kapside. Die meisten viralen Gene, welche auf beiden DNA-Strängen liegen können (manchmal sogar überlappend), werden von der zellulären RNA Polymerase II transkribiert. Die viralen Promotorbereiche weisen Bindungsstellen für zelluläre und virale Transkriptionsfaktoren auf, welche die virale Genexpression während des Infektionszyklus regulieren.

In aller Regel wird die Wirtszelle durch die lytische Infektion (Produktion und Freisetzung von Viruspartikel) irreversibel zerstört [13]. Andererseits ist die Fähigkeit zur Etablierung einer lebenslangen Infektion ihrer Wirte eine charakteristische Eigenschaft aller Herpesviren. In diesem, als „Latenz“ bezeichneten Zustand, liegt die virale DNA als extrachromosomales Episom in stabiler Kopienzahl im Kernplasma vor. Bei einigen Herpesviren, z.B. bei EBV, wird das extrachromosomale Episom zusammen mit dem Wirtsgenom in der S-Phase des Zellzyklus repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. In Latenz wird nur eine geringe Anzahl von viralen Proteinen exprimiert. Diese haben in erster Linie die Aufgabe, die Latenz aufrechtzuerhalten und das Immunsystem des Wirtes zu Gunsten des Virus zu beeinflussen. Somit bleiben die Viren in Latenz nahezu völlig unbemerkt. Kommt es aufgrund von exogenen oder endogenen Einflüssen zur Virusreaktivierung, können diese Viren, vor allem bei immuninkompetenten Personen, schwere Krankheitsbilder auslösen. Typische exogene und endogene Faktoren, welche eine Reaktivierung auslösen können, sind u.a. Immunsuppression, Stress, UV-Licht Exposition, bestimmte Hormone und Co-Infektionen.

Bislang wurden acht humanpathogene Mitglieder der Herpesvirenfamilie (HHV-1 bis -8) identifiziert: HHV-1 (Herpes-simplex Virus 1, HSV1), HHV-2 (Herpes-simplex Virus 2, HSV2) und HHV-3 (Varicella-Zoster-Virus) aus der Unterfamilie der *α -Herpesvirales*. HHV-1 verursacht den *Herpes labialis*, HHV-2 den *Herpes genitalis*. HHV-3 ist der Erreger von Windpocken und Gürtelrose. Alle drei Viren etablieren ihre Latenz in den sensorischen Ganglien [17].

Vertreter der *β -Herpesviridae* sind HHV-5 (Humanes Cytomegalovirus, HCMV), HHV-6 und HHV-7, die eine strenge Wirtsspezifität zeigen. Für den immunkompetenten Erwachsenen stellt das Zytomegalovirus so gut wie keine ernsthafte Bedrohung dar. Hingegen kann eine Infektion während der Schwangerschaft oder unter Immunsuppression fatale Folgen haben [1]. HHV-6 und -7 sind die Erreger des *Exanthema subitum*, dem sogenannten „Drei

Tagefieber“ bei Kleinkindern. Sie alle etablieren ihre Latenz in den unterschiedlichsten Zelltypen und Geweben.

Zu den γ -Herpesviridae zählen HHV-4 (Epstein-Barr-Virus, EBV) und HHV-8 (Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus, KSHV). Sie zeichnen sich durch ihren Lymphtropismus aus und können zu lymphoproliferativen Erkrankungen führen [18]. Zu diesen zählen bei KSHV das Kaposi-Sarkom, das primäre Effusionslymphom sowie die multizentrische Castleman'sche Erkrankung [19-20]. Mit einer EBV-Infektion assoziierte Erkrankungen sind das Burkitt und Hodgkin Lymphom, das NK-/T-Zell Lymphom, die Mycosis fungoides (Sézary Syndrom, peripheres T-Zell Lymphom), das Posttransplantationslymphom sowie das Nasopharynxkarzinom [21].

2.2 Das humane Zytomegalovirus (HCMV)

2.2.1 Entdeckung und Verbreitung von HCMV

Der deutsche Pathologe Hugo Ribbert entdeckte 1881 große Zellen mit Einschlusskörperchen, als er kindliche Speicheldrüsen und Nierengewebe von syphilitischen Neugeborenen mikroskopisch untersuchte. Die Ätiopathogenese allerdings verkennend, bezeichnete er seine Beobachtungen zunächst als „*Krankheit mit protozoenhaltigen Zellen*“. Goodpasture war es, der 1921 den später namensgebenden Terminus „*Zytomegalie*“ einführte, in Anlehnung an das histopathologische Erscheinungsbild. Schließlich gelang es 1957 Weller et al. das Virus zu isolieren und in Zellkultur anzuzüchten [22-23].

HCMV ist weltweit verbreitet [24]. Je nach Lebensstandard und sozialem Status variiert der Durchseuchungsgrad; in Deutschland sind bis zum 35. Lebensjahr ca. 50% der Bevölkerung infiziert [25]. In den Entwicklungsländern liegt aufgrund mangelnder Hygiene und anderen Faktoren die Durchseuchung deutlich höher. Auch auf entlegenen Inselstaaten mit geringer Bevölkerungsdichte sind regelmäßig HCMV-Infektionen beschrieben, ganz im Gegensatz zu Masern- und Rötelinfectionen [25].

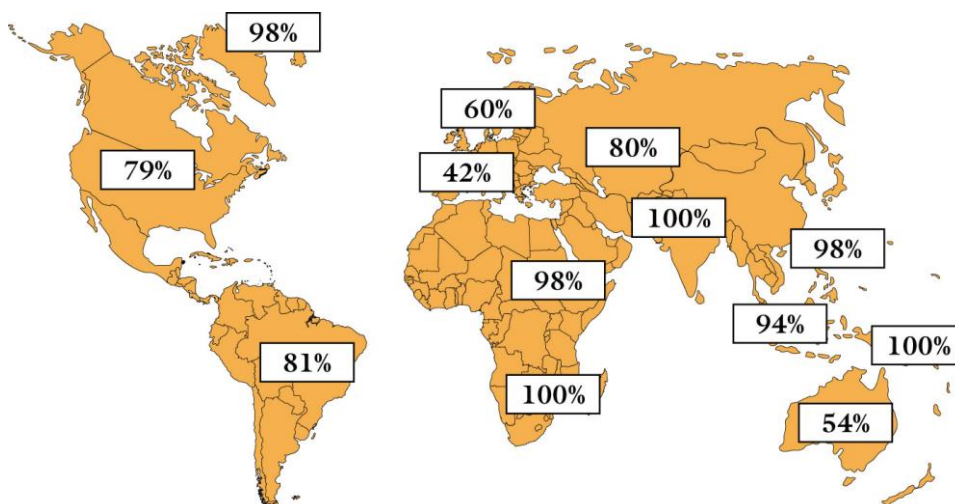


Abb. 2:
Seroprävalenz von
HCMV weltweit 2002
(aus [23])

2.2.2 CMV-assoziierte Erkrankungen

Die klinischen Erscheinungsformen einer HCMV Infektion sind mannigfaltig. In Abhängigkeit von Alter, Immunstatus und anderen Begleiterkrankungen treten verschiedene Krankheitsbilder auf.

Akute Infektion des immunkompetenten Wirtes

Die Primärinfektion mit CMV ist in der Regel klinisch unauffällig. Es können aber auch Symptome ähnlich einer akuten infektiösen Mononukleose (sogenanntes Pfeiffersches Drüsenfieber als klassische Manifestation einer Erstinfektion mit EBV) auftreten (Fieber, Müdigkeit, Myalgien, Kopfschmerzen und allgemeines Krankheitsgefühl). In Einzelfällen wurden aber auch schwere Verläufe mit Multiorganversagen und Thrombozytopenien beschrieben [26]. Äußerst selten kann auch eine CMV-Enzephalitis bzw. eine Beteiligung des gesamten Nervensystems auftreten; dies äußert sich dann zumeist als Meningoenzephalitis, Radikulomyelitis oder Polyradikulitis [27].

Kongenitale HCMV Infektion und Frühgeburten

Lange Zeit war die konnatale HCMV Erkrankung das einzige Infektionsmodell, bei dem das eigentliche Gefahrenpotential des Zytomegalovirus ersichtlich wurde. Die Infektion der Föten im Rahmen einer CMV-Primärinfektion oder CMV-Reaktivierung der Mutter zeigt ein breites Spektrum unterschiedlicher Erscheinungsbilder. Diese reichen, je nach Zeitpunkt der Infektion in der Schwangerschaft, vom Abort über intrauterine Wachstumsretardierungen des Fötus bis hin zu schwersten Geburtsfehlern und generalisiertem CMV-Infektionssyndrom. Ausgehend von den maternalen Blutgefäßen repliziert das Virus in den Deziduazellen und gelangt schließlich in Immunkomplexen verborgen durch die Plazenta zum Fötus [28]. Das Risiko für das Kind, eine konnatale CMV-Infektion bei Primärinfektion der Mutter zu erwerben, liegt bei 40-50%. Auch reaktivierte Infektionen bei seropositiven Frauen, bzw. die Neuinfektion mit einem weiteren HCMV-Stamm während der Schwangerschaft, können eine konnatale Infektion des Kindes zur Folge haben [28-29]. Insofern ist der Immunstatus der Mutter während der Schwangerschaft entscheidend für das Wohl des Kindes [30]. Präkonzeptionelle Antikörper der Mutter schützen in ca. 70% das Kind vor einer Infektion im Mutterleib. In den restlichen 30% der Fälle, in denen trotz präformierter Antikörper der Mutter eine intrauterine Infektion des Kindes erfolgt, werden Reinfektion und erneute Infektion mit einem anderen Virusstamm als Ursache diskutiert [31]. Bedeutsam ist nicht nur die Art der mütterlichen Infektion (Erstinfektion vs. Reaktiviert/Reinfektion), sondern auch der Zeitpunkt der Übertragung der Viren auf das Kind. Am ungünstigsten für das Kind ist eine Infektion

während des ersten Trimenon [32]. Das Virus infiziert Vorläuferzellen der Villi in der Plazenta, welche für die Versorgung des Kindes zuständig sind. Komplizierte Remodellingvorgänge führen dazu, dass der maternale Blutfluss und somit die Verfügbarkeit von Nährstoffen für das Kind wesentlich eingeschränkt werden. Fibrinoide Ablagerungen und Nekrosen in der Plazenta, aufgrund der lytischen Virusreplikation, verstärken diesen Effekt weiter. Es entsteht intrauterin die Situation einer chronischen Mangelversorgung des Kindes mit daraus folgender Wachstumsretardierung [28].

A



B



Abb3: Folgen einer konnatalen CMV Infektion

A) Neugeborenes mit konnataler CMV-Infektion und ausgeprägtem Hydrops fetalis (aus [31]).

B) Blueberry-Muffin-Baby bei konnataler Zytomegaloviruserkrankung (aus [33])

Eine Studie von Boppana ergab, dass zwei Drittel aller untersuchten Kinder mit konnataler CMV-Infektion Zeichen von ZNS-Beteiligung (v.a. epileptische Anfälle), Unterernährung, Lethargie und generalisierter Hypotonie in unterschiedlichem Ausmaß zeigten [34]. Auch heute noch ist die kongenitale HCMV-Infektion die häufigste konnatale Infektion weltweit und die häufigste Ursache für kognitive Störungen bei Kindern in Nordamerika und Westeuropa. Sie steht an zweiter Stelle als Verursacher von kindlichen Hörverlusten [24]. Statistisch weisen ca. 0,1%-1% aller Lebendgeburten der US-Bevölkerung eine konnatale HCMV-Infektion auf, in Entwicklungsländern sogar 0,5%-2% [24].

Frühgeburten sind aufgrund ihres insuffizienten Immunsystems, ihres geringen Geburtsgewichtes und des eventuellen Bedarfs einer Transfusion von Blut und Blutprodukten besonders gefährdet [1]. Schwere konnatale CMV-Infektionen treten bevorzugt bei Primärinfektion der Schwangeren auf. Es zeigt sich ein Sepsis-ähnliches Bild (Apnoe, Bradykardie, graublasses Hautkolorit, Organomegalie, Leukopenie und Thrombozytopenie, sowie erhöhtes C-reaktives Protein und Leberfunktionsstörungen) [35-36].

HCMV-Infektion des immundefizienten Wirts

Die Bedeutung der CMV-Infektion hat seit dem routinemäßigen Einsatz der Transplantationsmedizin und der Verwendung hochkompetenter Immunsuppressiva, sowie der weltweiten Ausbreitung von HIV/AIDS stark zugenommen [37].

Die CMV-Infektion nach solider Organtransplantation manifestiert sich zumeist als akuter systemischer Infekt mit Fieber, auch CMV-Syndrom genannt [1]. Hinzu kommen transplantatspezifische Komplikationen (z.B. schnelle Re-Stenosen bei HerzTx), sowie akute und chronische Transplantatabstoßungen bis hin zum vorzeitigen Transplantatverlust [38-40].

Die Hauptsymptome einer CMV-Infektion nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSTx) sind schwere interstitielle Pneumonien und unspezifische gastrointestinale Symptome. Ebenfalls mit CMV-Infektionen assoziiert sind Fälle von *Graft-versus-Host-Disease* [1, 41]. Bevor antivirale Medikamente verfügbar waren, betrug die CMV-bedingte Morbidität bei Patienten nach HSTx ca. 25%. Dies äußerte sich zumeist in einer lebensbedrohlichen CMV-Pneumonie. Die Mortalität betrug hierbei ~85% [1]. Spezielle Prätransplantationskonditionen (z.B. ablative Chemotherapie) und Anti-Immun-Therapien mit Biologicals (z.B. Infliximab) gefährden die Patienten zusätzlich. Heute reduziert ein aggressives Monitoring sowie die präventive antivirale Therapie die Inzidenz der *early-onset* HCMV-Infektion (entspricht einer Infektion innerhalb der ersten 100d nach Tx) auf ~5%. Allerdings werden in diesem Zusammenhang vermehrt *late-onset* Infektionen beobachtet [1, 24].

CMV bei HIV- infizierten Patienten

Weltweit nimmt die Verbreitung des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) zu. Seine klinische Erscheinungsform im Finalstadium der Erkrankung ist das „acquired immunodeficiency syndrom“ (AIDS). Vor der Verfügbarkeit der HAART (hoch aktive antiretrovirale Therapie) zeigten 20%-40% aller an AIDS erkrankten Erwachsenen eine HCMV-Infektion. Das Risiko hierfür korreliert eng mit dem Immunstatus des HIV/AIDS Patienten [1]. Mit dem konsequenten Einsatz einer patientenspezifischen HAART-Therapie wurde eine drastische Reduzierung der CMV-bedingten Morbidität und Mortalität erreicht [42-43]. Trotzdem bleibt die HCMV-Infektion immer noch eine der häufigsten opportunistischen Infektionen bei HIV-Patienten. Das klassische Erscheinungsbild der CMV-Reaktivierung bei AIDS-Patienten ist hierbei die klinisch hochausgeprägte CMV-Chorioretinitis. Zusätzlich scheint CMV auch ein Cofaktor für das Voranschreiten der HIV-

Infektion zu sein [44]. Bei konnatal mit HIV-1 infizierten Kindern beschleunigt die gleichzeitige Infektion mit CMV das Fortschreiten der Erkrankung hin zu AIDS, mit häufig letal endender Enzephalopathie [45].

2.2.3 Genexpression und Replikation des HCMV

Das Genom von CMV besteht aus 236kbp linearer dsDNA. Wie bei den meisten Herpesviren findet man auch hier einmalig vorkommende Sequenzabschnitte und wiederholte, repetitive Einheiten in einem bestimmten Muster. Diese entstehen durch intramolekulare Rekombination bei der Replikation des Genoms. Das Genom kodiert für über 200 virale Proteine, wobei während der Transkription z.T. unterschiedliche oder gar überlappende Leseraster verwendet werden. Zusätzlich besitzt es spezifische Promotoren, die von viralen und zellulären Transaktivatoren erkannt werden, sowie Erkennungsstellen für die zelluläre RNA-Polymerase II (für die Transkription verantwortlich). Somit ist das Zytomegalovirus das Virus mit der größten Kodierungskapazität des Menschen [46].

Während der lytischen Infektion wird das Genom kaskadenartig abgelesen. Man unterscheidet *immediate early*-, *early*- und *late*-Gene. *Immediate early*-Gene kodieren für Proteine mit transaktivierenden Eigenschaften und sind zentrale Regulatoren für das Virus in der Zelle. Nach ihrer Translation im Zytoplasma gelangen sie durch Kernporen zurück in den Nukleus und aktivieren dort Promotoren der *early*-Gene des Virus. Die daraufhin transkribierten *early*-Proteine sind Enzyme und Nukleinsäure-bindende Polypeptide, welche für die Replikation des kompletten Virusgenoms vonnöten sind. Zeitgleich mit der Virus-DNA-Synthese werden die *late*-Proteine hergestellt, welche häufig Glykoproteine sind. Das Prinzip der Replikation erfolgt nach dem „*rolling circle*“, d.h. die Genomkopien werden in konkatemerer Anordnung erstellt [46].

Während der latenten Infektion liegt das virale Genom als extrachromosomales Episom vor. In den Hauptorganen der Latenz – Lunge und Milz – kann in diesem Stadium eine sporadische geringe Synthese von *immediate early*-Proteinen gefunden werden. Die genauen Mechanismen der Induktion von Latenz, Aufrechterhaltung ebendieser und erneuter Reaktivierung sind bislang noch unbekannt [46-47].

Das Virus gelangt über den oralen Weg in die Speicheldrüsen des Wirts. Von dort aus wird es sowohl hämatogen als auch zell-assoziiert weiter verbreitet. Gefäßendothelzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Disseminierung des Virus in verschiedene Organsysteme. Virale DNA lässt sich aus vielen, auch histopathologisch unauffälligen, Zellen verschiedenster Organe extrahieren, wie z.B. aus Myokard, Leber, Milz, Lunge, Knochenmark und Niere. In

den Speicheldrüsen, Nieren und Nebennieren wiederum kann man regelhaft zytomegale Zellen finden. Im Blut liegt das Virus sowohl frei als auch zellgebunden vor (z.B. Endothelzellen, Granulozyten) [46]. Die Ausbreitung des Virus wird in erster Linie durch den Funktionszustand des Immunsystems bestimmt. Gebildet werden während der Primärinfektion spezifische IgM- und IgG-Antikörper; außerdem findet eine Induktion von virusspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen statt. Für die Kontrolle und Begrenzung der lytischen Infektion ist in erster Linie die zelluläre Immunantwort entscheidend. Die gebildeten Antikörper sind hauptsächlich gegen das Phosphoprotein pp65 gerichtet, welches die Hauptkomponente des Teguments darstellt. Gegen die Glykoproteine der Virushülle werden neutralisierende Antikörper gebildet, deren Rolle bei der Verhinderung der Primärinfektion, Reinfektion bzw. Reaktivierung und die Mutter-Kind-Übertragung des Virus jedoch unklar ist.

2.2.4 Das murine Zytomegalovirus (MCMV)

Da das Zytomegalovirus wie alle β -Herpesviren eine strikte Spezies-Spezifität aufweist, ist es nicht möglich, die Infektionsbiologie des humanen Zytomegalievirus anhand der Infektion von gängigen Labortieren zu studieren. Dementsprechend werden eng verwandte, tierpathogene Viren als Labormodelle verwendet. So existieren etablierte Tiermodelle für Mäuse, Ratten und Meerschweinchen. Hierbei stellt die Infektion von Mäusen mit dem murinen Zytomegalievirus (MCMV) das am häufigsten eingesetzte Tiermodell dar. Die Infektion mit MCMV im Mausmodell führt zur Etablierung einer Viruslatenz in immunkompetenten Mäusen [48]. Bei immundefizienten Mäusen resultiert eine MCMV-Infektion dosisabhängig in Erkrankungen mit letalem Ausgang wie z.B. einer Pneumonie, einer Hepatitis oder einer akuten Entzündung der Nebennierenrinden [49-51]. Wie beim Menschen lässt sich das Virus im MCMV-Modell durch Immunsuppression aus dem latenten Infektionsstadium reaktivieren [49, 52]. Insofern erfüllt das Mausmodell die wesentlichen Voraussetzungen, um die Infektionsbiologie der CMV-Infektion *in vivo* zu untersuchen.

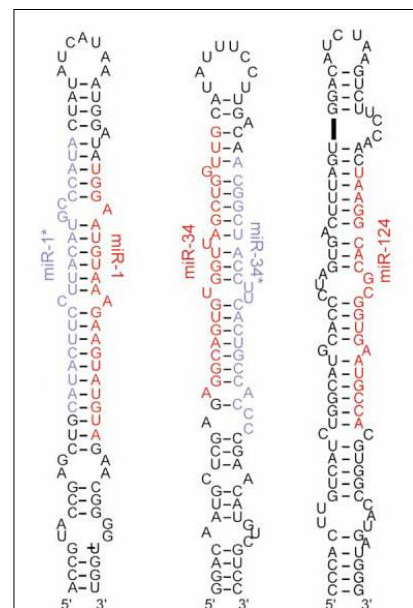
2.3 Micro-RNAs

2.3.1 Die Entdeckung von miRNAs und ihrer regulatorische Funktion

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine regulatorisch tätige RNA Moleküle, die erst 1993 entdeckt wurden. Damals wurde gezeigt, dass die miRNA *lin-4* des Fadenwurmes *C. elegans* die Larvenentwicklung des Nematoden steuert, indem sie das Gen *lin-14* reguliert [53-54]. *Lin-4* ist eine nicht kodierende, 21 Nukleotide lange RNA. Sie wird aus einem Vorläufertranskript mit Hilfe von zwei Prozessierungsschritten herausgeschnitten. Dieses Vorläufertranskript bildet aufgrund seiner Nukleinsäuresequenz eine Haarnadelstruktur aus.

Abb. 4: **Schematische Darstellung von pre-miRNAs**

Haarnadelstrukturen (pre-miRNAs) von pre-miR-1, pre-miR-34 und pre-miR-124 von *C. elegans*



Diese Entdeckung hielt man zunächst für eine Besonderheit des Nematoden. 1998 entdeckten Andrew Fire und Craig Mello die RNA- Interferenz (RNAi). Somit wurde zum ersten Mal ein molekularer Mechanismus beschrieben, bei dem exogene RNA Moleküle die Spaltung spezifischer Wirts-mRNAs mit perfekter Sequenz-Komplementarität induzierten [55]. Die Schlüsselrolle in

dem biologischen Prozess sprach man den siRNAs (short interfering RNAs) zu, die in ihrer Struktur den miRNAs gleichen [56]. Des Weiteren werden einige Teilschritte in der Biogenese sowie einige der beteiligten Effektorproteine von beiden gemeinsam genutzt [57-58]. Die Gruppe um Reinhart entdeckte 2000 eine weitere miRNA von *C. elegans*, *let-7* [59]. Erstaunlicherweise war diese miRNA evolutionär hoch konserviert, von dem Nematoden bis hin zum Menschen. Schon bald darauf wurden viele weitere miRNAs in einer ganzen Reihe von weiteren Organismen entdeckt, darunter Fliegen, Würmer und Säugetiere [57, 60-62]. Erst nach und nach wurde die große Bedeutung dieser kleinen nichtkodierenden RNAs erkannt. Inzwischen wurden mehrere tausende miRNAs sowie unzählige von ihnen regulierte Zielgene identifiziert. Hierzu wird ein breites Spektrum an unterschiedlichen Methoden angewandt, u.a. molekulare Klonierungen, bioinformatische Vorhersagen und Sequenzierungen. Schätzungen zufolge kodiert das menschliche Genom für ca. 1400 miRNAs, die zusammen etwa ein Drittel aller menschlichen Gene regulieren [12, 63]. Alle bislang bekannten miRNAs werden in einer öffentlichen Datenbank am britischen Sanger

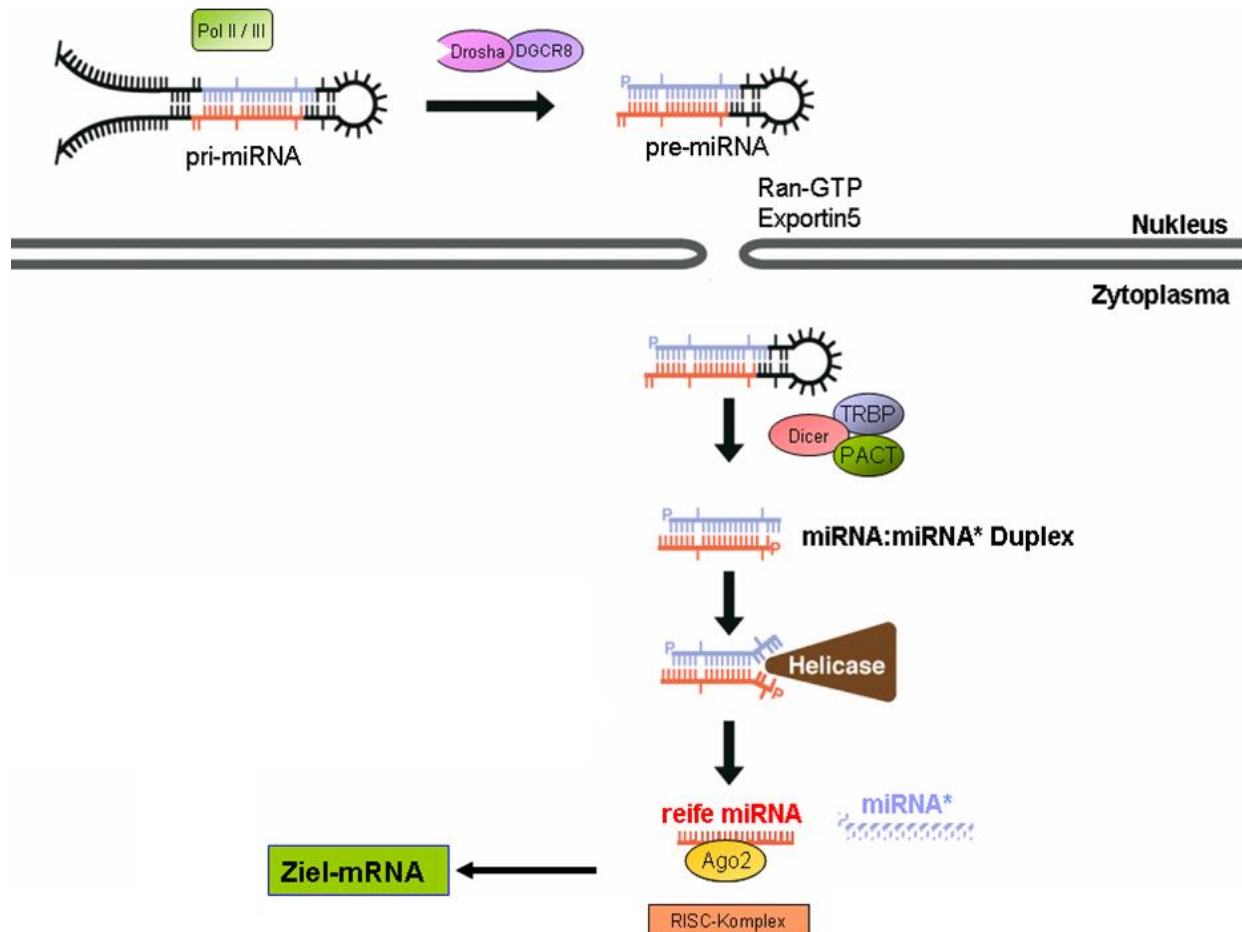
Institut archiviert (<http://microna.sanger.ac.uk>). MicroRNAs sind an der Regulation fast aller biologischen Prozesse beteiligt. So spielen z.B. miRNAs und ihre Prozessierungsmaschinerie eine essentielle Rolle bei der Embryogenese [64]. Sie sind beteiligt an der Entwicklung von Organen [65], Gliedmaßen [66] und Muskeln [67]. Ebenfalls essentiell sind sie für die Differenzierung von Stammzellen [64] und T-Zellen [68]. Bei einer Vielzahl von Krebsarten wurden miRNAs als Onkogene und Tumorsuppressorgene identifiziert [69]. Darüber hinaus sind sie an der Regulation des Immunsystems [70], der Zellzykluskontrolle [71] und vieler weiterer biologischer Stoffwechselprozesse beteiligt. Bei verschiedenen Krebsarten wurden charakteristische miRNA-Expressionsprofile identifiziert, welche als diagnostische Marker zur Klassifizierung benutzt werden können [72-73]. Da miRNAs an der Entstehung von diversen Krankheiten beteiligt sind wird aktuell versucht, sie therapeutisch zu nutzen. So können bereits synthetisch hergestellte Oligonukleotide, welche perfekt komplementär zu spezifischen miRNAs sind, sogenannte *AntagomiRe*, eingesetzt werden um die Aktivität von spezifischen endogenen miRNAs stillzulegen [74]. Erste Erfolge im Mausmodell zeigen, dass hiermit eine deregulierte miRNA-Expression wieder normalisiert werden kann [75].

2.3.2 Biogenese und Wirkungsweise von miRNAs

Die Biogenese der miRNAs erfolgt in mehreren Schritten, wie in Abb. 5 dargestellt. Sie beginnt im Nukleus der Zelle mit der Transkription einer sogenannten pri-miRNA, die eine pre-miRNA Haarnadelstruktur ausbildet. In der Mehrzahl der Fälle (ca. 80%) liegen diese Haarnadelstrukturen in Introns von Protein-kodierenden oder nicht-kodierenden Genen, einzeln oder in Form von Clustern [76]. Die Transkription des sogenannten pri-miRNA Transkripts erfolgt regelhaft durch RNA Polymerase II oder III. Anschließend wird die charakteristische pre-miRNA Haarnadelstruktur aus der pri-miRNA herausgeschnitten [77]. Dies erfolgt durch den Komplex aus Drosha und seinem Cofaktor DGCR8. Jetzt wird die pre-miRNA mittels des Ran-GTP/Exportin5-Systems aus dem Nukleus in das Zytoplasma der Zelle transportiert. Das RNase III Enzym Dicer spaltet die pre-miRNA im Komplex mit einem Argonaut-Protein (Ago) und TRBP. Es entsteht ein ca. 22 nt langer, doppelsträngiger miRNA-Duplex [78]. Die Helicase trennt den doppelsträngigen miRNA-Duplex auf. In der Regel wird einer der beiden Stränge präferentiell an ein Argonaute (Ago)-Protein gebunden [79]. Welcher der beiden miRNA Stränge in den sogenannten RISC (*RNA induced silencing complex*) inkorporiert wird hängt von der Stärke der Basenpaarung am jeweiligen 5'-Ende ab. Die miRNA, deren 5'-Basenpaarung schwächer und somit für die Helicase leichter zugänglich ist, wird bevorzugt in den RISC als funktionell aktive miRNA eingebaut. Die

andere miRNA (= miRNA* oder *passenger miRNA*) wird abgebaut. Weisen beide 5'-Enden eine ähnlich starke Basenpaarung auf, so werden beide miRNA mit der gleichen Wahrscheinlichkeit in den RISC eingebaut.

Abb. 5 : **Schema der miRNA Biogenese.** Erläuterung im Fließtext



Insgesamt wurden vier verschiedene Argonaut-Proteine bei Mensch und Maus identifiziert. Sie alleine sind bereits in der Lage, die Proteinsynthese zu inhibieren, wenn sie artifiziell an die 3'-UTRs von mRNAs angeheftet werden [80].

Die Aufgabe der miRNA im RISC ist also, die Spezifität der Regulation zu bestimmen. Hierbei führt bei Pflanzen und Tieren eine nahezu vollständige Komplementarität zwischen den Bindungsstellen von miRNA und mRNA zur deren Spaltung im RISC. Bei tierischen miRNAs kommt es allerdings weitaus häufiger zu einer Bindung von Zielgenen mittels imperfekter Basenpaarung in ihren 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTRs), was zu einer Hemmung der Translation und einer moderaten Herabsetzung der RNA-Stabilität der regulierten RNA führt. Als sogenannte „Seed-Sequenz“ werden hierbei die Nukleotide 2-8 am 5'-Ende der miRNA bezeichnet. Diese ist meist zu 100% komplementär zur

Erkennungsstelle der Ziel-mRNA und vermittelt zusammen mit einigen Basenpaarungen am 3'-Ende der miRNA die Spezifität der Zielgenerkennung [81]. Allerdings sind auch Ausnahmen beschrieben, wie z.B. die Erkennung der Ziel-mRNA über miRNA Bindungsstellen in der kodierenden Sequenz bzw. der 5'-UTR, oder über unvollständige SEED-Paarung [82-84]. Die unvollständige Basenpaarung und die geringe Größe der miRNA führen dazu, dass eine einzelne miRNA eine Vielzahl von mRNAs regulieren kann [63]. Auch kann umgekehrt eine einzelne mRNA von einer Vielzahl von miRNAs reguliert werden. Diese Begebenheit führt dazu, dass computergestützte Vorhersagen über miRNA-mRNA-Interaktionen extrem schwierig und fehlerbehaftet sind.

Der Mechanismus der Genstilllegung durch den miRNA-RISC Komplex ist gegenwärtig noch Gegenstand intensiver Forschung [4, 85]. Von den vier Mitgliedern der Argonauten-Subfamilie (Ago1-4) ist nur Ago2 in der Lage, die Ziel-mRNA zu spalten. Zudem ist Ago2 essentiell für die Maus [86-88]. Das Schicksal der gebundenen Transkripte ist abhängig vom Grad der Komplementarität zwischen der miRNA-Sequenz und der Ziel-mRNA-Sequenz. Besteht eine (nahezu) 100%ige Basenkomplementarität, so führt dies im Falle von an Ago2 gebundenen miRNAs zu einem Abbau der Ziel-mRNA durch Spaltung. Bei der jedoch weitaus häufigeren imperfekten Basenpaarung führt dies zu einer Inhibierung der Translation bei z.T. nur geringfügigem Effekt auf die RNA Stabilität [4-5]. Bislang wurden von diversen Arbeitsgruppen unterschiedliche Mechanismen publiziert. Ago-Proteine können z.B. an die Cap-Struktur der mRNAs binden und somit die Initiation der Translation stoppen [89-91]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Destabilisierung der miRNA-regulierten Transkripte eine weitaus größere Rolle spielt, als bisher angenommen [85]. Einige mRNAs werden durch die miRNA-induzierten Effekte schneller degradiert [92-93]. Eine Akkumulation von regulierten mRNAs in sogenannten „P-Bodies“ wird ebenfalls durch miRNAs induziert [94]. P-Bodies sind zytoplasmatisch prozessierte Aggregate, in welchen mRNAs gespeichert oder abgebaut werden können [95]. Deadenylierung und Entfernung der Cap-Struktur sind eng verknüpft mit dem Abbau der mRNAs [96-97]. Einmal akkumulierte mRNAs können auch wieder freigesetzt werden und sogar wieder aktiv werden, z.B. durch Stress [98-99]. Allerdings ist bislang nicht geklärt, welchen Beitrag die einzelnen Mechanismen zum Prozess der miRNA-Regulation leisten und wie genau sie ablaufen und reguliert werden.

2.3.3 Methoden der Identifizierung von Ziel-Genen viraler miRNAs

Die Identifikation von Ziel-Genen einzelner miRNAs ist prinzipiell mittels bioinformatischer Algorithmen möglich. Allerdings zeigte sich, dass dieser Ansatz schwieriger und fehlerbehaftet ist und zu einer Vielzahl falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse führt.

Die Vorhersage von möglichen Bindungsstellen zwischen einer miRNA und deren Ziel-mRNAs ist allein schon dadurch erschwert, dass bereits eine unvollständige Bindung zwischen beiden für eine effektive Regulation ausreichend ist. Aktuell entwickelte Algorithmen zur Identifikation von Ziel-Genen beruhen auf bestimmten Charakteristika, welche die Bindungsstellen zwischen miRNA und Ziel-mRNA aufweisen. Eine der wichtigsten Merkmale ist nach wie vor die obligatorische Seed-Region: Eine Sequenz von 6-8 Nukleotiden am 5'-Ende der miRNA, die eine perfekte Komplementarität zu der Bindungsstelle in der 3'-UTR der Ziel-mRNA aufweist. Die Seed-Region wird häufig von Adenosinen flankiert, wie eine Computeranalyse von konservierten miRNA Bindungsstellen zeigte [63]. Allerdings kann eine imperfekte Basenpaarung in der Seed-Region durch starke Paarungen am 3'-Ende der miRNA kompensiert werden, zudem ist hier die Ausbildung von G:U Basenpaarung möglich [100]. Wichtig ist eine ausreichende thermodynamische Stabilität der Bindung. Ein weiteres Merkmal ist die evolutionäre Konservierung der Bindungsstelle. Die Programme zur Vorhersage der miRNA Ziel-Gene sind ebenfalls im Internet frei verfügbar. *RNAhybrid* z.B. erlaubt die Vorhersage einer Bindungsstelle einer kurzen RNA an einer langer RNA und verlässt sich dabei in erster Linie auf die freie Bindungsenergie [101]. Andere Algorithmen wie *MiRanda*[102] und *TargetScan*[103] berücksichtigen hingegen alle oben genannten Kriterien. *PicTar* bezieht zusätzlich noch ontologische Informationen, wie z.B. die gleichzeitige Expression von miRNA und Zielgenen, in seine Vorhersage mit ein [104-105]. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist zudem die Sekundärstruktur der mRNA: Ihre Bindungsstelle und deren Umgebung muss ausreichend thermodynamisch instabil sein, so dass sie sich zugunsten der miRNA-Bindung auflösen kann [106]. Der Algorithmus *PITA* berücksichtigt dies [107]. Er verarbeitet ΔG -Werte, die Differenzen durch die frei gewordene Energie durch Auflösung der Sekundärstruktur und der dazugewonnenen Energie durch die miRNA Bindung.

Bioinformatische Vorhersagen ersetzen nicht die experimentelle Bestätigung von miRNA-mRNA Wechselwirkungen. Aufgrund der nur recht geringen Effekte von miRNAs auf die von ihnen regulierten Gene ist die experimentelle Validierung von potentiellen Ziel-Genen aber schwierig und zeitaufwendig. Zu Beginn dieser Studie standen zur Validierung von miRNA-Zielgenen im Wesentlichen Reporteranalysen zur Verfügung. Hierbei wird die zu untersuchende 3'-UTR mit einem Reporter gen fusioniert und anschließend die Auswirkung auf die miRNA-Expression untersucht. Ergänzende Ansätze sind die Verwendung von Inhibitoren der miRNAs oder von dsRNAs, welche die Funktion von miRNAs imitieren (*mimics*). Zudem ergänzen und verfestigen Mutationsstudien an miRNAs oder deren Bindungsstellen die gewonnenen Ergebnisse.

2.4 Herpesvirale microRNAs

Nachdem miRNAs und ihre Funktion im Laufe der Zeit in immer mehr Organismen entdeckt wurden, fand man 2004 die ersten viralen miRNA bei Herpesviren [108]. Inzwischen wurden allein bei den acht humanpathogenen Herpesviren mehr als 140 miRNAs nachgewiesen (siehe <http://www.mirbase.org>). Mit der Entdeckung von viral kodierten miRNAs betrat man Neuland in der molekularen Infektionsbiologie. Die Vorteile, die Herpesviren aus der Nutzung von kleinen, nicht-kodierenden RNAs ziehen können, erscheinen offensichtlich. Erstens sind miRNAs als einzelsträngige kleine RNA-Moleküle per se nicht immunogen. Sie bieten dem Virus eine Möglichkeit regulatorisch in das Genexpressionsprofil der latent infizierten Zelle einzugreifen und den Zellstoffwechsel auf eine für sie vorteilhafte Weise zu beeinflussen, ohne hierfür potentiell immunogene, virale Proteine bilden zu müssen. Zweitens ermöglichen miRNAs dem Virus eine außergewöhnliche funktionelle Flexibilität. Bereits eine einzige Punktmutation in der wichtigen Seed-Region der miRNA kann das Spektrum ihrer Ziel-Gene dramatisch verändern. Nicht zuletzt sind miRNAs extrem klein und nehmen folglich nur einen sehr geringen Platz im Genom in Anspruch. Bis heute weiß man nur sehr wenig über die tatsächliche Bedeutung von viralen miRNAs und über die Ziel-Gene von herpesviralen miRNAs ist ebenfalls kaum etwas bekannt [109]. Im Folgenden werden die Entdeckungen der letzten Jahre kurz zusammengefasst.

2.4.1 miRNAs bei Alphaherpesviren

Innerhalb dieser Unterfamilie fand man miRNAs bei den humanpathogenen Herpes-simplex Viren HSV-1 und HSV-2, sowie in den für Hühner pathogenen Marek's Disease Viren (MDV-1 und MDV-2 [110-112]). Die am besten untersuchten miRNAs sind die, welche im Bereich des Latenz-assoziierten Transkriptes (LAT) von HSV-1 liegen. Erstaunlicherweise wird hauptsächlich diese RNA vom Genom des HSV-1 transkribiert, während sich das Virus in Latenz befindet. Zwar wird diese RNA mit einer *Cap*-Struktur und einem Poly-A Schwanz versehen, jedoch kodiert sie offensichtlich für kein virales Protein [113]. Die viralen Proteine ICP0 bzw. ICP4, Aktivatoren der lytischen Infektionsphase des Virus, liegen antisense zu dem LAT-Transkript und werden effektiv durch zwei der LAT-kodierten miRNAs reguliert [114-115]. Aus diesem Grund wird angenommen, dass diese miRNAs an der Etablierung bzw. Aufrechterhaltung der latenten Phase von HSV-1 in infizierten Neuronen beteiligt sind [116].

Interessanterweise konnten trotz intensiver Anstrengungen bislang keine miRNAs beim Varizella-Zoster Virus (VZV) gefunden werden [116].

2.4.2 miRNAs bei Betaherpesviren

Auch Betaherpesviren besitzen miRNAs. So kodiert das Humane Zytomegalovirus (HCMV) insgesamt 22, bis dato entdeckte, miRNAs [117]. Eine Besonderheit ist, dass diese miRNAs über das ganze Genom verstreut liegen, während sie in anderen Herpesviren oft als Cluster in Latenz-assoziierten Regionen gruppiert sind. Im HCMV liegen sie auf den komplementären Strängen bekannter ORFs, in einem Intron oder in Bereichen zwischen Genen [118-120]. Bislang weiß man erst wenig über die Funktionen der miRNAs von HCMV. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die HCMV-miRNA miR-UL112 sowohl zelluläre, als auch virale Transkripte beeinflusst. Beispielsweise reguliert sie MICB (*Major Histocompatibility Complex Class I Related Chain B*) herunter, welcher ein NK-Zell Ligand ist und an der Immunantwort auf eine virale Infektion wesentlich beteiligt ist [83]. Vor diesem Hintergrund ist es umso interessanter, dass diese Interaktion funktionell konserviert ist, denn auch miRNAs von EBV und KSHV regulieren dieses Gen herunter, obwohl die beteiligten miRNAs untereinander keinerlei Sequenzhomologien aufweisen [121]. Der Transaktivator IE72 wiederum ist ein virales Ziel-Gen von miR-UL112. Möglicherweise erleichtert die Interaktion dem Virus den Übergang von der lytischen in die latente Phase oder verhindert unkontrollierte Reaktivierungen [122-123].

Mit der Identifikation von 18 pre-miRNAs des murinen Cytomegalovirus (MCMV) konnten wir und andere dieses als Tiermodell für die Untersuchung von CMV-miRNAs etablieren [7, 124]. Die miRNAs von MCMV und HCMV sind bezüglich ihrer Lage im Genom und ihrer Sequenz nicht konserviert. Allerdings liegen auch die MCMV-miRNAs entweder einzeln oder in Kleingruppen (bis zu vier pre-miRNAs) im MCMV-Genom verteilt. Eine weitere Besonderheit der miRNAs von MCMV und HCMV ist, dass sie vor allem in der lytischen Infektion gebildet werden und schon nach kurzer Infektionszeit einen sehr großen Anteil an der Gesamtheit aller miRNAs in der Zelle aufweisen (z.B. bis zu 61% aller miRNAs in MCMV-infizierten NIH 3T3 Fibroblasten 72h nach Infektion) [7].

Bislang sind die Funktionen von diesen miRNAs noch völlig unbekannt. 2010 zeigten wir in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Amy Buck aus Edinburgh, dass die zelluläre miRNA miR-27 während einer Infektion mit MCMV sehr schnell und äußerst spezifisch herunterreguliert wird [125]. Für miR-27 wird eine antivirale Wirkung postuliert. Gezeigt werden konnte ebenfalls, dass die Herabregulation post-transkriptionell geschieht und von der RNA-Synthese abhängig ist. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Abbau von miR-27 durch eine virale RNA (m169) verursacht wird und wichtig für die lytische MCMV-Infektion *in vivo* ist [126].

Des Weiteren konnten kürzlich bei HHV6B vier miRNAs identifiziert werden, die von den terminalen Repeat-Regionen exprimiert werden [127]. Zu HHV7 miRNAs liegen bisher noch keine Studien vor.

2.4.3 miRNAs bei Gammaherpesviren

Die miRNAs des Gammaherpesvirus EBV wurden schrittweise entdeckt. Zunächst fand man fünf pre-miRNAs, die in zwei verschiedenen genomischen Regionen gruppiert sind [108]. Die eine Gruppe umfasst die miRNAs miR-BHRF1-1, 2 und 3 und befindet sich in der mRNA des *BHRF-1* Genes. Die andere Gruppe umfasst miR-BART1 und miR-BART2 und liegt in der intronischen Region der *BART*-Transkriptfamilie. In weiteren Studien wurden die pre-miRNAs von miR-BART3-miR-BART22 entdeckt [128-130]. Insgesamt ist bislang nur wenig über die Funktionen der miRNAs von EBV bekannt. Drei der miRNAs regulieren das virale latente Membranprotein (LMP-1) herunter. LMP-1 ist als onkogenes Protein bekannt, welches durch die Interaktion mit einer Vielzahl von zellulären Signalwegen die Transformation der Zellen induziert. Es wurde von den Autoren postuliert, dass eine Herabregulation von LMP-1 mittels viraler miRNAs der Apoptose der infizierten Zellen entgegenwirkt, da LMP-1 apoptotische Eigenschaften besitzt. Ein weiterer Angriffspunkt ist die virale DNA-Polymerase BALF5, zu deren 3'-UTR die miRNA miR-BART2 vollständig komplementär ist [131]. Des Weiteren werden durch EBV-miRNAs auch zelluläre mRNAs reguliert: Diese sind z.B. das auf T-Zellen wirkende Chemokin CXCL-11, der Immunligand MICB und der p53 regulierte Apoptosemodulator (PUMA). Die postulierten Wirkungen waren jeweils immunmodulatorischer Art. Mittlerweile sind bei EBV 25 pre-miRNAs mit daraus entstehenden 44 reifen miRNAs bekannt.

Bei dem Gammaherpesvirus KSHV sind bislang 13 pre-miRNAs beschrieben. Durch bestimmte Prozessionsmechanismen entstehen hieraus 25 reife miRNAs {[132-134] und (<http://www.mirbase.org/>)}. Die Sequenzen einer Vielzahl dieser miRNAs sind hoch konserviert, was eine wichtige Funktion dieser miRNAs vermuten lässt [135-136].

2.4.4 Identifikation von miRNA Zielgenen mittels Immunopräzipitation von RISC-Komplexen gefolgt von Microarray Analysen (RIP-Chip)

In den letzten 2-3 Jahren wurden große Fortschritte bei der Identifizierung von miRNA Zielgenen erreicht. Mit der Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen einzelne Argonautproteine wurde die Immunopräzipitation von RISC-Komplexen, gefolgt von Microarray Analysen der RISC-gebundenen miRNA Zielgene (sogenannte RIP-Chip

Verfahren) möglich. Dies ermöglichte erstmalig hunderte von zellulären miRNA-Zielgenen mit hoher Spezifität zu identifizieren [137-142]. Diese Methode ermöglicht des Weiteren, quantitative Aussagen über das Ausmaß und die biologische Relevanz der Regulation einzelner Zielgene [11]. Vor kurzem konnten wir mit dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten RIP-Chip Protokoll über 150 Zielgene von KSHV und EBV identifizieren [11]. Diese Daten stellen den ersten größeren, wenn auch sicher nicht vollständigen, Atlas von viralen miRNA-Zielgenen dar. Allerdings gestaltet sich die Identifizierung der genauen miRNA-Bindungsstellen hiermit schwierig. Mit der Entwicklung von UV-Cross-linking Protokollen gefolgt von Immunopräzipitation und Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung (CLIP-Seq wie z.B. PAR-CLIP und HITS-CLIP) ist seit kurzem auch die direkte Identifikation der Bindungsstellen zwischen miRNAs und mRNAs möglich [126, 143-145]. Dies erlaubt die Identifizierung von zellulären und viralen Zielgenen auf systembiologischer Ebene. Die Kombination von RIP-Chip und CLIP-Seq wird in den nächsten paar Jahren hunderte, wenn nicht sogar tausende von Zielgenen viraler und zellulärer miRNAs identifizieren. Dies stellt die Grundlage für deren anschließende funktionelle Charakterisierung dar.

2.5 Vorarbeiten und Ziele der Arbeit

2.5.1 Die Identifizierung der MCMV miRNAs

Die Arbeitsgruppe um Dölken identifizierte 2007 insgesamt 18 durch MCMV kodierte miRNAs. Diese liegen, ähnlich den miRNAs von HCMV, mal einzeln, mal in Clustern diffus über das gesamte virale Genom verstreut (siehe Abb. 6). Es zeigte sich, dass die viralen miRNAs während der lytischen Infektion das zelluläre miRNA Profil dominieren. Ihr Anteil betrug 24h nach Infektion (p.i.) ca. 35%, bis 72h p.i. stieg dieser Anteil auf über 60% (siehe Abb. 7).

Abb. 6: **Schematische Darstellung des MCMV Genoms mit den identifizierten pre-miRNA Loci**

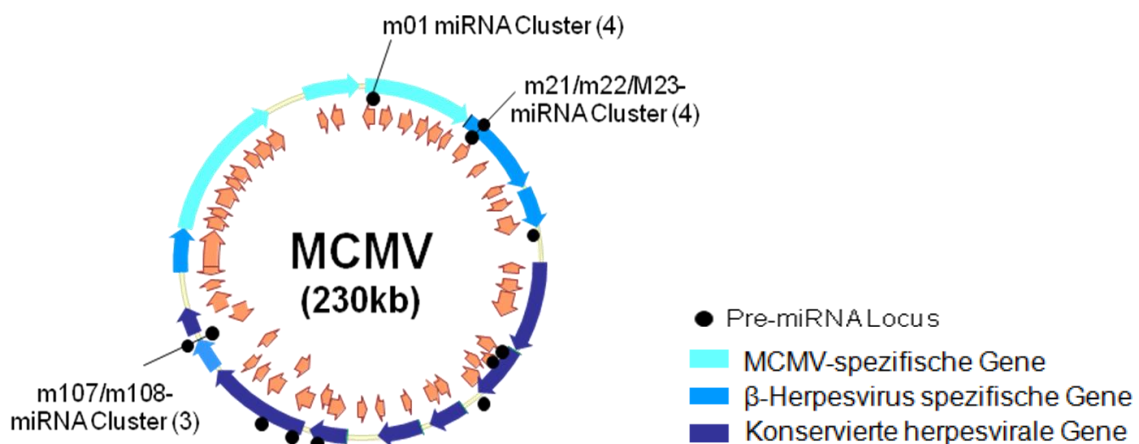
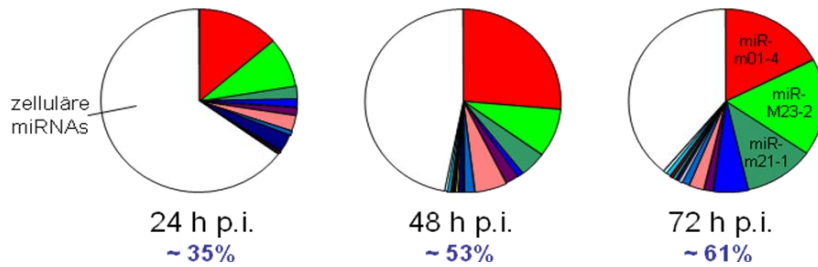


Abb 7: Expressionsprofil der zellulären und viralen miRNAs aufgeschlüsselt nach Stunden p.i.



Besonders hervor stachen die drei miRNAs miR-m01-4, miR-M23-2 und miR-m21-1, die zusammengenommen den größten Anteil der viralen miRNAs ausmachten. Es wurde daher vermutet, dass diese miRNAs während der lytischen Phase der Infektion eine nicht unerhebliche Rolle für das Virus spielen.

Um die Funktion dieser drei am stärksten exprimierten miRNAs zu ergründen, stellte die Gruppe Deletionsmutanten her, denen diese drei miRNAs fehlten. Im Falle der beiden miRNAs miR-m21-1 und miR-M23-2 wurde hierbei ein gemeinsamer Doppel-Knock-out durchgeführt, da diese beiden aus dem gleichen Cluster stammen und sich im Genom genau gegenüber liegen (siehe Abb 8).

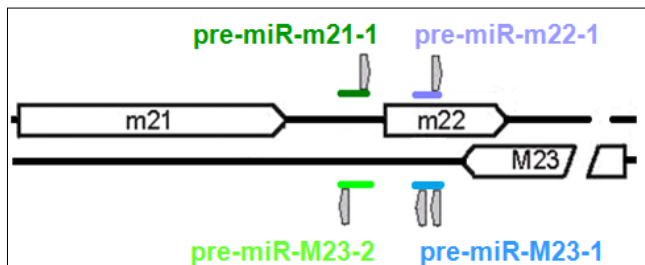


Abb. 8: Cluster der miRNAs miR-m21-1/M23-2.

Die unterschiedlich grünen Balken stehen für die pre-miRNA Sequenzen, die grauen Balken geben jeweils die Leserichtung und die Anzahl der fertigen miRNAs wieder. M21, m22 und M23 stehen für MCMV-Gene auf den beiden DNA Strängen. Die Lokalisation der vier pre-miRNAs sowie die jeweils gebildeten reifen miRNAs sind dargestellt.

Aufgrund des eingesetzten Klonierungsverfahrens (Ersatz der pre-miRNAs durch ein Antibiotikum-(Ab)-Resistenzgen flankiert durch zwei FRT-Sequenzen mit anschließender Entfernung der Ab-Resistenz mittels Flp-Rekombination), verblieben hierbei allerdings regelhaft mehrere hundert genomfremde Basenpaare im Genom der Virusmutanten. Eine komplette Revertierung der Mutanten war mit diesem Klonierungsverfahren nicht möglich. Da sich für die Deletionsmutante von mcmv-miR-m01-4 bisher kein Phänotyp in vivo

nachweisen ließ, wurde der Fokus der Arbeit auf die beiden MCMV-miRNAs miR-M23-2 und -m21-1 gelegt.

2.5.2 Ziele der Arbeit

Um die Funktionen der MCMV-miRNAs möglichst umfassend charakterisieren zu können wurde ein zweigleisiger Ansatz verfolgt. Zum einen sollten miRNA Knock-out Mutanten und die zugehörigen Revertanten der am stärksten exprimierten miRNAs konstruiert werden und diese daraufhin in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Stipan Jonjic (Kroatien) *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden. Zum anderen sollte die Immunpräzipitation von RISC-Komplexen etabliert werden, um mittels Microarray-Analysen (RIP-Chip) die darin gebundenen Zielgene der miRNAs zu identifizieren.

Der Arbeitsplan umfasste daher die folgenden zwei Hauptgebiete:

- 1.) Konstruktion von miRNA-Mutanten für die Testung *in vivo*
 - ➔ Revertierung der publizierten Deletionsmutanten mCMV Δ miR-m01-4 und Δ miR-M23-2/m21-1 mit der BAC-Recombineering Methode nach Warming [146]
 - ➔ Herstellung von subtileren Doppelmутanten von miR-M23-2 und -m21-1 mit stillen Mutationen ("traceless mutagenesis") sowie der zugehörigen Revertanten zur Bestätigung der beobachteten Phänotypen.
 - ➔ Umfassende Mutation des mCMV-miR-M23/m21 Clusters zur Clusteranalyse und Phänotypbestimmung *in vitro* und *in vivo* (siehe 2.)
- 2.) Identifikation von Zielgenen und Zielstrukturen der MCMV-miRNAs
 - ➔ Etablierung der Immunopräzipitation der RISC-Komplexe in MCMV-infizierten Zellen für Microarray Analysen (RIP-Chip)
 - ➔ RIP-Chip Analysen von verschiedenen MCMV-miRNA-Deletionsmutanten

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

ABI Prism 7000	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bakterienschüttler: Certomat® BS-1	Sartorius, Göttingen, D
	Kühner, Adolf AG, Schweiz
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg, D
Brutschrank (B5050E)	Heraeus, Instruments, Gera, D
Cell Strainer von Falcon	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Fotodetektionsgerät (EagleEye)	Bio-Rad, München, D
Gene Pulser™	Bio-Rad, München, D
Lichtmikroskop (Axiovert 25)	Zeiss Carl AG, Göttingen, D
Mikroliterpipetten:	Gilson, Middleton, USA
PCR-Thermocycler	Biometra, D
Rollator RM5	Karl Hecht GmbH und Co.KG, Sondheim, D
Stripettor	Costar, Bodenheim, D
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
ND-1000 Spectrophotometer	Nanodrop, USA
Vortex-Mischer	Bender/Hobein AG, Schweiz
Wasserbad F10	Julabo, Seelbach, D
Zählkammer	Neubauer, Marienfeld, D
Zentrifugen: Avanti™ J-26XP	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D
	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D
	Heraeus Sepatech, Gera, D
	Eppendorf, Hamburg, D
	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D
	Peqlab, Erlangen D
PerfectBlue™ Vertical electrophoresis System	

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Agarplattenschalen (9cm)	Grainer, Frickenhausen, D
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0.5ml, 1,5ml und 2ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Einmal Impfschlingen und –Nadeln	NUNC™, Dänemark
Falcon-Reaktionsgefäße (15ml und 50ml),	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Küvetten: Gene Pulser® Küvetten	Bio-Rad, München, D
	Brand, Wertheim, D
Einmalküvetten Plastikbrand®	Sarstedt, Nümbrecht, D
Mikroschraubröhrchen (1,5 und 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipetten	Biozym, Oldendorf, D
SafeSeal-Tips® Premium	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zellkulturlochplatten	

Zellschaber
Zellkulturschalen/-flaschen
Zentrifugenröhrchen (15 und 50ml)
Pipettenspitzen
Protein-G-Sepharose Kügelchen

Costar, Bodenheim, D
Becton Dickinson, Heidelberg, D
VWR International, USA
Fa. Peske GmbH und Co.KG, Aidlingen, D
GE Healthcare, München, D

3.1.3 Reagenzien

1kb Leiter
100bp Leiter
Agarose
Agar
Ampicillin
BSA
Bacto Trypton

Bacto Yeast Extract

Chloroform
Chloramphenicol
dNTP Mix
D(+)-Glucose-Monohydrat
Ethanol
EDTA
EDTA Ultrapure
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)
Glycerin
Glycin
Isopropanol
Kanamycin
Methylzellulose
NaCl
PBS
Phenol/Chloroform (Roti-Phenol/C/I)
(D+)Saccharose
Sodiumdodecylsulfat (SDS)
Superfect
TRIS
TRIS-HCl Ultrapure
TRIzol Reagens
UltraPure™ destilliertes H₂O

Universal Probelibrary, TaqMan Sonden
Yeast Extract
Zeozin

BioLabs, Frankfurt/Main, D
BioLabs, Frankfurt/Main, D
Invitrogen, Karlsruhe, D
Becton Dickinson, Heidelberg, D
Sigma, Deisenhofen, D
BioLabs, Frankfurt/Main, D
Gibco BRL, ehemals Karlsruhe, D
Bestellbar über Life Technologies, Darmstadt, D
Gibco BRL, ehemals Karlsruhe, D
Bestellbar über Life Technologies, Darmstadt, D
Carl Roth GmbH & Co, D
Sigma, Deisenhofen, D
BioLabs, Frankfurt/Main, D
Carl Roth GmbH & Co, D
Carl Roth GmbH & Co, D
Fluka, Karlsruhe, D
usb, Cleverland, USA
Carl Roth GmbH & Co, D
Carl Roth GmbH & Co, D
Carl Roth GmbH & Co, D
Merck, Darmstadt, D
Sigma, Deisenhofen, D
Sigma, Deisenhofen, D
Merck, Darmstadt, D
Invitrogen, Karlsruhe, D
Carl Roth GmbH & Co, D
Carl Roth GmbH & Co, D
Carl Roth GmbH & Co, D
Qiagen, Hilden, D
Carl Roth GmbH & Co, D
Becton Dickinson, Heidelberg, D
Invitrogen, Karlsruhe, D
Gibco BRL, ehemals Karlsruhe, D
Bestellbar über Life Technologies, Darmstadt, D
Roche, Mannheim, D
Becton Dickinson, Heidelberg, D
Sigma, Deisenhofen, D

6xDNA Ladepuffer

Fermentas, St. Leon Rot, D

3.1.4 Enzyme

Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer

New England BioLabs, D

T₄-DNA-Ligase

New England BioLabs, D

Taq-DNA-Polymerase

Roche, D

Antarktische Phosphatase

New England BioLabs, D

3.1.5 Kommerzielle Komplettsysteme (Kits)

Expand High Fidelity PCR detection System

Roche, D

PlasmidPrep Mini Spin Kit

GE Healthcare, illustra™, UK

Qiagen Plasmid Midi Kit

Qiagen, D

QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (150)

Qiagen, D

Qiaquick PCR Purification Kit

Qiagen, D

Nucleobond[®] AX, Plasmid DNA Purification Kit

Macherey-Nagel, Düren, D

miScript System Kit

Qiagen, D

miRNeasy-Kits

Qiagen, D

TransIT[®]-3T3 Transfektions Kit

Mirus, USA

3.1.6 Bakterienstämme

E. coli K12 DH10B

E. coli K12 SW102

3.1.7 Zellen und Zelllinien

3.1.7.1 Primäre Zellen

murine embryonale Fibroblasten (MEF)

3.1.7.2 Zelllinien

Murine Fibroblasten (NIH 3T3)

Murine Knochenmarksstromazellen (M2-10B4)

Murine Endothelzellen (SVEC4-10)

Murine Epithelzellen (TCMK-1)

3.1.8 Antikörper

Anti-mAgo2 (6F4) aus der Arbeitsgruppe Gunter Meister,

Max Planck Institut für Biochemie,

Am Klopferspitz, 82152 Martinsried

3.1.9 Oligonukleotide und Primer

Tab. 1: Primer und Oligonukleotide für PCR von Klonierungen

Primer und Oligonukleotide	Sequenzen
H5-miR-M23-2-galK/Kn H3-miR-M23-2-galK/Kn Homologien zum MCMV Genom sind fettgedruckt	5'- TCCCGGTTTCTTTGTCCGACGCTCGTTCGATCGAGGCGCTAGCC-AGTGTACAACCAATTAACC-3' 5'- CAGATAGACAGACAGGCTCAGTCTCATACCGTCGGCCATCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCA-3'
H5-miR-M23-rev H3-miR-M23-rev	5'-CGACAGAGAAGAGTCCCGACACCC-3' 5'-TCACCGCCTGCCTTCTGTTCA-3'
H5-galK/Kn-m22 H3-galK/Kn-m22 Homologien zum MCMV Genom sind fettgedruckt	5'- GACAAACAGACAGATAGACAGACAGGCTCAGTCTCATACCGTCGGCCATCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCA-3' 5'- ATCGGATCGGACGGACCGGACCGGACCGGACTGCTTGTCCGGCGGGTGTGCCAGTGTACAACCAATTAACC-3'
m22-for m22-rev SacI Schnittstellen sind unterstrichen, KpnI Schnittstellen sind fettgedruckt, EcoRV Schnittstellen sind kursiv	5'-GTGTGAGCTC <u>GATAT</u> TCCCGCCCGAATTCGCAGCAG-3' 5'-GTGT GGTACC <u>GATAT</u> TCCGCTCGAGGCCATGCTC-3'
pre-miR-M23-2-mut-s pre-miR-M23-2-mut-as Mutierte Nukleotide sind fettgedruckt	5'-TGC ACTCGGAGCAAGCTTCCTCCTATTGGCGAGACATTTAACCTGGATACCGTCTCGAT-3' 5'-CGATCGAGAC GGTATCCAGGGTTAAATGTCTCGCCAATAGGAGGAAGCTTGCTCCGAGTGCAC-3'
PM-M23-2-for PM-M23-2-rev	5'-AAAAAGCAGGCTATCGCCACCTTGTTAAGCCACCGCTTGACC-GAGGCCCCCATATTAGACCTACGC ACTCCAG-3' 5'-AGAAAGCTGGGTCTGGAGTGCCTAGGTCTAATATGGGGGCCCTCGTCAAGCGGTGGCTTAAACAAGGTGGCGAT-3'
AttB1-for AttB2-rev	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3' 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

Tab. 2: Primer und Sonden zur Quantifizierung von zellulären Transkripten mittels Light Cycler PCR

Sonden-Nummer	Name des Gens	Primer	Sequenzen
04688961001, #73	F-box protein 25 (Fbxo25)	Mu-Fbxo25-for Mu-Fbxo25-rev	5'-AGTCGGGAACATCAACATCTG-3' 5'-GAGGCCAGTGTTCCTGCT-3'
04692306001, #110	retinoic acid early transcript 1, alpha (Raet1a)	Mu-Raet1a-for Mu-Raet1a-rev	5'-AAGGTTGTGAGCTGCTCGAT-3' 5'-TGGCAATAGTGTGAGGAAAGGT-3'
04688015001, #42	retinoic acid early transcript 1, beta (Raet1b)	Mu-Raet1e&b-for Mu-Raet1b-rev	5'-TTCTACTGAGCTATGGATACACCAA-3' 5'-AGGATCTGCTGGGGTAGGAT-3'

04689054001, #82	retinoic acid early transcript 1, gamma (Raet1c)	Mu-Raet1c-for Mu-Raet1c-rev	5'-TGAAGAGGAAATATTATACCCAAGGA-3' 5'-CTGTAACCTCCAGTTCACAGGAT-3'
04685008001, #3	retinoic acid early transcript 1, delta (Raet1d)	Mu-Raet1d-for Mu-Raet1d-rev	5'-ACACCAACGGGCTAGATGAT-3' 5'-ACCCACGAAGCACTTCACTT-3'
04688015001, #42	retinoic acid early transcript 1, epsilon (Raet1e)	Mu-Raet1e&b-for Mu-Raet1e-rev	5'-TTCTACTGAGCTATGGATACACCAA-3' 5'-GATCCTTGATGGTCAAGTTGC-3'
04684982001, #2	immediate early response 3 (Ier3)	Mu-Ier3-for Mu-Ier3-rev	5'-CAGCCGAAGGGTGCTCTAC-3' 5'-AAATCTGGCAGAAGATGATGG-3'
04686993001, #25	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 (Cks2)	Mu-Cks2-for Mu-Cks2-rev	5'-CCCAAACTCATCTGATGTCC-3' 5'-TGGAAGAGGTCGTCTAAAGAGAA-3'
04688066001, #46	fatty acid binding protein 5, epidermal (Fabp5)	Mu-Fabp5-for Mu-Fabp5-rev	5'-ACGGCTTTGAGGAGTACATGA-3' 5'-CTCGGTTTTGACCGTGATG-3'
04692217001, #103	nuclear fragile x mental retardation protein interacting protein 1 (Nufip1)	Mu-Nufip1-for Mu-Nufip1-rev	5'-TCCAGAGGAGATTGCAAGATG-3' 5'-TTGGCCAGAGTTGGGTAGTT-3'
04688660001, #67	phenylalkaline Ca ²⁺ antagonist (emopamil) binding protein (Ebp)	Mu-Ebp-for Mu-Ebp-rev	5'-TGTCCCTACAGCTTGTGGTGTCT-3' 5'-AATAAACGGGGTGGCCTATC-3'
04688678001, #68	ribosomal protein L34 (Rpl34), transcript variant 1	Mu-Rpl34-for Mu-Rpl34-rev	5'-TGCCAAGTGTGTCCGTGA-3' 5'-GCCTTCAAGACTTTCACAACG-3'
04688678001, #68	ribosomal protein L34 (Rpl34), transcript variant 2	Mu-Rpl34-for Mu-Rpl34-rev	5'-TGCCAAGTGTGTCCGTGA-3' 5'-GCCTTCAAGACTTTCACAACG-3'
04687663001, #33	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D (Polr2d), transcript variant 1	Mu-polr2d-v1-for Mu-polr2d-v1-rev	5'-GGCTGGCGACGTAGAAGA-3' 5'-CAGAGTCTCCGCTGTCTCAA-3'
04685008001, #3	sestrin 1 (Sesn1)	Mu-Sesn1-for Mu-Sesn1-rev	5'-TGTCCCAACGTTTCGTGTC-3' 5'-TGGATAGAGACGATTCACCAGA-3'
04688520001, #55	SET und MYND domain containing 3 (Smyd3)	Mu-Smyd3-for Mu-Smyd3-rev	5'-GGCCCCACCTCTTACTGC-3' 5'-CATGTCCAGGTAGCAGATGGT-3'

Die Primer und zugehörigen Sonden wurden mit Hilfe des *Universal ProbeLibrary Primer Design Tools* von Roche (www.universalprobelibrary.com) erstellt.

3.1.10 Kulturmedien/Seren

Alle verwendeten Kulturmedien/Seren werden von der Firma INVITROGEN (GIBCO) bezogen.

3.1.10.1 Grundmedien

D-MEM (+4500mg/L-Glucose; + L-Glutamin; - Pyruvat)

RMPI 1640 (+ L-Glutamin)

3.1.10.2 Zusätze/Seren

D-PBS (-CaCl₂; -MgCl₂)

Fötale Rinder-Serum (FCS)

Neugeborenes Kälber-Serum (NCS)

Penicillin-Streptomycin Sulfat (100 IU/ml und 0,1 mg/ml)

Trypsin/EDTA (1x) (0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA; 0,85 g/l NaCl)

3.1.11 Antibiotika

Tab. 3: Antibiotika und deren eingesetzte Konzentration

Antibiotikum	Konzentration des Stocks	Eingesetzte Konzentration
Zeozin (Zeo)	30µg/ml	1:3000
Ampicillin (AMP)	50mg/ml	1:2000
Kanamycin (KAN)	25µg/ml	1:2000 bzw. 1:4000 (bei BACs)
Chloramphenicol (CAM)	100µg/ml	1:1000

3.1.12 Puffer und selbst hergestellte Medien/Nährböden

LB-Medium: 10g Bacto Trypton
5g Hefeextrakt
10g NaCl
Auffüllen mit ddH₂O auf 1l
Sterilisieren bei 121°C für 2,5h

LB-Agar: 7,5 Agar in
500ml LB Medium
Sterilisieren bei 121°C für 2,5h

Agarplatten: 5g Bacto Trypton
2,5g Hefeextrakt
4g NaCl
7,5g Agar
Auffüllen mit ddH₂O auf 500ml
Sterilisieren bei 121°C für 20min und bei +4°C lagern

1xTAE (Elektrophorese Puffer):

40mM TRIS Azetat
1mM EDTA

1xTBE (Elektrophorese Puffer für BAC-DNA):

90mM TRIS
90mM Borsäure
1mM EDTA, pH 8,3

3.2. Methoden

3.2.1 Arbeiten mit Bakterien

3.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in unterschiedlich großem Maßstab. Für eine analytische Minipräparation wurden die Bakterien standardgemäß in einer 10ml LB (lysogeny broth)-Kultur plus das entsprechende Antibiotikum in Glasröhrchen über Nacht kultiviert. Für eine Midipräparation galt das Entsprechende für 200ml LB-Kulturen in Erlenmeyerkolben.

Temperaturbedingungen:

E.coli DH10B: Kultivierung bei 37°C im Bakterienschüttler

E.coli SW102: Kultivierung bei 32°C im Bakterienschüttler

Bei dem Bakterienstamm SW102 musste darauf geachtet werden sie immer bei 32°C zu kultivieren, da dieser Stamm den defekten λ -Prophagen in seinem Genom stabil integriert hat. Hierbei sind die Prophagengene *exo*, *bet* und *gam* unter die Kontrolle des strengen Phagenpromoters *pL* gestellt. Dieser Promoter wiederum unterliegt der stringenten Kontrolle des temperatursensitiven Repressors *cl857*. Dementsprechend werden obige Prophagengene nicht exprimiert, solange die Bakterienkultur auf 32°C gehalten wird. Bei einem Temperaturwechsel der Bakterienkultur von 32°C auf 42°C für 15min wird die Expression der Prophagengene extrem schnell induziert; anschließend ist eine dadurch ermöglichte Homologe Rekombination äußerst effizient durchführbar.

3.2.1.2 Anfertigen von Glycerolstocks

An allen relevanten Punkten während der Klonierungen und der BAC-Mutagenese wurden von den erstellten Bakterienkulturen Glycerolstocks (20% Glycerol) angelegt. Dies ermöglicht ein Aufbewahren von Bakterienkulturen über Monate bis Jahre hinweg.

Hierfür wurden 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit jeweils 400 μ l 50%igem autoklavierten Glycerol gefüllt und anschließend 600 μ l der gewünschten Bakterienkultur hinzugegeben.

Lagerungstemperatur: -80°C

3.2.1.3 Transformation von Bakterien

Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen

Man beimpft 200ml LB plus Antibiotika (Ampicillin und Chloramphenicol) mit einer Bakterienvorkultur und lässt sie bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ schütteln. Verwendet wurden hierfür PIR-1 Bakterien. Von jetzt an werden nur noch gekühlte Geräte sowie gekühlte Pipettenspitzen verwendet und es muss darauf geachtet werden, die Bakterien während der gesamten Dauer der Präparation auf Eis zu handhaben. Nach einer Kühldauer

von 15min auf Eis wird die Bakteriensuspension bei 6000g in der vorgekühlten Zentrifuge bei 0°C pelletiert. Der Überstand wird anschließend verworfen, das Pellet mit 5ml eisgekühltem 10%igem Glycerol (autoklaviert) vorsichtig resuspendiert und anschließend weitere 100ml 10%iges Glycerol hinzugegeben. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt unter den gleichen Bedingungen wie vorher. Dieser Waschvorgang der Bakterien mit 10%igem Glycerol erfolgt insgesamt drei Mal. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird das Glycerol vorsichtig abgenommen und das Pellet in ca. 1ml 10%igem Glycerol resuspendiert. Zum Schluss erfolgt das Aliquotieren der Bakterien zu je 70 µl in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen und ein kurzes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff (N₂). Die Lagerungstemperatur beträgt -80°C.

Transformation mittels Elektroporation

Zunächst wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und dann anschließend pro Aliquot mit 2-4µl der zu transformierenden DNA (~10ng) gemischt. Das Bakterien-DNA-Gemisch wird anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette von GenePulser® (0,2µm Durchmesser) überführt und einem Hitzeschock ausgesetzt. Die Elektroporation wurde standardgemäß bei 2,5kV, 200Ω und 25mF durchgeführt. Sogleich anschließend wurde 1ml reines LB-Medium dazugegeben und alles in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bei 37°C lässt man die Bakterien nun 1h im Tischschüttler stehen. Zum Schluss werden 100µl der Suspension auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Selektionsantibiotika ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.2 DNA- und RNA-Techniken

3.2.2.1 Präparation von Plasmid- und BAC-DNA aus E.coli

Die DNA-Isolierung erfolgte immer nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [147]. Zunächst wird das aus einer Übernachtskultur durch Zentrifugation gewonnene Bakterienpellet mit einer Lösung resuspendiert, die aus Glucose, TRIS und EDTA besteht (kommerzielle Lösung, im jeweils aufgeführten Kit enthalten). Die Zellmembranen der Bakterien werden anschließend mittels Natriumdodecylsulfat (SDS) und NaOH aufgeschlossen. Letzteres stellt v.a. den pH-Wert des so gewonnenen Zellextraktes auf ein alkalisches Milieu ein. Proteine, aber auch chromosomale-, sowie Plasmid- und BAC-DNA denaturieren unter diesen Bedingungen, die Wasserstoffbrückenbindungen werden aufgelöst. Bei der anschließenden Neutralisation mittels Zugabe von Kaliumacetat fällt das SDS als schwer lösliches KDS (Kaliumdodecylsulfat) aus und zieht Proteine, chromosomale DNA und anderen Zelldetritus mit hinunter. Die Plasmid- bzw. BAC-DNA geht bei dem nun neutralen pH-Wert in ihre natürliche super-coiled Form über und verbleibt in der löslichen Phase. Durch anschließende

Zentrifugation kann sie von den ausgefallenen Zellbestandteilen getrennt, aufgereinigt und anschließend über eine Isopropanol/Ethanol-Fällung oder über kommerzielle Säulchen mit Silica-/Anionenaustauschermembranen entsalzt und konzentriert werden. Der Zusatz von DNase-freier RNaseA zum Resuspensionspuffer ermöglicht einen Abbau der ungewünschten und bei weiteren Analysen störenden RNA in der Probe. Zum Entsalzen und Konzentrieren einer DNA-Probe ist die Alkoholfällung die klassische Methode. Das Nukleinsäuregemisch wird mit einem monovalenten Salz versetzt und fällt bei anschließender Zugabe von Alkohol spontan aus. Durch Zentrifugation erhält man das DNA-Pellet, welches anschließend in einem geeigneten Volumen H₂O oder TRIS gelöst wird. Da Isopropanol Nukleinsäuren wesentlich effektiver fällt als Ethanol werden zunächst 0,6-0,8 Volumenanteil Isopropanol zu der Nukleinsäurelösung gegeben, gut gemischt und abzentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wird anschließend mit einem geeigneten Volumen 70%igem Ethanol gewaschen und abzentrifugiert. Ethanol verdampft wesentlich rascher und ist am Ende der Präparation somit Mittel der Wahl um die unerwünschten Alkohol-Rückstände so gering wie möglich zu halten.

Die BAC-Präparation erfolgte ebenfalls nach obigem Prinzip. Zu beachten gilt, dass das MCMV-BAC eine Größe von über 230kbp aufweist. Demzufolge musste bei allen Präparationen darauf geachtet werden Scherkräfte so weit als möglich zu unterbinden sobald die DNA zugänglich wurde, damit das BAC nicht brach. Im Speziellen bedeutete dies Pipettieren nur mit abgeschnittenen Pipettenspitzen, v.a. bei den Midi-Präparationen.

3.2.2.1.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Die Minipräparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem kommerziellen Kit „illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit“ von GE Healthcare nach Herstellerprotokoll.

Zusätzlich benötigt: Reines Ethanol, 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße

Dieses Kit verwendet Mini-Säulchen mit Silica-Membranen. Die Elution der DNA von der Säule erfolgt am Ende mit 100µl Elutionspuffer und Zentrifugation.

3.2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA (Midipräparation)

Die Midipräparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem kommerziellen Kit „Plasmid DNA Purification“ von Macherey-Nagel nach Herstellerprotokoll für „high-copy“ Plasmide.

Zusätzlich benötigt: Isopropanol, 70%Ethanol, TRIS-Puffer o. steriles H₂O

Dieses Kit verwendet spezielle auf Silica-basierte Anionenaustauschersäulen. Der Elutionspuffer wurde vor Gebrauch auf 50°C erwärmt um die DNA-Ausbeute zu erhöhen. An die Elution mit dem Elutionspuffer schließt sich eine Isopropanol/Ethanol-Fällung an. Die Resuspension des DNA-Pellets erfolgte mit 100-200µl TRIS (10mM, pH 7,5). Die DNA wurde zum Lösen über Nacht in einen Kühlschrank (4°C) gestellt. Es galt darauf zu achten, dass

die Alkoholrückstände möglichst klein waren, um anschließende Analysen und Experimente nicht zu gefährden.

3.2.2.1.3 Analytische Isolierung von BAC-DNA (Minipräparation)

Alle hierbei verwendeten Puffer stammten aus dem Plasmid-Midi-Kit der Firma Qiagen. Am Vortag wird eine Übernachtskultur von einer Agarplatte oder aus einem Glycerolstock in 10ml LB zusammen mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum angeimpft. Tags darauf werden die 10ml Impfkultur in 15ml Falcon-Tubes umgefüllt und dabei jeweils 600µl der Kultur für weitere Glycerolstocks abgezweigt. Der Inhalt der Falcon-Tubes wird abzentrifugiert (Heraeus, 3.500g, 15min). Anschließend wird der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 300µl Lösung I (25mM TRIS/HCl, 10mM EDTA, pH 8,0 - Resuspension) gründlich resuspendiert und die Zellsuspension in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zugabe von 300µl der Lösung II (0,2M NaOH, 1%SDS - Lyse) führt zur Lyse der Bakterien und Freisetzung der inneren Zellbestandteile. Das Reaktionsgefäß wird vorsichtig ca. 20-mal invertiert und nach 5min die Lösung III (3M KAc, pH 4,8 – Neutralisation) hinzugegeben. Wiederum wird das Gefäß ca. 20-mal vorsichtig invertiert und zur Neutralisation 10min auf Eis gestellt. Die Proben werden anschließend abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 14000rpm, 30min) um die ausgefallenen Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und in neue sterile 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Nach der Zugabe von 1ml Isopropanol wird kurz gemischt und es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (Eppendorf Tischzentrifuge, 14000, 25min). Der Überstand wird anschließend wiederum sorgfältig entfernt, das Pellet mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 14000rpm für 10min abzentrifugiert. Zum Schluss wird das Ethanol sauber abgenommen, das Pellet getrocknet und in 100µl ddH₂O gelöst (optional kann bei sehr kleinem Pellet die Menge des ddH₂O zur Resuspension geringer gewählt werden). Es empfiehlt sich die Zugabe einer geeigneten Menge RNaseA zum ddH₂O.

3.2.2.1.4 Präparative Isolierung von BAC-DNA (Midipräparation)

Hierbei wurden dasselbe Kit und dieselbe Vorgehensweise wie unter 3.2.1.4.3 angewendet.

3.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte aus kultivierten Zellen. Sie wurde mittels TRIzol-Reagenz (Invitrogen) aufgereinigt. Die Zellen wurden zunächst abzentrifugiert, anschließend mit 1ml PBS gewaschen und mit 1ml TRIzol pro 1×10^7 Zellen lysiert (5min bei RT). Dann wurden 200µl Chloroform zugegeben, die Proben vorsichtig für 15sec mehrfach invertiert und

weitere 2-3min bei RT inkubiert. Die lysierten Proben wurden bei 12.000g (4°C) 10min lang abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, die RNA mit 0,5ml Isopropanol pro eingesetztem Volumen an TRIzol gefällt. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation. Dann wurde die RNA in einem Zentrifugationsschritt (15min, 12.000xg, 4°C) sedimentiert, mit 80%igem EtOH gewaschen, getrocknet und in 50µl RNase-freiem Wasser gelöst.

3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und deren Reinheit

Um die Konzentration und die Reinheit einer DNA-Probe zu messen wurde das NanoDrop1000 verwendet. Es wurde sowohl bei der optimalen optischen Dichte (OD) von 260nm, als auch bei einer OD von 280nm gemessen. Eine Einheit bei OD₂₆₀ entspricht einer Menge von 50µg/ml doppelsträngiger DNA, bzw. 38µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA. Der Messwert bei OD₂₆₀ erlaubt eine Kalkulation des DNA-Gehalts, der Messwert bei OD₂₈₀ gibt Aufschluss über den Grad einer möglichen Verunreinigung mit Proteinen, da aromatische Aminosäuren eine besonders große Absorption bei OD₂₈₀ aufweisen. Somit kann man anhand der Ratio der beiden Messungen (260/280) eine Aussage über den Reinheitsgrad der Probe treffen. Ein Wert zwischen 1,8 und 2 weist auf gute Reinheit bei allenfalls schwacher Kontamination mit Proteinen oder Phenol hin.

3.2.2.4 Klonierungen und Konstrukt-Analysen

Unter Klonieren versteht man das Einfügen eines DNA-Fragments = „Insert“ (z.B. ein Gen) in einen Vektor (z.B. ein Plasmid). Durch anschließende Transformation der rekombinanten DNA in eine Wirtszelle (z.B. E.coli) kann besagte DNA ad libitum vermehrt werden.

3.2.2.4.1 Restriktionsenzymverdau und Aufreinigung

Standardverdau: *Verdau von Vektoren und PCR-Fragmenten*

Ein analytischer Verdau von Vektoren und PCR-Fragmenten mittels Restriktionsenzymen wurde in der Regel in einem Volumen von 20µl durchgeführt; das Volumen eines Verdau für die weitere Klonierung betrug 60µl. Dabei wurden pro 1µg DNA mindestens drei Einheiten der Restriktionsendonuklease hinzugegeben, sowie 1/10 der Menge vom Gesamtansatz an Restriktionspuffer. Es folgte eine Inkubation des Verdau für mindestens 1h im Tischinkubator, bei der für die verwendeten Enzyme optimale Temperatur. Bei Bedarf wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Enzyms gestoppt.

BAC-Verdau: Beim Verdau der BACs musste wiederum die enorme Größe an kbp beachtet werden. So wurde generell ein Volumen von 60µl gewählt. Um einen möglichst kompletten Verdau zu gewährleisten erfolgte dieser über Nacht. Eingesetzt wurden entweder 50µl einer

BAC-Minipräparation, oder ca. 3µg DNA einer Midipräparation, sowie generell 2µl des Restriktionsenzymes.

Die Aufreinigung des Restriktionsverdaus erfolgte in beiden Fällen mit dem Qiaquick PCR Purification Kit nach Herstellerprotokoll. Das Elutionsvolumen betrug standardmäßig 30µl.

3.2.2.4.2 Gelelektrophorese und DNA-Isolierung aus dem Gel

Für ein kleines analytisches/präparatives Gel wurde in der Regel eine Agarosekonzentration von 1% gewählt. 0,5g Agarose wurden mit 50ml TAE (TRIS-Azetat-EDTA)-Puffer versetzt, erhitzt und mit 2µl Ethidiumbromid (Ethidiumbromidlösung 10mg/ml TAE) versehen. Die Laufzeit des Gels betrug zwischen 30-40min bei 120V.

Um die großen BAC-Fragmente aufzutrennen wurden große Gele mit 0,8% Agarosekonzentration gegossen. 2,4g Agarose wurden mit 250-300ml TBE (TRIS-Borat-EDTA)-Puffer versetzt, aufgekocht und anschließend 10µl Ethidiumbromid (Ethidiumbromidlösung 10mg/ml TAE) hinzugegeben. Laufzeiten waren entweder 4-5h bei 140V oder besser über Nacht bei 80V/100mA bzw. 22h bei 65V. Den DNA-Proben wurden vor dem Lauf 0,17 Volumenanteile an DNA-Ladepuffer zugegeben. Unter UV-Licht (302nm Wellenlänge) wurde die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA anschließend sichtbar gemacht.

Präparation von DNA aus einem Agarosegel

In manchen Fällen wird nach dem Restriktionsverdaus nur ein bestimmtes DNA-Fragment benötigt, z.B. um es zu klonieren. Hierfür wird die gewünschte Bande, die unter UV-Licht sichtbar gemacht wird, aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des QIAEX[®] II Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die erhaltene DNA-Menge wurde photometrisch bestimmt.

3.2.2.4.3 Dephosphorylierung des Vektors

Um eine Religation des geschnittenen linearisierten Vektors zu vermeiden wurden die 5'-Phosphatreste mit Hilfe der Antarktischen Phosphatase entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgte mit der Antarktischen Phosphatase nach Herstellerprotokoll.

3.2.2.4.4 Ligation

Die Ligation von Vektor und Insert wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase erreicht. Das molare Verhältnis zwischen dem Vektor (100ng) und dem Insert betrug 1:3. Sofern nicht anders angegeben wurde folgender Ligationsansatz verwendet:

Ligationsansatz: 2µl T4-Ligase-Puffer
 1µl T4-Ligase
 100ng Plasmid DNA
 300ng Insert DNA
 Mit dH₂O auf 20µl auffüllen

Für eine Sticky-ends-Klonierung wurde der Ansatz für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Sollten Blunt-ends kloniert werden, so fand die Inkubation in der Regel bei 16°C über Nacht statt.

3.2.2.4.5 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) von großen Templates(> 1000 bp) wurden mit dem Expand High Fidelity PCR system (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieses Kit wurde ebenfalls benutzt, falls eine Korrekturleseaktivität von der verwendeten Polymerase gewünscht wurde. Für alle anderen PCR-Reaktionen wurde die GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) verwendet. Sofern nicht anders angegeben wurde dabei das folgende PCR-Programm verwendet:

94°C	5 min	} 20x
94°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10min	

Sofern nicht anders angegeben, wurde der unten stehende PCR Reaktionsansatz verwendet.

PCR-Reaktionsansatz: 5 µl PCR-Puffer (Promega)
 1 µl 10 mM dNTPs
 1 µl 10 µM forward Primer
 1 µl 10 µM reverse Primer
 1 µl GoTaq Flexi DNA Polymerase
 21 µl H₂O
 20 µl Template in H₂O (insgesamt ca. 200 ng)

Touch-down PCR Ansatz:

Hierdurch werden Primerdimere und Artefakte vermieden, es vermehrt sich fast ausschließlich das gewünschte Amplikon [148]. Diese erhöhte Spezifität ist von besonderer Bedeutung für Primer mit großen internen Homologien oder anderen Sekundärstrukturen,

wie sie für die Klonierung von BACs mittels Homologien benötigt werden. Die Zusammensetzung der Komponenten des PCR-Ansatzes bleibt gleich.

PCR-Programm: 95°C 4min
 94°C 1min
 75°C 1min; -1°C bei jedem Zyklus
 68°C 2min } 30x

anschließend: 94°C 30sec
 55°C 30sec
 72°C 1min
 72°C 5min
 4°C ---Ende } 30x

3.2.2.4.6 Oligoklonierung (Annealing von synthetischen Oligonukleotiden)

Sollte bei einer Klonierung nur ein relativ kleines Fragment in den Vektor eingebaut werden, so wurden synthetische komplementäre Oligonukleotide bei der Firma Metabion bestellt.

Annealing: Die Oligonukleotide wurden in einer jeweiligen Konzentration von 40µM zusammengegeben und bei 75°C für 5min inkubiert. Nach diesem Schritt folgte die Abkühlung der Proben für 30min bei RT. Für die anschließende Ligation wurde 1µl des Gemisches aufgereinigt. Die Ligation erfolgte nach obigen Angaben.

3.2.2.4.7 Sequenzierung

Um sicherzustellen dass alle Sequenzen wichtiger BAC Mutanten korrekt sind wurden diese sequenziert. Dies erfolgte durch die Firma Sequiserve (Vaterstetten).

3.2.2.5 Reverse Transkription und Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR (real-time PCR, qPCR)

3.2.2.5.1 Real-time PCR-Quantifizierung von miRNAs im Light-Cycler™

Die komplette RNA Präparation von nicht infizierten Zellen, welche zelluläre miRNAs, mRNAs und andere nichtkodierende sowie kodierende RNAs enthält, wird in einem Schritt in cDNA umgeschrieben. MiRNAs sind im Gegensatz zu mRNAs natürlicherweise nicht polyadenyliert. Während der reversen Transkription mit diesem Kit fügt eine

Poly(A)Polymerase den miRNAs und allen anderen nicht-polyadenylierten RNAs ein Poly(A)Ende hinzu (Schritt 1). Die Umschreibung der polyadenylierten RNAs (reife miRNA, mRNA, sowie Vorläufer-miRNAs und andere nichtkodierende RNAs) in cDNA erfolgt jetzt mittels eines Oligo-d(T)Primers, der an seinem Ende eine universelle Erkennungssequenz trägt. Dies ermöglicht es, dass zur Detektion vieler verschiedener miRNAs immer nur ein miRNA-spezifischer Primer vonnöten ist. Der andere Primer („Universal Primer“) bindet immer an die universelle Erkennungssequenz. Somit ist nur ein einziger cDNA-Ansatz vonnöten, um hunderte von miRNAs und mRNAs zu detektieren. Im Anschluss an die reverse Transkription erfolgt die quantitative PCR im Light-Cycler™ (Roche) mittels des miScript SYBR Green PCR Kits unter Verwendung eines miRNA-spezifischen Primers und des „Universal Primers“ (Schritt 2).

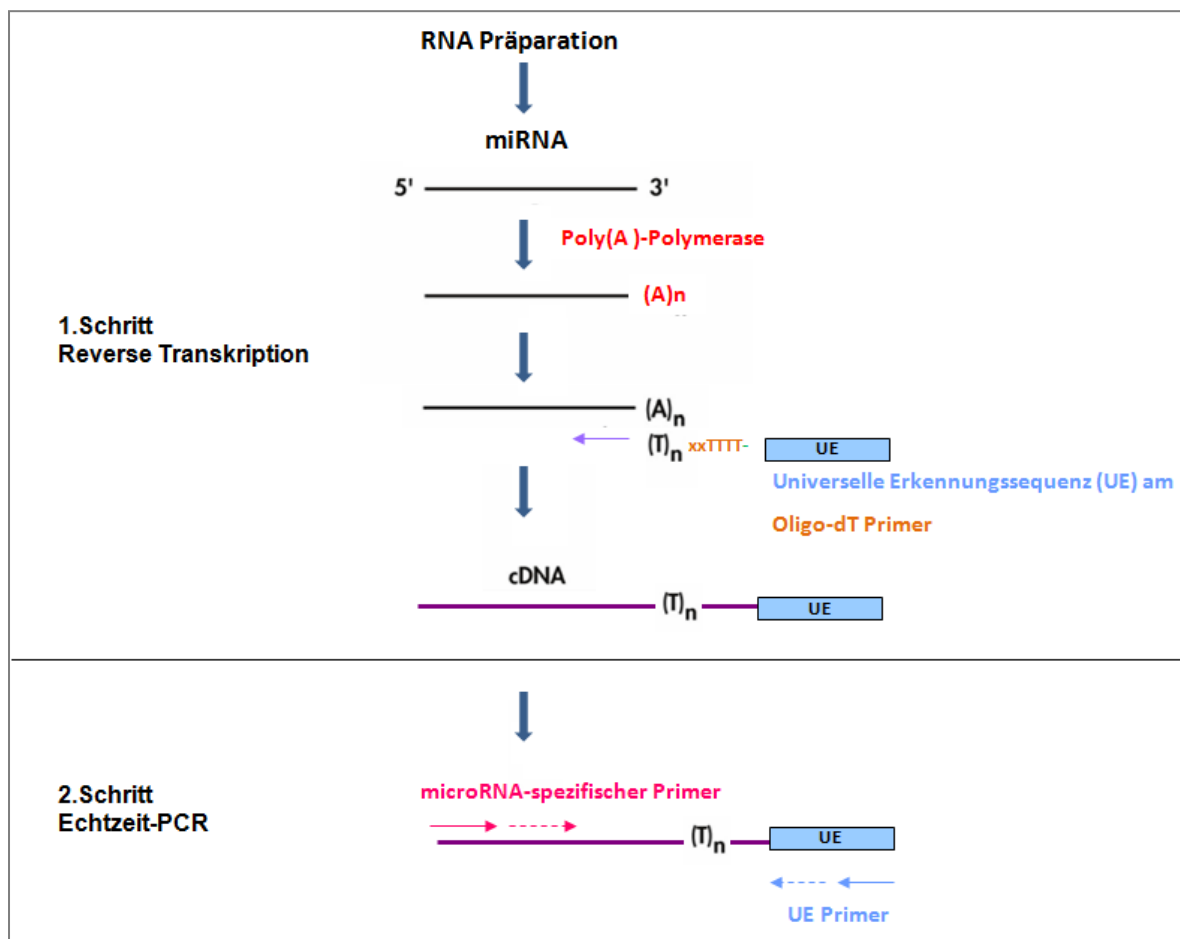


Abb. 9 : **Schematische Darstellung des miScript PCR Systems**

MiRNAs und andere kleine RNAs werden polyadenyliert und anschließend mittels eines Oligo-dT Primers in cDNA konvertiert. Der Oligo-dT Primer trägt an seinem Ende eine universelle Erkennungssequenz (UE). Somit benötigt die qPCR anschließend für jede beliebige miRNA lediglich einen miRNA-spezifischen Primer, der zweite bleibt gleich und bindet immer an die UE.

Bei jeder miRNA-Quantifizierung mittels qPCR wurden Kontrollen mitgeführt. Um akkurate und auch reproduzierbare Ergebnisse in der miRNA-Quantifizierung mittels qPCR erzielen zu können muss die Menge der Ziel-miRNA anhand einer passenden endogenen Referenz-RNA normalisiert werden. Dieser Vorgang wird als relative Quantifizierung bezeichnet. Als Referenz wurde das „house-keeping“ Gen (konstitutiv exprimiertes Gen) GAPDH verwendet. Gesamt-RNA und die aus den Ago2- und BrdU- Pull-Downs gewonnenen RNAs wurden mit Hilfe des miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen) in einem Schritt 3'-polyadenyliert und in cDNA umgeschrieben. Alle Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde 1µg Template-RNA verwendet und der Ansatz mit RNase-freiem Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 20µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde gemixt und bei 37°C für 60min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5min bei 95°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase.

Danach wurde der Echtzeit-PCR-Ansatz nach Herstellerangaben angefertigt. Das PCR Reaktionsvolumen betrug 20µl. Die PCR wurde im Light Cycler™ (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Kontrolle diente die zelluläre miRNA Let7a. Die Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem dazugehörigen Light-Cycler-Softwareprogramm und einer Ct-Wert Berechnung.

3.2.2.5.2 Real-time Quantifizierung von RNA Transkripten mittels TaqMan™ PCR

Die Isolierung der RNA aus den Zellen erfolgte anhand eines Trizol-Protokolls. Anschließend wurde die Umschreibung der RNA in cDNA mit der Superscript II reverse Transkriptase (Invitrogen) analog den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden jeweils 1µg RNA und 250ng Hexanukleotid Random Primer Mix (Promega) verwendet. Es folgte eine Verdünnung der cDNA mit ddH₂O im Verhältnis 1:5. Die Durchführung der Taq-Man PCR erfolgte im ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Alle TaqMan-Sonden entstammen der Universal ProbeLibrary (UPL) von Roche (www.universalprobelibrary.com). Diese Library basiert insgesamt auf 165 kurzen Hydrolyse-Sonden, welche jeweils eine Länge von 8 bis 9 bp besitzen. In diese Sonden werden sog. „Locked Nucleic Acids“ (LNA) eingebaut, um trotz ihrer Kürze eine ausreichend hohe Schmelztemperatur zu erreichen. Die LNAs sind chemisch modifizierte RNA Nukleotidanaloga mit einer deutlich erhöhten Bindungsstärke und somit signifikant erhöhten Schmelztemperatur gegenüber unmodifizierten Nukleinsäuren. Die erhöhte Thermostabilität wird erreicht, indem der Ribosering des Nukleotids mittels einer Methylbrücke zwischen dem 2'O-Atom und dem 4'C-Atom künstlich geschlossen wird. Aufgrund der Kürze der Sonden ist es wahrscheinlich, dass deren Sequenz in regelmäßiger Verteilung über das gesamte Transkriptom vorliegt. Somit kann man beinahe 100% aller Transkripte durch die Wahl von geeigneten Sonden

(aus den 165 angebotenen) detektieren. Die verwendeten Sonden tragen am 5'-Ende ein Fluorescein (FAM) und am 3'-Ende einen Dark Quencher Dye.

Mithilfe des „Assay Design Center“ von Roche (www.universalprobelibrary.com) wurden die jeweils am besten passenden Kombinationen aus Sonde und spezifischem Primerpaar ermittelt. Die Amplikons sind Intron-überspannend, um eine Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden

Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

94°C	12min	} 45x
95°C	20sec	
60°C	1min	
72°C	8min	

TaqMan-Reaktionsansatz:	5µl	cDNA
	12,5µl	TaqMan Universal Master Mix
	2µl	10µM forward Primer
	2µl	10µM reverse Primer
	0,25µl	TaqMan Sonde
	0,5µl	ROX Referenzfarbstoff (Invitrogen)
	2,75µl	H ₂ O

Eine Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Zyklus. Zur Datenanalyse wurde die ABI Prism 7000 Software herangezogen, welche einen Ct-Wert für jede Reaktion errechnet. GAPDH bzw. HPRT dienten zur Normalisierung.

3.2.2.6 Microarray-Analysen

Die Microarray-Analysen der RISC-Immunopräzipitationen wurden von Dr. Reinhard Hoffmann am Institut für medizinische Mikrobiologie der Technischen Universität München durchgeführt. Zunächst erfolgte die Qualitätskontrolle der RNA im Agilent Bioanalyser. Es wurden Affymetrix Microarrays nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurden die erhobenen Daten auf ihre Qualität überprüft und normalisiert.

3.2.3 Arbeiten mit der Zellkultur

Alle Arbeitsschritte, bei denen Zellkulturen zum Einsatz kamen wurden unter der Lamina Air Flow durchgeführt.

3.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Zelllinie	Basismedium	Zusätze	Splits/Intervalle
MEF	DMEM	10%FCS, 0,6% (w/v)Pen,1,3% (w/v)Strep	1:2/3-4 Tage
M2-10B4	RPMI	10%FCS, 0,6% (w/v)Pen,1,3% (w/v)Strep	1:6/3-4 Tage
NIH 3T3	DMEM	5% NCS, 0,6% (w/v)Pen,1,3% (w/v)Strep	1:6/3-4 Tage

Tab. 4: Übersicht über die in dieser Arbeit benutzten Zelllinien.

Es können die Zuordnung der Basismedien und deren Zusätze abgelesen werden. Die letzte Spalte gibt Aufschluss über das Splitverhalten und die Intervalle in denen diese jeweils durchgeführt wurden. Penicillin (Pen); Streptomycin (Strep)

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturschalen verschiedener Größe kultiviert, jeweils bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubatorsystem. Die Zellen wurden alle 3-6 Tage in einem Verhältnis von 1:2 bis zu 1:6 gesplittet (siehe Tabelle Nr.4).

Passagieren der Zellkultur: Zunächst wurde das alte Medium aus der Zellkulturschale abgesaugt, die Zellen mit 2-10ml 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde das Waschmedium abgesaugt und die Zellen mit 0,5-2ml Trypsin/EDTA für 1-2min im Inkubator inkubiert. Die durch diese Behandlung nicht mehr adhären Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert, was zugleich das Trypsin inaktiviert. Die gewünschte Menge an Zellen wurde in eine neue Zellkulturschale überführt, ausreichend Medium hinzugegeben und weiter inkubiert.

3.2.3.2 Auftauen von Zellen

Die Zellen werden - verpackt in Kryotubes - in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen werden sie in einem 37°C warmen Wasserbad so schnell wie möglich aufgetaut und mit 10ml des zugehörigen Mediums verdünnt, um das toxische DMSO, welches beim Einfrierungsprozess hinzugegeben wird, zu verdünnen. Anschließend werden die verdünnten Zellen bei 315g für 5min abzentrifugiert (Heraeus), mit 1xPBS gewaschen, nochmals mit denselben Bedingungen abzentrifugiert und anschließend in frischem Medium resuspendiert. So können sie jetzt in eine Zellkulturschale überführt und inkubiert werden.

3.2.4 Arbeit mit MCMV

Mit dem Virus wurde stets unter der Lamina Air Flow gearbeitet.

3.2.4.1 Herstellung von rekombinanten MCMV-BACs

Bacterial artificial chromosomes (BACs), die sogenannten „künstlichen Bakterien Chromosomen“, sind ein Durchbruch in der Geschichte der Molekularbiologie. Im Allgemeinen besteht ein BAC aus dem BAC-Backbone (BAC-„Rückgrat“) und der fremden DNA. Im BAC-Backbone sind immer ein ORI (origin of replication) - für die eigenständige Vermehrung des BACs - und eine Sequenz enthalten, die die episomale Lage des BACs definiert. Meistens wird dem Backbone auch noch ein Antibiotikumresistenzgen zur erleichterten Selektion hinzugefügt.

Diese Vektoren sind in der Lage eine enorme Menge an fremder DNA aufzunehmen; Fragmente bis hin zu 300kb sind beschrieben. Im Jahre 1997 gelang es der Gruppe um Messerle & Koszinowski erstmals das MCMV-Genom (der *Smith-Strain* Stamm) als ein BAC zu klonieren [149-150]. Wie sie zeigen konnten wurde das Genom als 230kb BAC in *E.coli* stabil inkloniert und eine Transfektion der BAC-Plasmide in eukaryotische Zellen führte zu einer produktiven Virusinfektion der Zellen. Der BAC-Vektor wurde in einen Genombereich inkloniert, der für die Replikation in der Zellkultur nicht essentiell ist. Wie sich allerdings herausstellte war das so konstruierte MCMV-BAC *in vivo* deutlich abgeschwächt, was darauf zurückzuführen war, dass bei der Insertion des BAC-Vektors virale Sequenzen deletiert worden waren, die evtl. am Voranschreiten der Infektion *in vivo* maßgeblich beteiligt sind. Zudem blieb das BAC-Grundgerüst im rekombinanten Virus erhalten und konnte so evtl. nicht voraussagbare Effekte hervorrufen. So konstruierte die Gruppe um Wagner et al 1999 einen weiteren MCMV-BAC-Vektor, der diesmal das komplette MCMV-Genom beinhaltet [151]. Die fehlenden viralen Sequenzen wurden wieder eingefügt. Zudem schuf man die Möglichkeit, nicht-virale Sequenzen aus dem rekombinanten Genom zu eliminieren: Man flankierte den BAC-Vektor mit kurzen identischen viralen Sequenzen. Somit wurde ein künstliches Substrat für die homologe Rekombination hergestellt, die sehr selektiv nur während der Virusrekonstitution in Zellen benützt wird. Durch mehrfaches Passagieren des rekonstituierten Virus in der Zellkultur erreicht man somit, dass man Virus ohne BAC-Gerüst erhält [151].

3.2.4.1.1 BAC-Mutagenese

In dieser Arbeit wurde das Ausgangs-MCMV-BAC **C3X** für die weitere Mutagenese verwendet. Dieses BAC enthält den MCMV *Smith Stamm* mit einer Chloramphenicolresistenz und wurde vormals als **pSM3fr** bezeichnet. Als Arbeitsmethode wurde das BAC-Recombineering mit galk-Selektion nach Warming et al [146] gewählt, modifiziert und im Labor etabliert. Eine Änderung bestand darin, nicht nur das galk-Gen zu

insertieren, sondern zusätzlich noch ein Kanamycin-Resistenzgen einzufügen, welches die effiziente Selektion der Klone deutlich erleichtert.

Beim BAC-Recombineering ist man in der Lage, BAC-DNA mittels der homologen Rekombination zu modifizieren [152-153]. Ermöglicht wird dies durch eine bestimmte Gengruppe des λ Red-Phagens: *exo*, *bet* und *gam*. *Exo* kodiert für eine 5'-3' Exonuklease, die einen 3'-Überhang bei einer eingebrachten doppelsträngigen DNA-Ziel-Kassette produziert. *Bet* wiederum kodiert für ein Paarungsprotein. Dieses bindet den 3'-Überhang der Zielkassette und vermittelt deren Annealing sowie deren homologe Rekombination mit dem komplementären DNA-Abschnitt des BAC-Vektors. Zur gleichen Zeit wird durch das Genprodukt von *gam* erreicht, dass die lineare Ziel-Kassette nicht durch die RecBCD Exonuklease abgebaut wird, denn *gam* kodiert für den Inhibitor der E.coli Exonuklease.

Für diese Arbeit wurde der Bakterienstamm **SW102** gewählt. Dieser exprimiert die Phagengene von einem stabil integrierten defekten λ -Prophagen, dessen *exo*-, *bet*- und *gam*-Gene dem strengen Phagenpromoter pL unterliegen. pL wiederum wird von dem temperatursensitiven Repressor cI857 kontrolliert [146, 154-155]. Somit werden im Prophagensystem die obigen drei Gene nicht exprimiert, solange die Bakterien bei 32°C kultiviert werden; bei einem Wechsel der Temperatur auf 42°C reicht die kurze Zeitspanne von 15min aus, dass diese Gene extrem schnell und auf einem sehr hohen Level exprimiert werden. Die dadurch ermöglichte homologe Rekombination ist sehr effizient.

Ziel ist es, an der zu mutierenden Stelle des BAC-Genoms die galK/Kn-Kassette zu platzieren, die sozusagen als Platzhalter dient. Sie kann anschließend durch beliebige Konstrukte ersetzt werden, wenn diese am Anfang und Ende ihrer Sequenz die passenden Homologien tragen. Diese Art der Klonierung wird auch *traceless mutagenesis* („Spurlose Mutagenese“) genannt, weil sie – im Gegensatz zu anderen herkömmlichen Klonierungsverfahren (z.B. FRT Klonierung) – kein genomfremdes Material zurücklässt.

3.2.4.1.2 Positiv- und Negativselektion anhand der galK/Kn-Kassette

Prinzip der positiven Selektion:

Der SW102 Bakterienstamm besitzt das inkomplette Galaktose Operon mit den Genen *galE*, *galT* und *galM*. Das **galK** Gen wurde präzise deletiert. Durch das künstliche Einbringen der galK/Kn-Kassette wird das Operon jetzt verkomplettiert. Dies ermöglicht es den Bakterien Galaktokinase zu bilden, welche essentiell für die Galaktoseverstoffwechslung ist.

Der MacConkey-Agar ist ein Selektivagar für gramnegative Bakterien; Gallensalze und Kristallviolett hemmen weitgehend das Wachstum grampositiver Bakterien. Laktose zusammen mit dem pH-Indikator Neutralrot dienen zum Nachweis von Laktoseabbau;

demzufolge besitzen laktosefermentierende Bakterienkolonien eine rote Farbe. Dadurch kann anhand der Farbe der Kolonien unterschieden werden, ob diese die galK/Kn Kasette besitzen (rote Koloniefarbe) oder nicht (weiße Koloniefarbe). Zusätzlich wurde dem Agar Kanamycin hinzugefügt. Das Antibiotikum erhöhte den Selektionsdruck, neben dem Auswahlkriterium rote Farbe (**galK/Kn**) sollten so nur die Bakterien wachsen, die das Kanamycin-Resistenzgen in sich trugen (**galK/Kn**).

Prinzip der negativen Selektion:

Die M63-minimal-Platten enthalten eine extrem geringe Anzahl an Nährstoffen. Wenn Bakterien auf diesen Platten kultiviert werden, so werden sie gezwungen starke Verstoffwechslung der vorhandenen Substrate zu betreiben. In den Minimal-Platten ist das Galaktose-Analogon 2-Desoxy-Galaktose (DOG) enthalten. Die Galaktokinase kann auch das Analogon effizient umsetzen, das Produkt daraus jedoch kann nicht weiter metabolisiert werden. Konsekutiv kommt zu einer toxischen Anreicherung von 2-Desoxy-Galaktose-1-Phosphat. Dadurch werden Bakterien die die galK/Kn-Kasette enthalten in ihrem Wachstum gehemmt, sie sterben ab und es findet so eine negative Selektion statt.

Vorarbeit:

Für die Amplifikation der galK/Kn Kasette wurden Primer mit jeweils 50 Homologien zur gewählten Zielsequenz im BAC-Genom bestimmt. Anschließend wurde die PCR über die galK/Kn Kasette auf dem Template-Plasmid pGPS::galK-Kn durchgeführt. Verwendet wurden hierfür das Touch-down Protokoll sowie eine Polymerase mit Korrektoreigenschaft. Das PCR-Produkt wurde mit dem Qiaquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Des Weiteren wurden die Sonderplatten für die Selektionsschritte gegossen und das M9-Medium hergestellt (s. Tab. 5).

Tab. 5: Herstellung der Medien und Sonderplatten für die BAC Mutagenese

Sonderplatten	Herstellung
MacConkey Platten + 1 % Galaktose	10 g MacConkey Agar werden zu 225 ml H ₂ O _{bidest} gegeben und autoklaviert; bei Erreichen einer Temperatur von 50 °C wird zugegeben : 25 ml Galaktose 25 µg/ml Chloramphenicol
M63 minimal Platten + 0.2 % Glycerol	4 g Agar werden zu 200 ml H ₂ O _{bidest} zugegeben und autoklaviert; bei Erreichen einer Temperatur von 50 °C wird zugegeben: 50 ml 5x M63 Salz 0.5 ml MgSO ₄ 1.25 ml D-Biotin 1.1 ml L-Leucin 5 ml Glycerol 5 ml 2-Deoxy-Galaktose (DOG) 25 µg/ml Chloramphenicol

Substanz	Konzentration & Zusammensetzung	Behandlung
M9 medium	<u>für 1 L:</u> 6 g Na ₂ HPO ₄ 3 g KH ₂ PO ₄ 1 g NH ₄ Cl 0.5 g NaCl	Autoklavieren
5x M63 Salz	<u>für 1 L:</u> 10 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 68 g KH ₂ PO ₄ 2.5 mg FeSO ₄ * 7H ₂ O mit KOH auf pH 7 einstellen	Autoklavieren
Galaktose	10 %	Autoklavieren
Glycerol	10 %	Autoklavieren
2-Deoxy-Galaktose (DOG)	10 %	Immer frisch herstellen und anschließend steril filtrieren
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1 M	Steril Filtrieren
D-Biotin	0.2 mg/ml	Steril Filtrieren
L-Leucin	10 mg/ml	Aufheizen, abkühlen lassen und dann steril Filtrieren

Erstes Targeting/Positive Selektion:

- 1.) Es wird eine 10ml Übernachtskultur der Ausgangsbakterien (SW102-C3X) mit Chloramphenicol (CAM) angeimpft und bei 32°C über Nacht in den Schüttler gestellt. Zusätzlich wird ein Erlenmeyerkolben mit 100ml LB-Medium ohne Zusätze befüllt und ebenfalls bei 32°C inkubiert. Eine Flasche mit autoklaviertem dH₂O wird kühl gestellt, Pipettenspitzen und Plastikpipetten, zwei 15ml Falcon-Tubes, Eppendorf-Reaktionsgefäße, sowie eine ausreichende Anzahl Elektroporationsküvetten werden im Gefrierschrank gekühlt.
- 2.) Am nächsten Tag werden 2ml aus der Übernachtskultur in den Erlenmeyerkolben mit den 100ml LB überführt und solange bei 32°C im Schüttler inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine OD_{600nm} von 0,55-0,6 erreicht hat. Gleichzeitig wird ein Wasserbad mit Schüttelfunktion auf 42°C erhitzt und ein leerer Erlenmeyerkolben hineingestellt um diesen anzuwärmen. Sobald die Bakteriensuspension die optimale optische Dichte erreicht hat, werden 10ml in den vorgewärmten Erlenmeyerkolben transferiert und für exakt 15min im schüttelnden Wasserbad bei 42°C gehalten. Hierdurch erfolgt die Induktion der Phagengene. Von der restlichen Suspension werden 10ml abgezweigt, die nicht hitzeinduziert werden und somit als Kontrolle dienen. Sowohl die induzierte als auch die nicht-induzierte Bakteriensuspension wird anschließend für mindestens 10 min auf Eis kühl gestellt.
- 3.) Beide Bakteriensuspensionen werden jeweils in ein vorgekühltes 15ml Falcon-Tube gegeben, bei 5000g und 0°C 5min lang abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand entfernt und das Pellet in 1ml eisgekühltem ddH₂O vorsichtig resuspendiert. Nach der Zugabe von weiteren 9ml eisgekühltem ddH₂O folgt ein erneuter Zentrifugations- und Waschschrift. Es wird insgesamt dreimal mit den gleichen Bedingungen zentrifugiert und gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird der Überstand so abgekippt, dass ca. 200-250µl der Bakteriensuspension im Falcon-Tube verbleiben. Die Bakterien werden zu je 60-70µl in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert. Bei allen Schritten muss mit den Bakterien auf Eis umgegangen werden!
- 4.) Zu den aliquotierten Bakterien werden jeweils 2-4µl des aufgereinigten galk/Kn-PCR-Produktes gegeben und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette transferiert. Die Elektroporation wurde standardgemäß bei 2,5kV, 200Ω und 25mF durchgeführt. Sogleich anschließend wurde 1ml reines LB-Medium dazugegeben und der Elektroporationsansatz in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bei 32°C lässt man die Bakterien nun 1h im Tischschüttler stehen. Im Anschluss werden die Bakterien vorsichtig abzentrifugiert und in 100µl LB resuspendiert. Diese 100µl

werden dann auf die selbst hergestellten MacConkey-Platten mit CAM-Antibiotikum ausplattiert und bei 32°C über Nacht inkubiert.

- 5.) Am Tag darauf werden rote Einzelkolonien gepickt, nochmals auf dem gleichen Plattentyp ausgestrichen und für 2-3 Tage bebrütet. Davon werden wiederum rote Einzelkolonien gepickt und mit ihnen 10ml LB Flüssigkulturen angelegt (32°C über Nacht). Von diesen Suspensionen werden tags darauf Glycerolstocks angelegt und eine analytische Isolierung von BAC-DNA (Minipräparation) durchgeführt. Die BAC-DNA wird mit einem geeigneten Set an Restriktionsenzymen auf ihre Richtigkeit hin untersucht. Dabei wurden die Restriktionsenzyme so gewählt, dass jeweils ein unterschiedliches Bandenmuster in der Gelelektrophorese entstand, je nachdem ob der Klon das gewünschte Insert trug, oder nicht (siehe z.B. Abb. 17).

Eine gewisse Anzahl (15-20 Stück) von richtig erscheinenden Bakterien wird sequenziert und somit die korrekte Position der galK/Kn-Kassette, sowie die korrekte Sequenz des BACs verifiziert.

Zweites Targeting/Negative Selektion:

Zunächst wird die DNA-Sequenz hergestellt, gegen welche die „Platzhalter“-galK/Kn-Kassette ausgetauscht werden soll. Diese kann sowohl mittels PCR synthetisiert werden, als auch via Oligo-Klonierung oder kommerzieller Synthetisierung. Wichtig ist, dass an beiden Enden der Sequenz die 50bp der flankierenden Homologien zu der galK/Kn-Kassette zu finden sind. Es gilt: Je länger die einzufügenden Sequenzen sind, umso länger müssen auch die flankierenden Homologien gewählt werden. Nach einer Aufreinigung des Inserts sind diese einsatzfähig.

- 1.) Es werden die Klone als Ausgangsbakterien gewählt, deren Sequenzen sich in der Sequenzierung als korrekt erwiesen haben. Hiermit wird wiederum eine 10ml LB-Kultur beimpft und über Nacht inkubiert (32°C).
- 2.) Tags darauf wird mit dieser Suspension verfahren, wie unter Schritt 1-6 beschrieben, um sie elektrokompent zu machen.
- 3.) Zu den Eppendorf-Reaktionsgefäßen werden dann 200ng-1,5µg des aufgereinigten Inserts gegeben und der Inhalt dann anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette transferiert. Die Elektroporation wird wieder standardgemäß bei 2,5kV, 200Ω und 25mF durchgeführt. Anschließend wird den Bakterien in der Küvette 1ml reines LB-Medium zugegeben und sie werden in 50ml Falcon-Tubes transferiert, welche bereits 9ml reines LB-Medium enthalten, das auf 32°C vorgewärmt wurde. Die Falcon-Tubes werden für 4,5h in den 32°C Schüttler gestellt.

Das LB-Medium ohne Zusätze und die lange Inkubationszeit sind nötig, damit die Bakterien ohne Selektionsdruck wachsen können und man nicht die Bakterien herausselektiert, die mehrere BAC-Plasmide enthalten.

- 4.) Aus den Falcon-Tubes werden dann 1-2ml der Kultur entnommen und in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt mit 13.000rpm und 15min bei RT. Anschließend wird der Überstand sauber abgenommen und das Bakterienpellet mit 1ml M9-Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift wird insgesamt noch zwei Mal wiederholt.
- 5.) Am Ende wird das Pellet in 1ml M9 Medium resuspendiert. Es werden verschiedene Verdünnungsstufen auf den M63-minimal-Platten mit DOG ausplattiert. Die Waschschriffe mit M9-Medium bewirken, dass die reichhaltigen Nährstoffe aus dem LB-Medium entfernt werden, damit eine saubere Selektion durch die Minimal-Platten gewährleistet werden kann.
- 6.) Die Platten werden dann bei 32°C für 2-4d in den Inkubator gestellt. Anschließend werden sie noch mehrmals ausgestrichen (u.a. auf MacConkey: diesmal werden die weißen Kolonien gepickt!) um saubere Einzelkolonien zu erhalten. Es folgt die Glycerolstockherstellung und die analytische Minipräparation wie unter 10.) beschrieben.

Zum Schluss wird die korrekte Mutagenese mittels Sequenzierung (GATC Biotech) kontrolliert.

3.2.4.2 Virusrekonstituierung

Die Rekonstituierung des Virus aus Wildtyp (wt) und mutierten (mut) MCMV-BACs erfolgte mittels Transfektion von halb-konfluent gewachsenen MEF-Zellen in einer 6cm Kulturschale. Der gesamte Vorgang wurde unter sterilen Bedingungen unter der Easyflow durchgeführt. Die Transfektion erfolgte mittels Superfect Transfektionsreagenz (Qiagen) nach Herstellerangaben. Zu 1,5µg aufgereinigter BAC-DNA werden 150µl Zellmedium (ohne Zusätze) hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 10µl Superfect Reagenz wird der Mix vorsichtig, aber gründlich, ein weiteres Mal gemischt. Es schließt sich eine Inkubation von 10-15min bei RT an. Danach werden die Proben mit Zellmedium (mit Zusätzen) auf 1ml aufgefüllt. Die MEF-Zellen werden mit PBS gewaschen und die BAC-DNA/Superfect-Mischung wird jetzt hinzugefügt. Es wurden immer mindestens zwei unabhängige BAC-Klone in zwei Replikaten transfiziert. Es folgt eine Inkubation im Zellinkubator für mindestens 2,5 Stunden. Nach ca. 3-4 Stunden wird der Transfektionsmix

gegen vorgewärmtes, mit Zusätzen versehenes, Zellkulturmedium ausgetauscht. 24 Stunden nach Transfektion werden die Zellen auf 10cm Platten passagiert. Die Kulturen wurden über ca. 6 Wochen bebrütet und gemäß den beschriebenen Protokollen gesplittet. Es wurde beobachtet, ob ein virusspezifischer, zytopathogener Effekt auftrat, der als Hinweis für das Vorhandensein des sich aktiv replizierenden Virus gewertet wurde.

3.2.4.3 Virusstockpräparation

Die Virusstockpräparation erfolgte anhand eines zweitägigen Protokolls. Alle Schritte werden unter der Easyflow unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Zusätzlich benötigte Materialien:

- M2-10B4 Zellen
- VSB (Virusstandard Puffer)
- VSB mit 15% Saccharose versetzt
- Gekühlte Zell-Douncer
- Zellkulturschaber

Herstellung des VSB:

In einer 1l Glasflasche (autoklaviert) werden gemischt:	0,05M Tris/HCl	6,055g
	0,012M KCl	0,895g
	0,005M EDTA	1,86g
	dH ₂ O	800ml

Anschließend wird der pH-Wert mit HCl auf pH=7,8 eingestellt. Nach pH-Werteinstellung dH₂O zugeben und auf 1000ml auffüllen. Anschließend autoklavieren mit dem Standardprogramm für Flüssigkeiten.

Herstellung des VSB mit 15% Saccharose:

In einer 0,5l Glasflasche (autoklaviert) wird gemischt:	75g Saccharose
	mit VSB auf 500ml aufgefüllt

Das Gemisch wird gemäß Standardprogramm für Flüssigkeiten autoklaviert.

Virusstockherstellung:

- 1.) Sechs mit M2-10B4 konfluent bewachsene 15cm Zellkulturschalen werden 1:3 passagiert auf 18-20 Schalen. Sobald die Zellen eine Dichte von ca. 80% erreicht haben, wurde jede Zellkulturschale mit ca. 1ml rekonstituiertem Virus beimpft und bei 37°C inkubiert. Das Inokulum entspricht dabei dem Überstand und den Zellen einer komplett lysierten 10cm Zellkulturplatte mit M2/MEF-Zellen (siehe auch 3.2.3.2 Virusrekonstitution).
- 2.) Nach ca. 3-5 Tagen wird die Virus-Zellsuspension geerntet. Das ist i.d.R. der Zeitpunkt, an dem alle Zellen infiziert sind und nicht mehr adhärent wachsen. Dies

wird zuvor lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Zellsuspension wird mit einem Zellkulturschaber vollständig von der Platte gelöst und in einer sterilen 500ml Zellkulturflasche gesammelt.

Alle weiteren Schritte erfolgen auf Eis. Die Zentrifugen wurden auf 4°C vorgekühlt, alle Zentrifugationsschritte erfolgen ab jetzt bei dieser Temperatur. Ebenso wurden die Puffer und der Zelldouncer vorgekühlt.

- 3.) Die Zellsuspension wird bei 5.500g für 15min abzentrifugiert. Der Überstand wird gesammelt und auf Eis gelagert.
- 4.) Das Pellet wird mit 4ml VSB in einen Zelldouncer überführt und ca. 20-mal gedouncet. Das resuspendierte, gedouncete Zellpellet wird erneut abzentrifugiert (17.500g, 10min). Der Überstand wird aufgehoben.
- 5.) Der Überstand aus den Schritten 3.) und 4.) wird vereinigt, das Zellpellet aus 4.) verworfen. Der gepoolte Überstand wird erneut abzentrifugiert bei 26.000g für 3h. Das Virus wird so pelletiert.
- 6.) Das Viruspellet wird aufgehoben, der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit 3ml VSB bedeckt und für ca. 2-3h auf Eis inkubiert. Anschließend wird beides in den Douncer überführt und abermals 20-mal gedouncet.
- 7.) Ultrazentrifugenröhrchen werden mit 10ml VSB+15% Saccharose befüllt. Vorsichtig wird die gedouncete Viruslösung darauf gefüllt. Anschließend werden die Zentrifugenröhrchen sorgfältig gewogen und austariert.
- 8.) Es schließt sich ein Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge an (1h, 4°C, 20.000rpm, SW 28 Rotor). Der Überstand wird verworfen, das Virus befindet sich jetzt im Pellet. Das Pellet wird mit ca. 1,5ml VSP bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert.
- 9.) Am nächsten Tag wird das Pellet vorsichtig resuspendiert (Filterpipettenspitze benutzen!). Die Viruslösung wird für 3min bei 4°C und 3.000rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert, um sie abermals von Zellrückständen zu reinigen. Das hieraus resultierende Zellpellet wird verworfen.
- 10.) Das Virus wird nun zu je 50-100µl aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.

3.2.4.4 Erstellen einer Wachstumskurve

Die Wachstumskinetiken von verschiedenen Virusmutanten wurden untereinander und mit wtMCMV verglichen. Einen Tag vor Beginn des Experiments werden NIH 3T3-Fibroblasten auf Mikrotiterplatten (12 Loch) ausgelegt, damit am Tag der Infektion eine Dichte von ca. 3×10^5 Zellen pro Vertiefung vorliegt. Die Zellen werden mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0.1 (entspricht 1 Virus auf 10 Zellen) in 1ml infiziert. Um die Virusadsorption zu gewährleisten folgt ein Inkubationsschritt für 1h bei 37°C in einem CO₂-Inkubator. Anschließend wird der infektiöse Überstand abgenommen, in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und die Zellen mit je 1ml Zellmedium bedeckt. Der infektiöse Überstand wird täglich über einen Zeitraum von insgesamt sieben Tagen gesammelt, die Proben werden bei -80°C tiefgefroren. Der Virustiter wird dann mittels Plaque-Assay bestimmt. Jede Probe wird für jeden Tag in Duplikaten bestimmt.

3.2.4.5 Virustiterbestimmung mittels Plaque-Assay

Zusätzlich benötigte Materialien:

- Carboxymethylzellulose (SIGMA)
- FCS
- 10x MEM (Gibco)
- Glutamin
- Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAS)
- Pen/Strep
- NaHCO₃ (7,5%)

Herstellung des Carboxymethylzellulose-haltigen MEF-Mediums:

Carboxymethylzellulose	3,75g
ddH ₂ O	388ml

dann Autoklavieren

Anschließende Arbeitsschritte unter der Lamina Air Flow.

Hinzufügen von

FCS	25ml
10x MEM	50ml
Glutamin	5ml
NEAS	2,5ml
Pen/Strep	5ml
NaHCO ₃	24,7ml

Wenn alle Arbeitsschritte korrekt ausgeführt worden sind verändert sich die Farbe von gelb nach pink/rot.

Zur Bestimmung des Virustiters wurden MEF-Zellen in Mikrotiterplatten (48 Loch) kultiviert. Bei einer Konfluenz von 100% wurde das Medium einer jeden Vertiefung durch 400µl der seriell verdünnten Virussuspension (i.d.R. von 10^{-2} bis 10^{-7} , verdünnt mit DMEM) ersetzt. Die Titrationsen wurden jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Es folgt eine Inkubationszeit von ca. 1h in einem CO₂-Inkubator, um dem Virus die Adsorption an die Zellen zu ermöglichen. Anschließend wird der infektiöse Überstand verworfen und die Zellkultur wird mit ausreichend Carboxymethylzellulose-haltigem MEF-Medium bedeckt. Dieses ernährt die Zellen und beschränkt die Disseminierung des Virus auf die direkte Ausbreitung von Zelle zu Zelle. Nach 4-5 Tagen entstehen so einzelne Virusplaques, die unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden können. Der Titer berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = \frac{\text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Volumen der Virusverdünnung}}$$

3.2.5 Pull Down von RISC-Komplexen und Isolierung von RNA

Für den Pull Down werden spezielle Medien benötigt:

Lysepuffer:	25mM TrisHCl (pH 7,5)
	150mM KCl
	2mM EDTA
	0,5% NP-40
	0,5mM DTT (Dithiothreitol)
	1 Tablette Protease-Inhibitor pro10ml

IP-Waschpuffer:	300mM NaCl
	50mM TrisHCl (pH 7,5)
	5mM MgCl ₂
	0,1% NP-40
	1mM NaF

Für die RISC-Immünpräzipitation (RISC-IP) wurden für jedes Replikat jeweils $\sim 1.5 \times 10^8$ Zellen (10 Zellkulturplatten von 15cm Durchmesser) verwendet. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und in 10ml frisch zubereitetem Lysepuffer lysiert. Es folgt eine Inkubation für 30min auf Eis. Anschließend werden die Lysate mittels Zentrifugation bei 20.000g und 4°C für 30min gereinigt und bei -80°C tiefgefroren. Die Lagerung bei -80°C hatte keinen Einfluss auf die Effizienz der RISC-IP.

Die AGO2-IP wurde mit einigen Modifikationen analog zu einem vorbeschriebenen Protokoll im Rahmen dieser Arbeit zunächst etabliert und anschließend seriell durchgeführt [11, 138]. Hierfür werden 6µg eines gereinigten mAGO2-6F4 Antikörpers (anti-mAgo2) oder eines

monoklonalen BrdU-Antikörpers (Kontrolle) zu je 5ml RPMI 1640 Mediums gegeben. Zusammen mit je 60µl Protein-Sepharosekügelchen (GE Healthcare) werden die Gemische in Pierce-Zentrifugenröhrchen (Thermo Scientific) unter konstanter Rotation bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend werden die Säulen entleert, einmalig mit Lysepuffer gewaschen und mit 5ml Zelllysat beladen. Dieses inkubiert dann für 2,5h unter konstanter Rotation bei 4°C. Zwischenzeitlich werden mittels des miRNeasy-Kits (Qiagen) aus 100µl Zelllysat die Gesamt-RNA nach Herstellerprotokoll präpariert. Nach dem Inkubationsschritt werden die Sepharosekügelchen zweimal mit IP-Waschpuffer und einmal mit PBS gewaschen. Um die RNA zu erhalten werden die Kügelchen zweimal mit 700µl Qiazol für 5min inkubiert und die Lysate vereinigt. Danach wird die RNA unter Verwendung des miRNeasy Kits nach Herstellerprotokoll präpariert. Am Ende erfolgt die RNA-Elution von der Säule mit 30µl ddH₂O.

3.2.6 *In vivo* Arbeiten

3.2.6.1 Vorarbeiten

Bevor die seriellen Mausexperimente an der Universität von Rijeka durchgeführt wurden untersuchten wir in einem Vorexperiment die Durchführbarkeit der geplanten Versuche.

Hierzu wurde in einem kleineren Maßstab der Versuchsansatz in der Tierabteilung des Max von Pettenkofer-Institutes der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München etabliert. Die Versuche wurden durch die Ethikkommission der Regierung von Oberbayern geprüft und in Übereinstimmung mit dem deutschen Recht und den EU-Gesetzrichtlinien durchgeführt (Tierversuchsantrag Aktenzeichen: 55.2-1-54-2531-74-06).

3.2.6.1.1 Infektion und Organentnahme

Es wurden jeweils fünf C57BL/6 Mäuse mit je 1×10^6 PFU der Viren C3X, C3X- Δ m22-GalK/Kn und C3X- Δ m22-rev infiziert. Die Infektion erfolgte i.v. in die Schwanzvene der Tiere. Drei Tage post infectionem (d.p.i.) wurden die Tiere getötet und die Organe unter sterilen Bedingungen entnommen, in sterilen 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufbewahrt und bei -90°C tiefgefroren.

3.2.6.1.2 Homogenisation der Mausorgane und Titration (Plaque Assay)

Benötigte Materialien: Cell Strainer (Zellsieb, Porengröße 100µm)
Spritzen 5ml
Falcon Tubes 50ml
D-MEM mit 10%FCS und 5% Penicillin/Streptomycin)
Multikanalpipette
MEF Zellen (100% konfluent)
Mikrotiterplatten (48 Loch)
Methylzellulosemedium
Organe von infizierten Mäusen

Alle Arbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen mittels einer Workflow.

Am Vortag werden die MEF-Zellen ausgelegt. Eine 100% konfluente 10cm Zellkulturschale mit MEF-Zellen wird auf zwei Mikrotiterplatten (48 Loch) gesplittet, pro Vertiefung werden dabei 200µl der Zellsuspension ausgelegt.

Am Folgetag werden die Organe homogenisiert. Hierfür werden die Organe zunächst auf Eis aufgetaut. Dann wird das jeweilige Organ durch ein Zellsieb mit 100µm Porengröße, welches auf ein 50ml Falcon-Tube aufgesetzt wird, gedrückt und in 5ml MEF-Medium aufgenommen. Zum Durchdrücken der Organe durch das Sieb werden die Kolben von 5ml Spritzen verwendet. Die Organhomogenisate werden gründlich gevortext und bei 2000rpm für 3min zentrifugiert. Die Arbeiten mit den Organhomogenisaten werden zu jeder Zeit auf Eis durchgeführt.

Anschließend wird eine Verdünnungsreihe der Homogenisate in den Mikrotiterplatten hergestellt. Die erste Verdünnungsstufe beträgt 1:2, weitere Verdünnungen in den folgenden Vertiefungen werden in 10er Schritten durchgeführt. Die so beimpften MEF-Zellen werden für 30min bei 2000rpm zentrifugiert und anschließend bei 37°C/ 80%Luftfeuchtigkeit/ 5%CO₂ für eine Stunde inkubiert.

Nach der Inkubation wird die Suspension aus den Vertiefungen abgesaugt und mit jeweils 300µl Methylzellulose pro Vertiefung bedeckt. Das Auswerten der Plaque-Assays erfolgte wie bereits unter 3.2.4.5 beschrieben.

3.2.6.2 Hauptexperimente

3.2.6.2.1 Mauseaufzucht und Behandlung

Die seriellen in vivo Arbeiten wurden von unseren Kooperationspartnern Astrid Krmpotic und Prof. Dr. Stipan Jonjic von der Universität in Rijeka (Kroatien) durchgeführt. BALB/c (H-2^d), C57BL/6 (H-2^b), CBA/J (H-2^k) und DBA/2 (H-2^d) Mäuse wurden unter spezifischen, pathogen-freien Bedingungen gehalten und gezüchtet. Dies geschah in der Central Animal Facility der Fakultät für Medizin der Universität Rijeka. Alle Protokolle, die für Mauseaufzucht

und andere Handlungen am Tier benutzt wurden, wurden durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität von Rijeka geprüft und in Übereinstimmung mit geltendem kroatischem Recht für den Schutz von Labortieren angewandt. Die kroatischen Schutzbestimmungen für Labortiere sind abgeglichen mit den bestehenden EU Gesetzgebungen (EC Directive 86/609/EEC). Der Umgang mit den Tieren, deren Identifikation, chirurgische Eingriffe sowie die Anästhesie wurden nach den Empfehlungen der *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National Academies Press) und dem „Act on the Welfare of Animals“ (NN 19/1999) durchgeführt.

3.2.6.2.2 In vivo Depletion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie NK- Zellen

Die *in vivo* Depletion wurde durch intraperitoneale Gabe von mAbs für die CD4⁺ T-Zell-Depletion (YTS191.1) und die Moleküle (YTS169.4) für CD8⁺- [156], sowie (PK136) für die NK-Zell-Depletion erreicht [157].

3.2.7 Dual Luciferase Assays

Für die Dual Luciferase Assays wurde der kommerzielle Vektor pSIcheck2 (Promega) benutzt. Die Klonierung der perfekten Bindungsstelle für miR-M23-2 in pSIcheck2 erfolgte mittels Oligoklonierung. Hierzu wurden die beiden Oligonukleotide PM-M23-2-for und PM-M23-2-rev verwendet. Für die Klonierung der nicht perfekten Bindungsstelle wurden die Oligonukleotide MM-M23-2-for und MM-M23-2-rev eingesetzt. An beiden Produkten wurden mittels PCR und den Primern AttB1-for und AttB2-rev die Bindungsstellen AttB1 und AttB2 hinzugefügt. Über die hinzugefügten Bindungsstellen wurden die PCR-Produkte in den pSI-check Vektor einkloniert. NIH 3T3 Zellen wurden infiziert mit wtMCMV, MCMV-miR-M23-2-mut und MCMV-miR-M23-2-mut-rev (MOI=10). Hierbei wurde die Infektionsrate mittels Zentrifugation erhöht. Exakt 24h nach Infektion wurden die Zellen mit dem leeren Vektor oder dem PM-Vektor (perfekt match) oder dem MM-Vektor (mismatch) transfiziert. Hierfür wurde das TransIT[®]-3T3 Transfektions Kit (Mirus) nach Herstellerangaben verwendet. Die Luziferaseaktivitäten wurden nach 72h p.i. mit dem Dual-Luciferase Reporterassay (Promega) gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Der Genlokus m21/m22/M23 des murinen CMV

Dieser Genlokus besteht aus insgesamt drei Genen: m21, m22 und M23. Das große M bedeutet, dass es sich um ein Gen handelt, welches ein Homolog in HCMV besitzt. Von den beiden DNA-Strängen werden vier pre-miRNA Sequenzen kodiert, welche in Abbildung 10 als farbige Striche dargestellt sind. Eine Besonderheit ist, dass sich jeweils zwei pre-miRNA Sequenzen gegenüberliegen und nahezu 100% komplementär sind (pre-miR-m21-1 und pre-miR-M23-2 sind bis auf ein zusätzliches Nukleotid bei pre-miR-m21-1 100% komplementär). Dass nicht auch die fertigen miRNAs komplementär sind liegt an der Art ihrer Entstehung. Wie oben beschrieben werden diese aus den pre-Sequenzen herausgeschnitten.

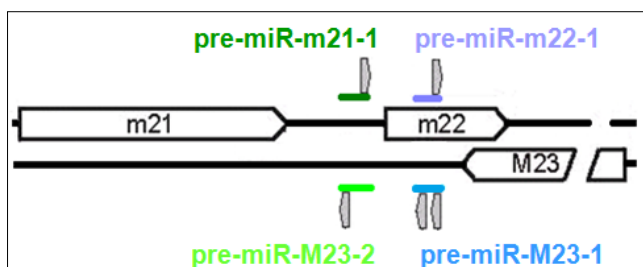


Abb. 10: Schematische Darstellung des M21/m22/M23 Genlokus

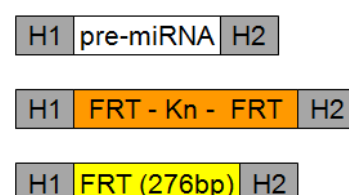
Die grauen Boxen in Abb.10 stellen die reifen miRNAs dar. Aus der pre-miRNA Sequenz pre-miR-M23-1 entstehen zwei miRNAs, nämlich miR-M23-1-5p und miR-M23-1-3p. Das bedeutet, dass in diesem Fall die Helicase aufgrund der relativ ähnlichen Basenpaarungskräfte an keiner Seite bevorzugt angreift. Es entstehen so zwei funktionell aktive miRNAs.

4.2 Die Herstellung der Knock-out Mutanten und deren Revertanten

Dölken et. al benutzen zur Herstellung ihrer Knock-out Mutanten ein Verfahren, bei dem die Sequenz der pre-miRNAs durch ein Antibiotikumresistenzgen (flankiert von zwei FRT-Sites) ausgetauscht wird [7]. Dies geschieht mittels Homologieklonierung und anschließender Entfernung eines Großteils der eingefügten Sequenz mithilfe der FLP-Rekombinase (sogenanntes *flip out*). Bei der Rekombination wurde somit die pre-miRNA Sequenz deletiert und es verblieb eine 276bp lange Restsequenz mit einer FRT-Site im MCMV Genom (siehe Abb.11). Alle Klonierungsschritte fanden in DH10B Bakterien statt.

Abb. 11: Schematische Darstellung der FRT Klonierung.

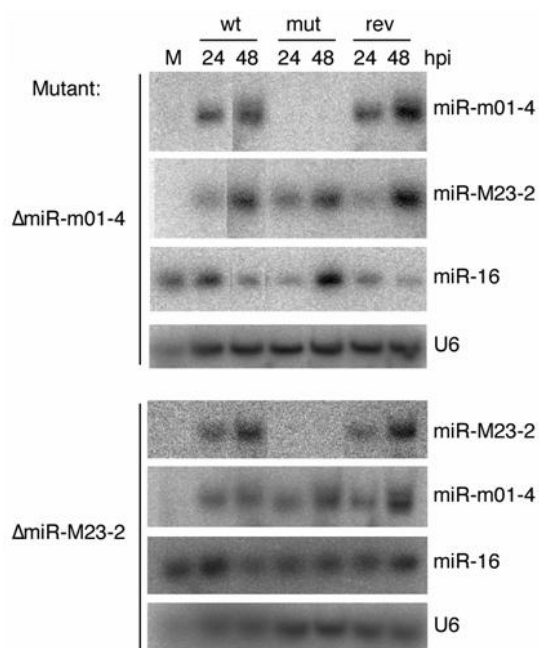
H1 und H2 sind die homologen Sequenzen, die die pre-miRNA Sequenz flankieren. Kn steht für die Kanamycin-Resistenz.



4.2.1. Revertierung der publizierten Mutanten

Der erste Arbeitsauftrag bestand darin, die so klonierten BAC Mutanten C3X- Δ miR-m01-4 und C3X- Δ miRm21-1/M23-2 zu revertieren. Im weiteren Verlauf wird die Doppel-Knock-out Mutante **C3X- Δ m21-1/M23-2** aus Gründen der Einfachheit nur noch als **C3X- Δ M23-2** bezeichnet. Wir entschieden uns für die BAC-Recombineering Methode nach Warming et. al. Dieses Verfahren ermöglicht die Klonierung ohne genomfremde Überbleibsel, die sogenannte „spurlose Klonierung“ oder „*traceless mutagenesis*“. Dieses Grundprotokoll von Warming modifizierten wir, indem zusätzlich eine Kanamycin (Kn)-Resistenz eingefügt wurde. Der Selektionsschritt über GalK/Kn erhöhte dadurch die Ausbeute der Klonierung. Die Methode und das Protokoll sind ausführlich unter 3.2.4.1.1f beschrieben.

Die Revertante wurde erzeugt, indem das 276bp Insert durch eine Expressionskassette für Galaktokinase (GalK) und eine Kanamycinresistenz (Kn) ausgetauscht wurde. Zunächst wurde das lineare DNA Fragment der GalK/Kn-Kassette vom Plasmid pGPS::galK-Kn mittels PCR generiert. Für die PCR wurden die Primer H5-miR-M23-2-galK/Kn und H3-miR-M23-2-galK/Kn verwendet. Der erste Schritt der Revertierung fand noch in E.coli DH10B statt. Anschließend wurde das Konstrukt C3X- Δ m22-GalK/Kn zur Revertierung zur Wildtyp-Sequenz mit Hilfe von Elektroporation in E. coli SW102 transformiert. Hierzu wurde mittels PCR die Wildtyp-pre-miRNA Sequenz pre-M23-2 vom Plasmid pSM3fr synthetisiert. Dabei wurden die Primer H5-miR-M23-rev und H3-miR-M23-rev verwendet. Mittels *traceless mutagenesis* wurden die Wildtypsequenzen wieder an ihrem ursprünglichen Platz eingesetzt und so die Revertanten C3X- Δ miR-M23-2-REV erzeugt. Die Revertierung von C3X- Δ miR-m01-4 wurde analog mit Hilfe der beiden Primer H5-miR-m01-4-galK/Kn und H3-miR-m01-4-galK/Kn durchgeführt. Abschließend wurden von Sébastien Pfeffer (Straßburg) Northern



Blots durchgeführt, um die Expression der miRNAs vor und nach der Revertierung zu überprüfen (siehe Abb. 12).

Abb. 12: Northern Blot Daten von infizierten NIH 3T3 und nichtinfizierten NIH 3T3 Zellen (Mock-Kontrolle; M) Deletion und Revertierung waren erfolgreich. Die Revertanten exprimieren wieder die miRNAs, welche den Deletionsmutanten fehlen. miR-16 ist eine zelluläre miRNA und diente zusammen mit U6snRNA als weitere Kontrolle. (Legende: wt = Wildtyp, mut = Mutante, rev = Revertante)

4.2.2 Herstellung einer zweiten („subtilen“) Mutante von miR-M23-2/m21-1 sowie deren Revertante

Diese Mutanten wurden komplett in *E. coli* SW102 hergestellt. Zuerst wurde der gesamte m21/m22/M23 Lokus des pSM3fr durch die GalK/Kn-Kassette ersetzt (siehe Abb. 13). Hierfür wurde das oben beschriebene Protokoll der homologen Rekombination genutzt. Die GalK/Kn-Kassette wurde vom pGPS-GalK/Kn Plasmid mittels touch-down PCR und den Primern H5-GalK/Kn-m22 und H3-GalK/Kn-m22 synthetisiert. Es entstand das Konstrukt **C3X-Δm22-GalK/Kn**. Dieses Konstrukt diente als Ausgangs-BAC für alle weiteren BAC-Klonierungen.

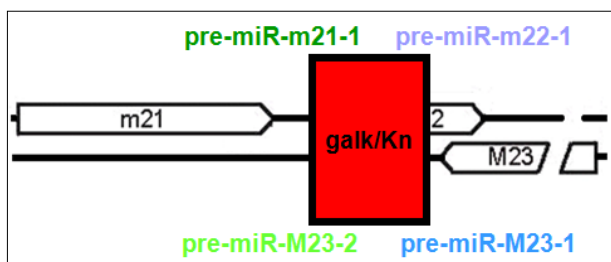


Abb. 13: **Ausgangskonstrukt C3X-Δm22-GalK/Kn**
Schematische Darstellung des Genlokus
m21/m22/M23 nach Insertion der galK/Kn-Kassette.

Anschließend wurde das ganze miRNA Cluster m21/m22/M23, bestehend aus den vier pre-miRNAs und einem Teil des m22 Gens, in das Plasmid pGPS1.1 subkloniert (siehe Abb. 14). Dies geschah mittels PCR und den Primern m22-for und m22-rev. Dadurch entstand das Konstrukt pGPS-m22-WT.

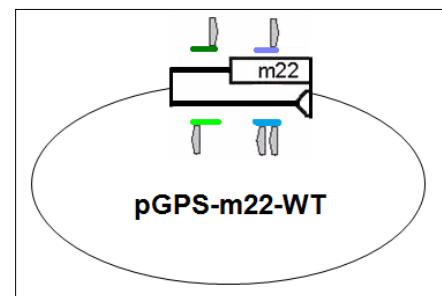


Abb. 14: **Schematische Darstellung des pGPS-m22-WT Plasmids**

Es folgte die Revertierung des BACs C3X-Δm22-GalK/Kn. Hierfür wurde das Wildtypcluster mittels homologer Rekombination wieder eingesetzt. Zur Klonierung wurden das EcoRV blunt-end Fragment des pGPS-m22-WT benutzt.

Anschließend wurden die Klone mittels Kontrollverdau durch die Restriktionsenzyme AgeI, HindIII, AvrII und NotI auf ihre Richtigkeit hin überprüft (siehe Abb 15). Das Ausgangs-BAC C3X-Δm22-GalK/Kn sowie alle richtig erscheinenden Revertanten wurden zusätzlich

sequenziert (Sequiserie, Vaterstetten), um die korrekte Insertion der gewünschten Punktmutationen zu bestätigen und zusätzliche, ungewünschte Mutationen auszuschließen.

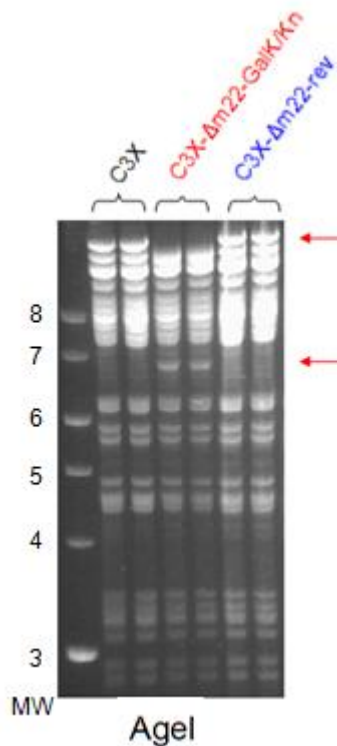


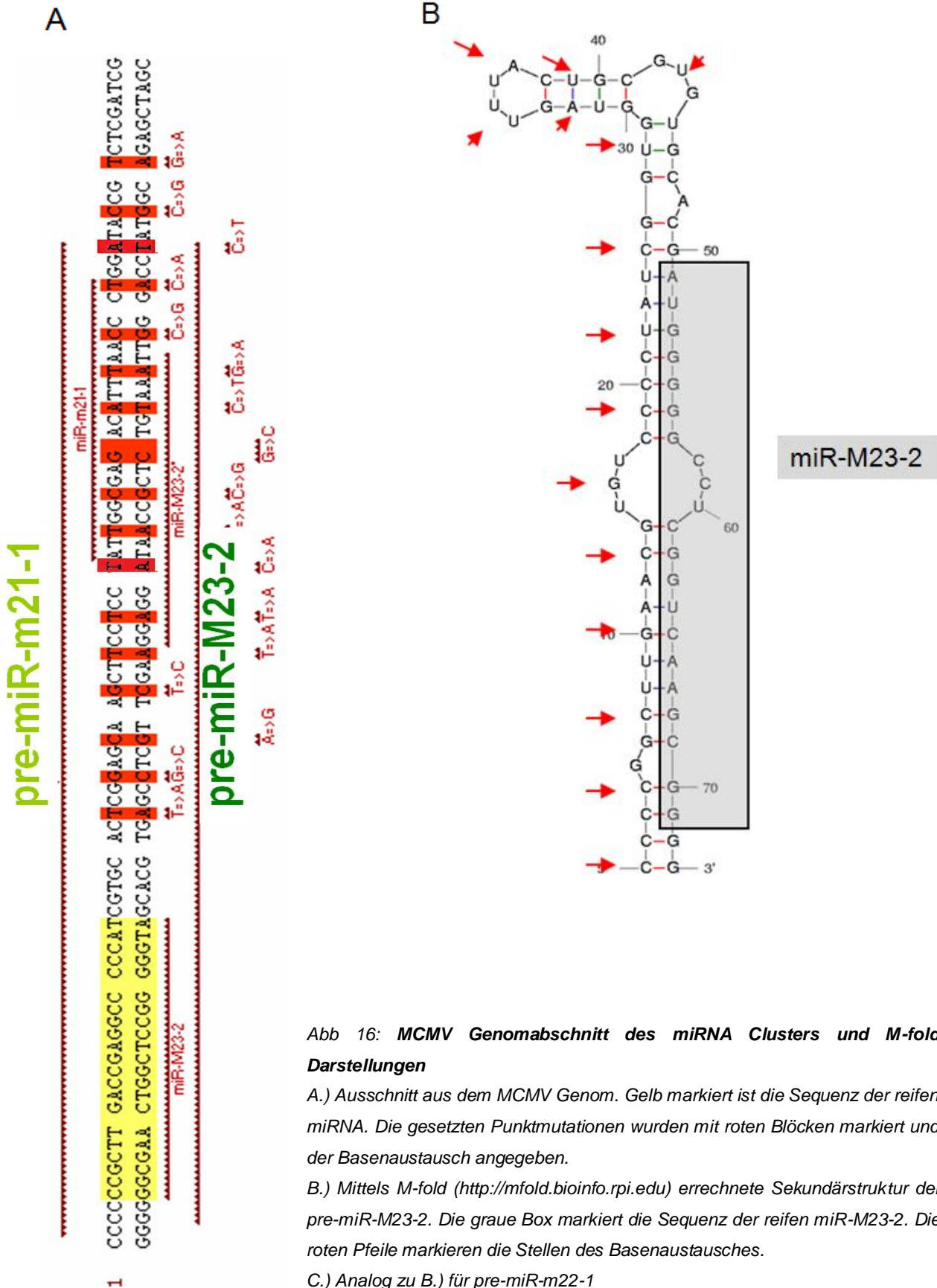
Abb 15: **Kontrollverdau mit Agel.**

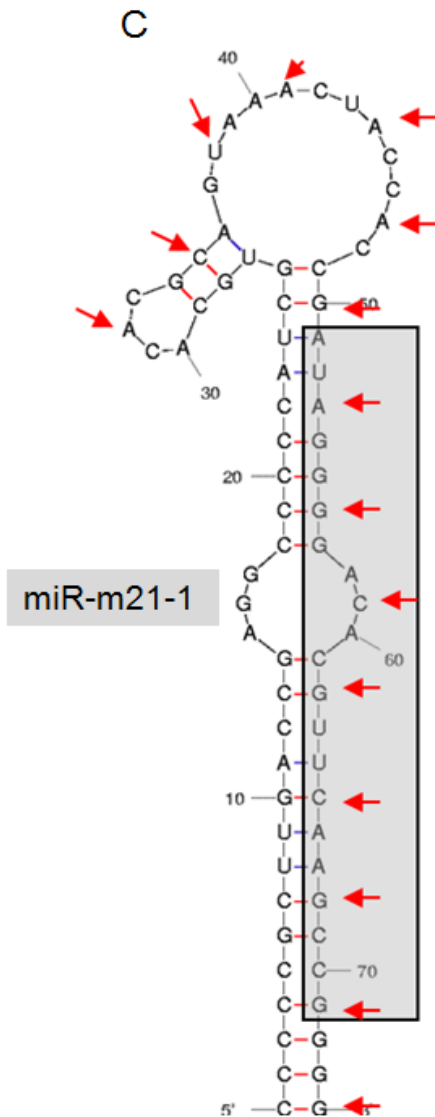
Die roten Pfeile markieren zusätzliche oder verlorengegangene Banden des BACs mit der Galk/Kn Kasette.

Molekulargewichtsmarker (MW, Angaben in kb)

Das Konzept der „subtilen Mutation“ sah vor, Punktmutationen in die pre-miRNA Sequenz einzufügen. Die Punktmutationen wurden so gewählt, dass sie als stille Mutationen keine Effekte auf der Ebene der Aminosäuren erzeugen, aber durch sie die korrekte Faltung der pre-miRNA nicht mehr stattfinden kann. Da die korrekte Faltung in eine Haarnadelstruktur aber entscheidend für die Prozessierung der reifen miRNA ist, wird somit die Biogenese der entsprechenden miRNA vollständig verhindert.

Wie Abbildung 16 zeigt, wurden die Punktmutationen nicht direkt in den Sequenzbereich der reifen miR-M23-2 eingefügt, sondern in die später abgespaltenen Anteile der Vorläufer-miRNA. Ein Verlust der reifen miRNA miR-M23-2 nach Mutation ist somit ausschließlich auf die nicht erfolgte pre-miRNA Faltung zurückzuführen und bestätigt, dass die Methode funktioniert.





Um die subtile Mutante der miRNA miR-M23-2 zu erzeugen musste zunächst ein mutiertes pre-miR-M23-2 Template erstellt werden. Hierfür wurden, wie oben beschrieben, 17 Punktmutationen in die pre-miR-M23-2 Sequenz des pGPS-m22 eingefügt. Dies entstand mit Hilfe von Oligoklonierung. Als Oligos dienten pre-miR-M23-2-mut-s und pre-miR-M23-2-mut-as. Verdaut wurde mit ApaI und PvuI (siehe Abb 17). Der m21/m22/M23 Locus mit der mutierten pre-miR-M23-2 wurde aus dem Plasmid pGPS-m22-miR-M23-2-mut mit einem EcoRV-Verdau ausgeschnitten. Dieser Abschnitt wurde anschließend mittels *traceless mutagenesis* in das C3X-m22-GalK/Kn eingefügt. Es entstand so das mutierte BAC C3X-miR-M23-2-mut.

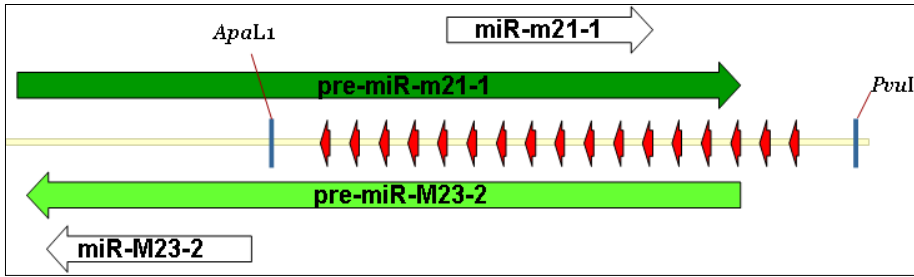


Abb. 17: **Die mutierte pre-miRNA Sequenz**

Schematische Darstellung der mutierten pre-miRNA Sequenz pre-miR-M23-2-mut, sowie der Schnittstellen der Restriktionsenzyme ApaI und PvuI. Die roten Pfeile stehen für jeweils eine Punktmutation.

Die Herstellung der Revertante von C3X-miR-M23-2-mut erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde die GalK/Kn-Kassette wieder eingesetzt (wie oben beschrieben). Diese Kassette wurde im Anschluss gegen die Wildtypsequenz des m21/m22/M23 Clusters ausgetauscht, indem das EcoRV-Fragment des pGPS-m22-WT benutzt wurde.

Auch diese Mutanten wurden kontrolliert; es erfolgte der Kontrollverdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen, u.a. HindIII, NsiI und NotI (siehe Abb. 18). Alle richtig erscheinenden BACs wurden sequenziert (Sequierserve, Vaterstellen).

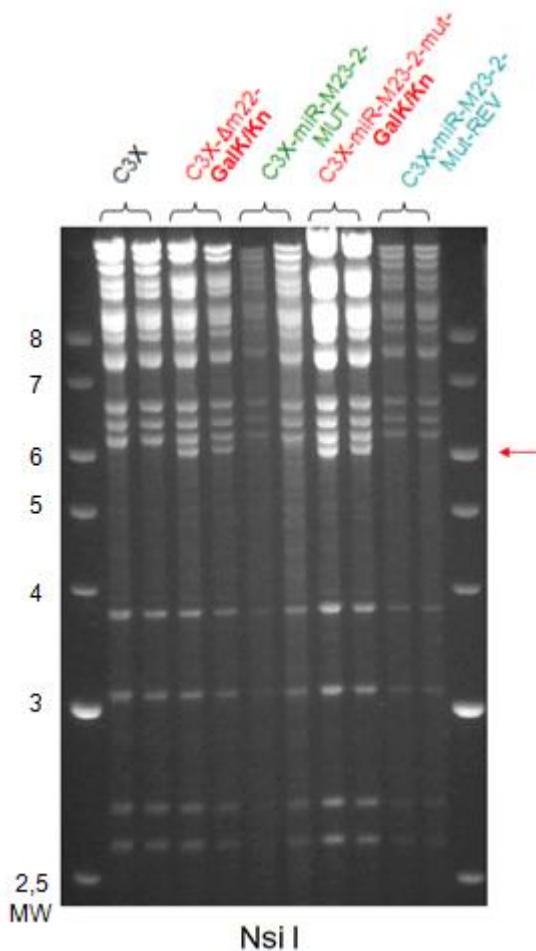


Abb. 18: **Kontrollverdau mit NsiI**

Der rote Pfeil weist auf zusätzliche Banden der galK/Kn Mutanten.

Molekulargewichtsmarker (MW, Angaben in kb)

Anschließend wurden Northern Blots (in Kooperation mit Sébastien Pfeffer, Straßburg) durchgeführt, um die Expression der miRNAs nach Mutation und Revertierung zu überprüfen.

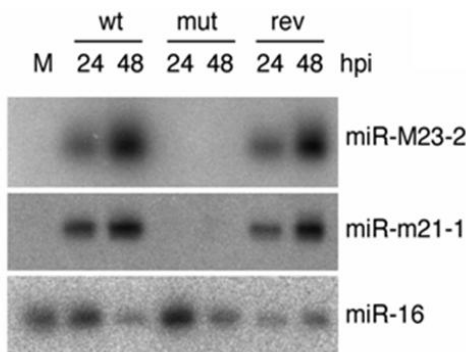


Abb. 19: **Northern Blot Daten von NIH 3T3 Zellen**

Infiziert mit MCMV Wildtyp (wt), MCMV-miR-M23-2-mut und MCMV-miR-M23-2-rev. M ist die Mock-Kontrolle (nicht-infizierte Zellen), miR-16 diente als Positivkontrolle.

Deutlich ist zu sehen, dass die Deletionsmutante die miRNAs mit der Punktmutation in ihrer pre-miRNA Sequenz nicht mehr exprimiert. Die Mutante konnte zudem erfolgreich revertiert werden.

4.3 Charakterisierung der Mutanten

4.3.1 Das Gen m22 und die miRNAs des m21/m22/M23 Clusters sind für das Virus nicht essentiell

Die erstellten Virusmutanten und deren Revertanten wurden bezüglich ihrer Wachstumskinetik untersucht. Zunächst bestand die Frage, ob die Platzierung der GalK/Kn-Kassette im m21/m22/M23 Cluster das Virus *in vitro* oder *in vivo* beeinträchtigt. Schließlich wird hierdurch das Gen m22 zerstört und die fünf, bereits beschriebenen, miRNAs werden deletiert. Mehrfach durchgeführte Wachstumskurven zeigten, dass die Viren *in vitro* keine signifikanten Beeinträchtigungen aufwiesen (Abb.20 zeigt exemplarisch eine dieser Wachstumskurven). Hierfür wurden MEF-Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert und sieben Tage lang beobachtet. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Wachstumskurve. Alle Versuche wurden in Doppelansätzen durchgeführt.

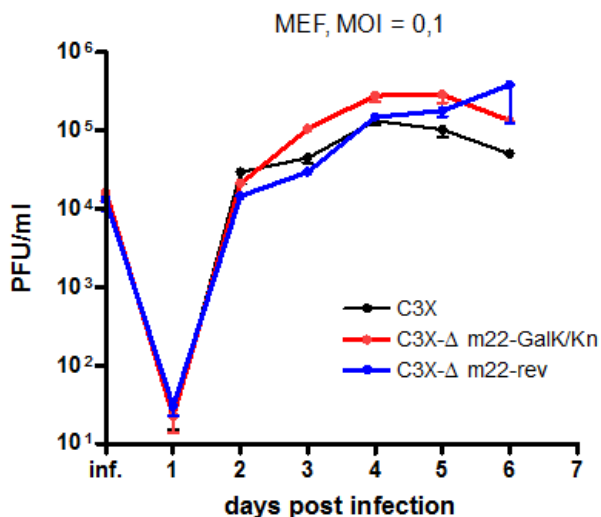


Abb. 20: **Analyse der Wachstumskinetik**

Repräsentative Wachstumskurven der Viren Wildtyp (C3X), der Deletionsmutante mit der GalK/Kn-Kassette (C3X-Δm22-GalK/Kn) sowie deren Revertante (C3X-Δm22-rev).

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Wachstumskinetiken der drei Viren *in vitro*.

Im Anschluss daran führten wir Mausexperimente zur Testung der Viren *in vivo* durch. Hierbei wurden jeweils fünf C57BL/6 Mäuse mit einer PFU von 1×10^6 der Viren C3X, C3X- Δ m22-GalK/Kn und C3X- Δ m22-rev infiziert, nach drei Tagen die Organe entnommen und die Titer per Plaque-Assay bestimmt (siehe Abb. 21).

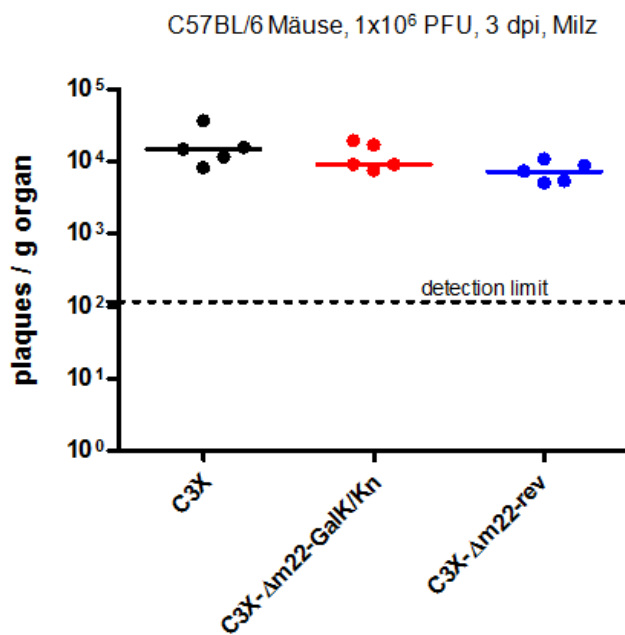


Abb. 21: **Untersuchung der Viren *in vivo* (im Mausmodell)**

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Virustitern von Wildtyp wtMCMV (C3X), der Deletionsmutante mit GalK/Kn-Kassette (C3X- Δ m22-GalK/Kn) sowie deren Revertante (C3X- Δ m22-rev). Gezeigt sind die Virustiter der einzelnen Mäuse in den Organen (Kreise) und die Mittelwerte (horizontale Striche). DL= Detektionslimit;

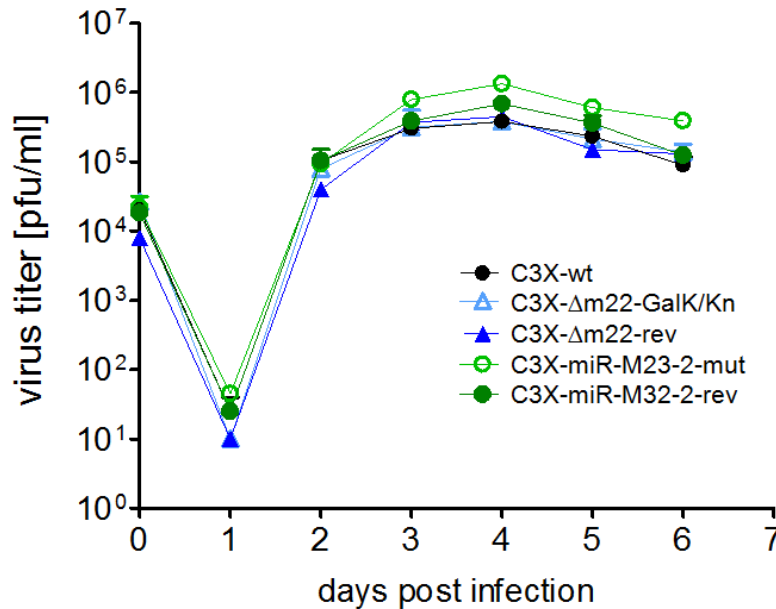
Dass sich, trotz Knock-out von fünf miRNAs und einem Gen, keinerlei Unterschiede nach drei Tagen Infektion in der Milz beobachten ließen, war erstaunlich. Jedoch konnte daraus geschlossen werden, dass das m22 Gen und die miRNAs des m21/m22/M23 Clusters für das Virus weder *in vitro* noch *in vivo* essentiell sind. Zudem konnten wir aus den Ergebnissen den erfreulichen Schluss ziehen, dass unser Ausgangskonstrukt für die weiteren Klonierungen, das **C3X- Δ m22-GalK/Kn** BAC, offensichtlich keine wesentlichen unvorhergesehenen ektopischen Mutationen aufwies.

4.3.2 Der subtile miR-M23-2 Knock-out zeigt *in vitro* keinen Effekt

Mehrfach durchgeführte Wachstumskurven der subtil mutierten Viren und deren Revertanten zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Viren (siehe Abb. 22). Es wurden MEF-Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert und sieben Tage nach Infektion beobachtet. Die Wachstumskurven wurden immer in Doppelansätzen durchgeführt.

Abb. 22: Analyse der Wachstumskinetik der subtilen Mutanten und deren Revertanten

Repräsentative Wachstumskurven der Viren MCMV Wildtyp (C3X wt), der Deletionsmutante C3X- Δ m22-Galk/Kn, deren Revertante C3X- Δ m22-rev, sowie der subtilen Mutanten C3X-miR-M23-2-mut und deren Revertante C3X-miR-M23-2-rev. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Wachstumskinetiken der Viren.



Zusammenfassend betrachtet zeigte keine der beiden miRNA knock-out Mutanten (C3X- Δ miR-M23-2 und C3X-miR-M23-2-mut) eine Attenuierung *in vitro*. Da der Knock-out dieser miRNA keine Beeinträchtigung des Viruswachstums in der Zellkultur hervorruft, gehen wir davon aus, dass der Effekt des Verlustes dieser miRNA nicht die Virusreplikation im Generellen betrifft. Außerdem wurde hierdurch gleichzeitig bestätigt, dass während der Klonierung und Rekonstitution des Virus keine zusätzliche ungewollte Mutation stattgefunden hat, welche das Virus signifikant schwächen hätte können.

4.3.3 Beide miR-M23-2 knock-out Viren sind spezifisch in der Speicheldrüse von C57BL/6 Mäusen attenuiert

Wir begannen die *in vivo* Tests mit C57BL/6 und BALB/c Mäusen. Diese Experimente wurden im Wesentlichen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Stipan Jonjic in Rijeka, Kroatien, durchgeführt. Adulte C57BL/6 und BALB/c Mäuse wurden entweder mit Wildtypvirus wtMCMV, oder mit der Deletionsmutante MCMV- Δ miR-M23-2 oder mit deren Revertante MCMV- Δ miR-M23-2-rev infiziert. Die PFU betrug 3×10^5 . Dabei zeigte sich drei Tage nach Infektion (3 d.p.i.) kein signifikanter Unterschied zwischen den Virustitern der verschiedenen Viren (siehe Abb. 23). Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausgruppen innerhalb des Experimentes wurde mithilfe des Mann-Whitney Exact Rank Tests ermittelt. Dies gilt für alle weiteren Mausexperimente in dieser Arbeit.

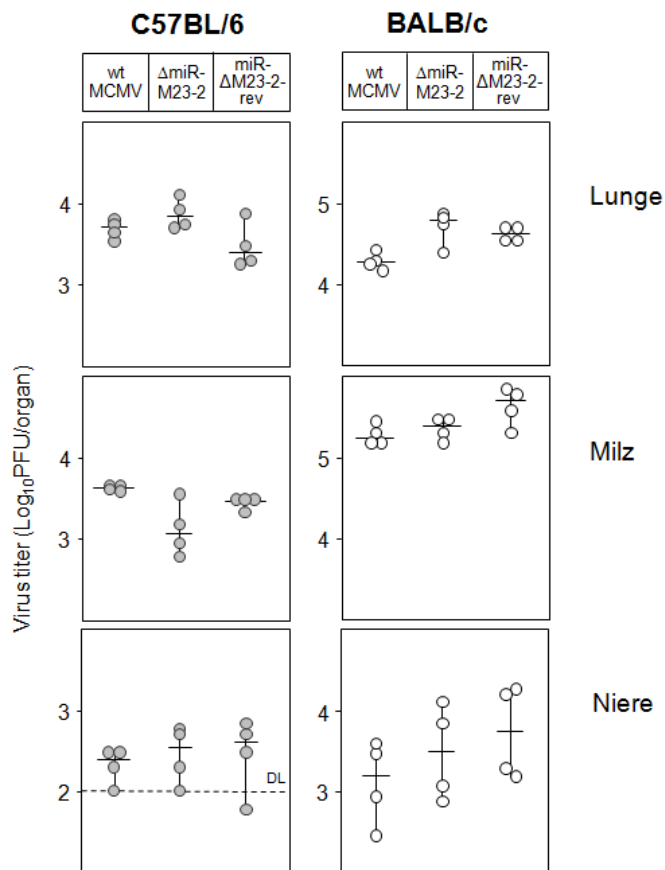


Abb 23: **Phänotyp der miRNA-Mutanten in C57BL/6 und BALB/c Mäusen nach 3 d.p.i**

Erwachsene C57BL/6 und BALB/c Mäuse wurden mit wtMCMV, MCMV-ΔmiR-M23-2 oder MCMV-ΔmiR-M23-2-rev intravenös (i.v.) infiziert (PFU = 3×10^5). Tag 3 p.i. wurde das Experiment terminiert, die Organe entnommen und die Virustiter in den Organen mittels Plaque-Assay bestimmt. In Lunge, Milz und Niere (sowie Leber und Speicheldrüse: Daten nicht gezeigt) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Titern festgestellt werden.

Gezeigt sind die Virustiter der einzelnen Mäuse in den Organen (Kreise) und die Mittelwerte (horizontale Striche).

DL= Detektionslimit;

Die Tatsache, dass in keinem der aufgeführten Organe, weder in C57BL/6 Mäusen noch in BALB/c Mäusen, 3 d.p.i. ein Titerunterschied auftritt, gibt einen Hinweis darauf, dass die Zeitspanne der Infektion möglicherweise eine wichtige Rolle spielt. Dies gilt besonders dann zu beachten, wenn Experimente zur Ermittlung der Funktion von viralen miRNAs geplant und durchgeführt werden.

Deswegen wurde das nächste Mausexperiment auf 14 d.p.i. verlängert. Zu diesem Zeitpunkt hat das Immunsystem die Virusinfektion bereits in den meisten Organen eingedämmt. Eine Ausnahme hiervon bildet v.a. die Speicheldrüse [1]. Es wurden jeweils adulte C57BL/6 und BALB/c Mäuse mit einer PFU von 3×10^5 infiziert und die Virustiter in Speicheldrüse und Lunge 14 d.p.i. bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass beide Mutanten, sowohl der grobe Knock-out als auch die subtile Mutante von miR-M23-2, die Virustiter in der Speicheldrüse um das fünfzigfache des Wildtypiters verringern (siehe Abb. 24). Dieser Effekt zeigte sich nur in C57BL/6 Mäusen und nur in der Speicheldrüse. In den Speicheldrüsen der infizierten BALB/c Mäuse war der Titer nur minimal reduziert (< zweifach). Dieser Effekt konnte vollständig revertiert werden.

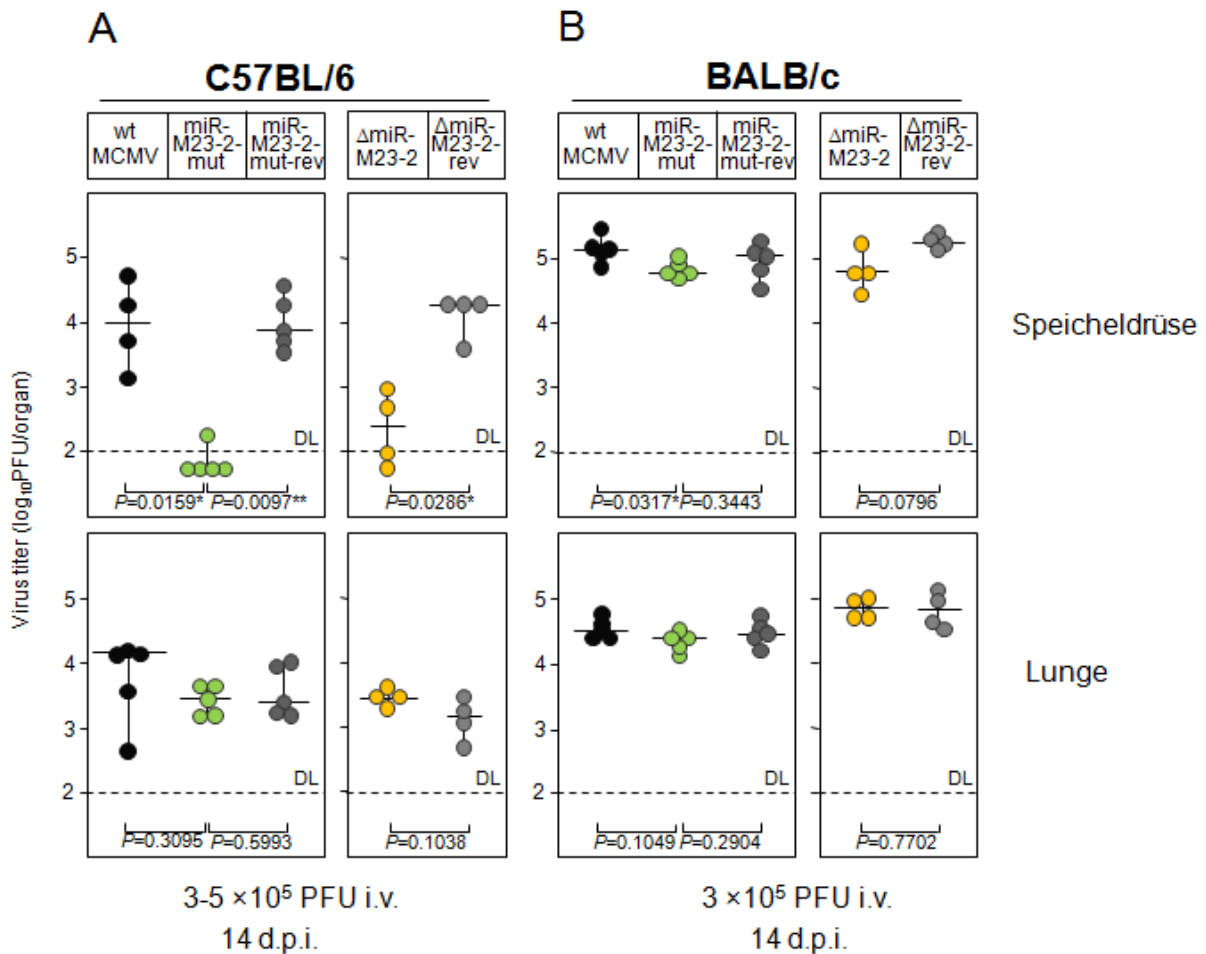


Abb. 24: **Phänotyp der miRNA-Mutanten in C57BL/6 und BALB/c Mäusen nach 14 d.p.i**

A) C57BL/6 Mäuse wurden i.v. mit einer PFU von 3×10^5 (linke Spalte) oder 5×10^5 (rechte Spalte) der angegebenen Viren infiziert. Die Virustiter wurden 14 d.p.i. in Speicheldrüse und Lunge bestimmt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede der Virustiter in den Speicheldrüsen zwischen den Gruppen von Mäusen, welche mit MCMV-miR-M23-2-mut und wtMCMV ($p=0,0159$), mit MCMV-miR-M23-2-mut und MCMV-miR-M23-2-mut-rev ($p=0,0097$), oder mit MCMV- Δ miR-M23-2 und MCMV- Δ miR-M23-2-rev ($p=0,0286$) infiziert wurden.

B) BALB/c Mäuse wurden i.v. mit einer PFU von 3×10^5 der angegebenen Viren infiziert. Die Titer wurden 14 d.p.i. in Speicheldrüse und Lunge bestimmt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Virustitern. Gezeigt sind die Virustiter der einzelnen Mäuse in den Organen (Kreise) und die Mittelwerte (horizontale Striche). DL= Detektionslimit; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Im Gegensatz zu den Titerunterschieden in der Speicheldrüse replizierten alle fünf studierten Viren zu ähnlichen Titern in der Lunge in beiden Mausstämmen. Dass sich in der Lunge von C57BL/6 Mäusen kein Unterschied der Virustiter zeigte war überraschend. Dies bestätigt jedoch, dass alle Mäuse mit einer äquivalenten Dosis an Virus infiziert wurden. Da dieser Phänotyp bei beiden Mutanten vergleichbar auftrat und durch beide Revertanten komplett aufgehoben wurde, können wir sicher sein, dass der Doppel-Knock-out der beiden miRNAs miR-M23-2 und miR-m21-1 für die beobachtete Attenuierung der Viren verantwortlich ist. Als

Konsequenz wurde in weiteren Experimenten nur noch die subtile Mutante MCMV-miR-M23-2-mut und deren Revertante –miR-M23-2-mut-rev verwendet.

4.3.4 Das Ausmaß der Attenuierung ist abhängig von der Virusdosis

Es stellte sich die Frage, ob die miRNA Knock-out Mutante in BALB/c Mäusen generell keinen Effekt zeigt, oder ob z.B. ein längerer Infektionszeitraum vonnöten ist, ehe eine Attenuierung des Virus sichtbar wird. Zu diesem Zweck wurden BALB/c Mäuse infiziert und 25 Tage p.i. die Virustiter in Speicheldrüse und Lunge bestimmt. Die Virustiter in der Lunge veränderten sich nicht maßgeblich durch den längeren Infektionszeitraum, die der Speicheldrüse jedoch schon (s. Abb. 25). Es zeigte sich diesmal eine - zwar signifikante - jedoch sehr geringe (~2fache) Attenuierung der Knock-out Mutante in den Speicheldrüsen. In der Lunge war weiterhin kein Unterschied zwischen den Virustitern zu sehen.

Zur Klärung der Frage, ob die Virusdosis in den Speicheldrüsen einen Effekt auf den beobachteten Phänotyp hat, wurden erneut BALB/c Mäuse infiziert, jetzt mit einer zwanzigfachen geringeren Virusdosis. Der Grundgedanke hierbei war, dass eine Reduktion der initialen Viruslast auch zu einer primär reduzierten Immunantwort auf das Virus führt.

Da es denkbar ist, dass die der Funktion von miRNAs zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen vom Ausmaß der Inflation im Gewebe beeinflusst werden, erschien es logisch, Experimente mit einer variierten Infektionsdosis durchzuführen. Erstaunlicherweise resultierte die Reduktion der Viruslast tatsächlich in einer signifikanten Attenuierung des mutierten Virus in den Speicheldrüsen an Tag 14 p.i.!

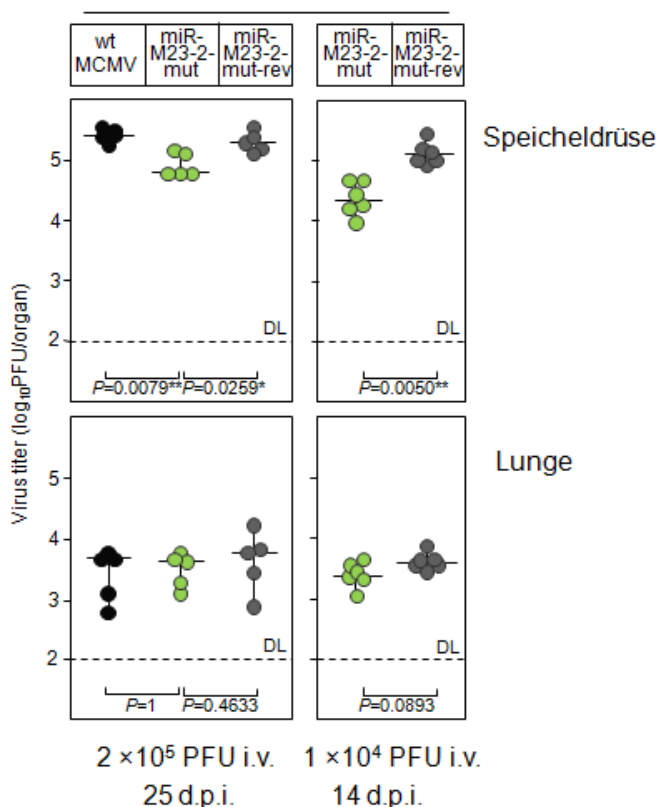


Abb. 25: **Virustiter der miRNA Mutanten bei unterschiedlicher Viruslast**

BALB/c Mäuse wurden i.v. infiziert mit 2×10^5 PFU (linke Spalte) und mit 1×10^4 PFU (rechte Spalte) der angegebenen Viren. Es wurden die Virustiter in Speicheldrüse und Lunge an Tag 25 p.i. (linke Spalte) und an Tag 14 p.i. (rechte Spalte) bestimmt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede der Virustiter in den Speichdrüsen zwischen der Mäusegruppe, die mit MCMV-miR-M23-2-mut infiziert wurde und der Gruppe, die mit wtMCMV infiziert wurde ($p=0,0079$), sowie der Gruppe mit MCMV-miR-M23-2-mut und miR-M23-2-mut-rev ($p=0,0259$) 25 d.p.i. [linke Spalte]. Ebenfalls signifikante Unterschiede ergaben sich im Gruppenvergleich von MCMV-

miR-M23-2-mut und *MCMV-miR-M23-2-mut-rev* ($p=0,0050$) 14 d.p.i. [rechte Spalte].

Gezeigt sind die Virustiter der einzelnen Mäuse in den Organen (Kreise) und die Mittelwerte (Horizontale Striche).

DL= Detektionslimit; * $p<0,05$; ** $p<0,01$

Die Attenuierung des Virus konnte ebenfalls beobachtet werden wenn BALB/c Mäuse mit einer PFU von 5×10^4 *intraperitoneal* infiziert wurden (siehe Abb.26).

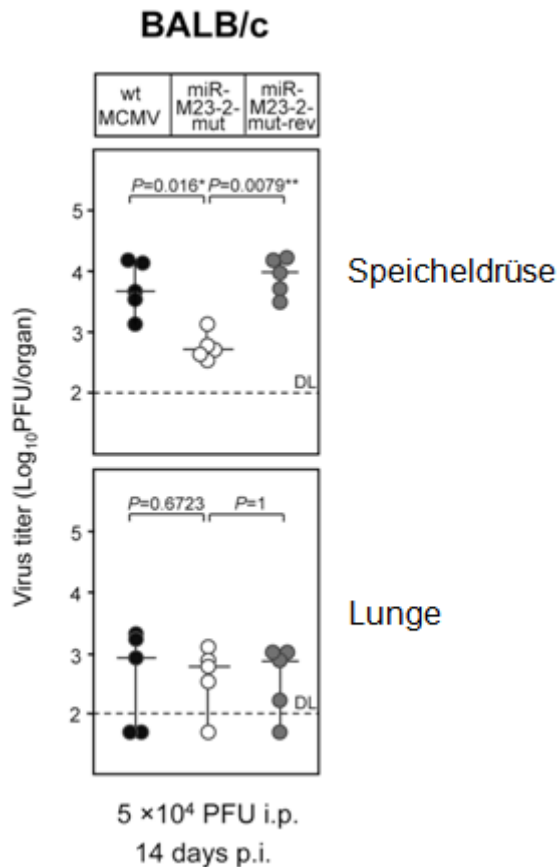


Abb. 26: **Virustiter von BALB/c Mäusen nach intraperitonealer Infektion**

Virustiter von mit wtMCMV, miR-M23-2-mut oder miR-M23-2-mut-rev infizierten BALB/c Mäusen 14 d.p.i.

Gezeigt sind die Virustiter in den jeweiligen Organen (Kreise) der Mäuse und die Mittelwerte (horizontale Striche).

DL= Detektionslimit; * $p<0,05$; ** $p<0,01$

4.3.5 Das Ausmaß der Attenuierung variiert mit dem genetischen Background

Da die Viren in C57BL/6 und BALB/c Mäusen zu so unterschiedlichen Titer replizierten, sollte in weiteren Experimenten der Effekt, den der genetische Hintergrund der Wirtstiere auf den beobachteten Phänotyp hat, weiter charakterisiert werden. Es wurden drei weitere Mausstämme mit unterschiedlicher Empfänglichkeit für MCMV getestet. Hierfür wurden die Experimente mit CBA/J, DBA/2 und 129/SvJ Mäusen durchgeführt. Außerdem testeten wir noch den Mausstamm 129/SvJ.*IFN γ R*^{-/-}, dem der IFN γ Rezeptor fehlt und der somit deutlich empfänglicher für eine MCMV-Infektion ist, als der verwandte Mausstamm mit funktionstüchtigem Rezeptor.

Interessanterweise war das mutierte Virus C3X-miR-M23-2-mut in den Speicheldrüsen aller vier Stämme 14 d.p.i. attenuiert (s. Abb. 26). Obwohl die Virustiter in den IFN γ Rezeptor

defizienten Mäusen extrem hoch waren, konnte ebenfalls eine signifikante Attenuierung gezeigt werden.

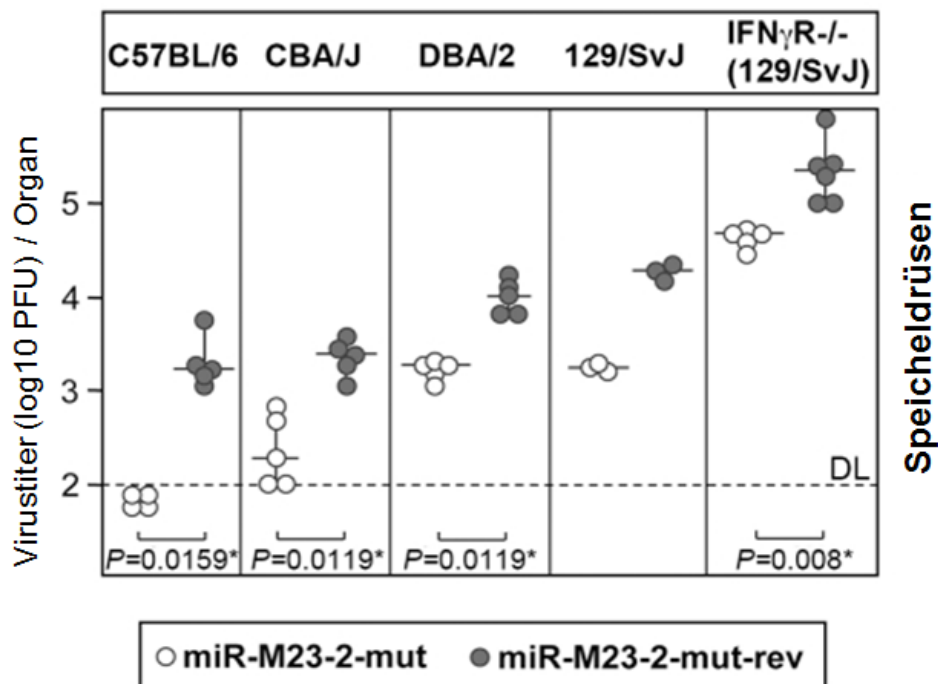


Abb. 27: **Attenuierung der Viren der miRNA Mutante in verschiedenen Mausstämmen**

C57BL/6, CBA/J, DBA/2, 129/SvJ. und 129/SvJ $IFN\gamma R^{-/-}$ Mäuse wurden mit MCMV-miR-M23-3-mut oder MCMV-miR-M23-2-mut-rev intraperitoneal infiziert; 2×10^5 PFU. Die Virustiter wurden nach 14 d.p.i. in den Speicheldrüsen bestimmt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in den Virustitern der Speicheldrüsen von MCMV-miR-M23-2-mut infizierten Mäusen im Vergleich zu MCMV-miR-M23-2-mut-rev infizierten Mäusen der Mausstämmen C57BL/6, CBA/J, DBA/2 und 129.SvJ $IFN\gamma R^{-/-}$. Gezeigt sind die Virustiter der einzelnen Mäuse in den Organen (Kreise) und die Mittelwerte (horizontale Striche).

DL= Detektionslimit; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3.6 Der Phänotyp in den Speicheldrüsen wird durch eine kombinierte Depletion von NK-Zellen und $CD4^+$ T-Zellen revertiert

In den Speicheldrüsen ist die immunologische Kontrolle der MCMV-Infektion beinahe komplett unabhängig von $CD8^+$ T-Zellen. Dagegen spielt die gemeinschaftliche und aufeinander fein abgestimmte Funktion von $CD4^+$ T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bei der Kontrolle von MCMV in den Speicheldrüsen eine wichtige Rolle. Allerdings kontrollieren diese die produktive MCMV Infektion auch erst nach einigen Wochen, manchmal sogar erst nach einigen Monaten [9-10, 158]. MicroRNAs sind an den vielfältigsten Prozessen der Lebewesen beteiligt und spielen u.a. eine große Rolle in der Immunologie [70]. Um zu testen, inwieweit die ausgeschalteten miRNAs in die

immunologische Kontrolle in der Speicheldrüse involviert sind, infizierten wir NK- und CD4⁺ T-Zell-depletierte C57BL/6 Mäuse.

Zunächst wurden kombiniert NK- und CD4⁺ T-Zell-depletierte C57BL/6 Mäuse sowie normale C57BL/6 Mäuse infiziert. Während das mutierte Virus in den herkömmlichen C57BL/6 Mäusen attenuiert war, resultierte die kombinierte Depletion der Immunzellen in signifikant höheren Virustitern und einem Wiedererlangen der viralen Fitness (s. Abb. 27).

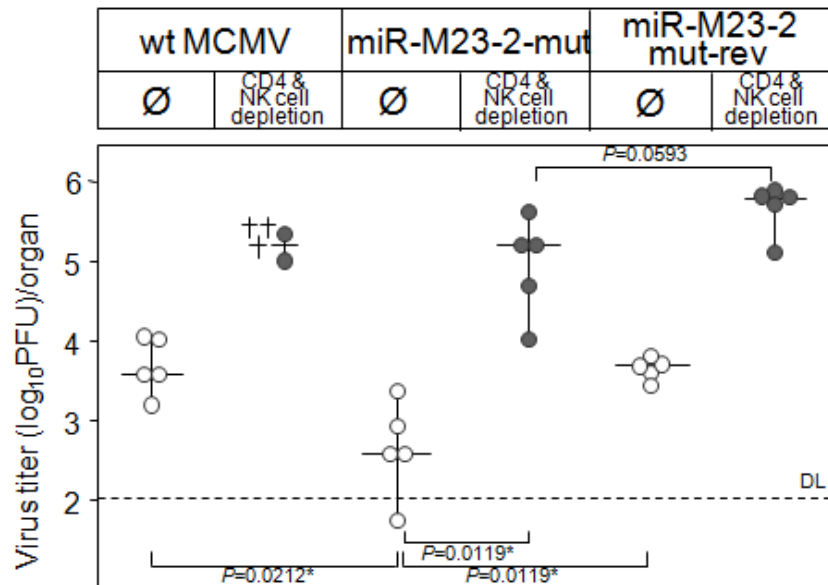


Abb. 28: **Auswirkung der kombinierten Immunzeldepletion auf die Virustiter**

NK- und CD4⁺ T-Zell depletierte C57BL/6 Mäuse und Mock-Kontrollen wurden i.v. infiziert mit 3×10^5 PFU der angegebenen Viren. Die Virustiter in den Speicheldrüsen wurden 14 Tage p.i. bestimmt. Die Unterschiede der Virustiter waren signifikant zwischen den Gruppen der nicht-depletierten Mäuse, die mit MCMV-miR-M23-2-mut und wtMCMV infiziert wurden ($p=0,0212$), sowie zwischen den MCMV-miR-M23-2-mut und MCMV-miR-M23-2-mut-rev infizierten ($p=0,0119$). Die kombinierte Depletion von NK- und CD4⁺ T-Zellen resultierte in einem signifikanten Titeranstieg von MCMV-miR-M23-2-mut ($p=0,0119$) sowie MCMV-miR-M23-2-mut-rev ($p=0,0079$). Die Titerunterschiede in der Gruppe der depletierten Mäuse zwischen MCMV-miR-M23-2-mut und MCMV-miR-M23-2-mut-rev Infektion sind nicht signifikant.

DL = Detektionslimit. Die Kreuze stehen für vorzeitig gestorbene Mäuse. Die Titer wurden dennoch bestimmt. Aufgrund der Tatsache, dass mehr als die Hälfte der Mausgruppe vorzeitig verstarb wurden jedoch keine p-Wertberechnungen mit dieser Gruppe durchgeführt.

Anschließend wurden Experimente in C57BL/6 Mäusen mit Einzeldepletionen von NK-Zellen, CD4⁺ T-Zellen oder CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Die Einzeldepletion von NK- oder CD4⁺ T-Zellen ergab jeweils einen ca. 100-fachen Anstieg des Virustiters; dies konnte bei der Depletion von CD8⁺ T-Zellen nicht beobachtet werden. Diese Beobachtungen stimmen mit früher publizierten Daten überein, welche zeigten, dass in Speicheldrüsen die Kontrolle der MCMV-Infektion und die Verhinderung der weiteren Virusausbreitung durch NK- und

CD4⁺ T-Zellen ausgeübt wird [9]. Jedoch führte keine der Einzeldepletions zu einer suffizienten Aufhebung der Attenuierung von MCMV-miR-M23-2-mut, verglichen mit den Titern von Mäusen, die mit wtMCMV und MCMV-miR-M23-2-mut-rev infiziert wurden.

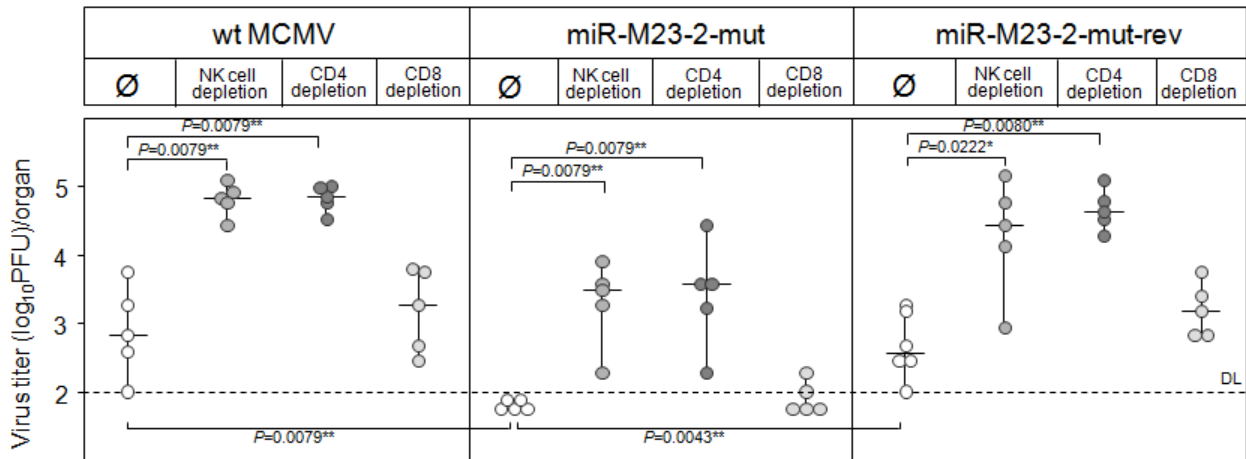


Abb. 29: **Unterschiede zwischen den Virustitern bei Einzeldepletion von spezifischen Immunzellen**

Nicht depletierte und für entweder NK-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen oder CD8⁺ T-Zellen depletierte C57BL/6 Mäuse wurden i.v. mit 2×10^5 PFU der angegebenen Viren infiziert. Die Virustiter der Speichdrüsen wurden an Tag 14 p.i. bestimmt. Die Depletion von NK-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen ergab einen Titeranstieg um das ~100fache verglichen mit den Titern von Mäusen, die mit wtMCMV oder MCMV-miR-M23-2-mut-rev infiziert wurden. Die Depletion von CD8⁺ T-Zellen zeigte keinen signifikanten Effekt (p-Werte nicht angegeben). DL = Detektionslimit

All die Daten, die in den Tierversuchen erzeugt wurden, wiesen darauf hin, dass die untersuchten miRNAs ihre Funktion irgendwo in der großen Maschinerie der Immunabwehr entfalten; ob dies jedoch ihre einzige Funktionsweise ist, blieb unklar. An dieser Stelle war es jedoch auch offensichtlich, dass man allein mit beobachtenden Studien in der Tierversuchsreihe diese Funktionen nicht genauer eingrenzen können und zur genaueren Charakterisierung weitere Studien mit anderen Ansätzen benötigt werden.

Somit entschieden wir uns parallel zu diesen Versuchsreihen ein biochemisches Verfahren zu etablieren, um die Funktionen der untersuchten miRNAs genauer charakterisieren zu können.

4.4 Identifikation von Zielgenen der MCMV-miRNAs mittels RIP-Chip

Die Identifikation von miRNAs und v.a. von deren Zielgenen mittels bioinformatischer Ansätze ist deutlich fehlerbehaftet und führt zu einer Vielzahl falsch positiver und falsch negativer Vorhersagen (ausführlich in 2.3.3 erläutert). Wir wählten deswegen einen biochemischen Ansatz um die von den viralen miRNAs regulierten Gene zu identifizieren.

Argonauten-Proteine sind hoch konserviert und stellen die zentrale Komponente im RNA-Induced Silencing Complex (RISC) dar. Sie enthalten die reifen miRNAs, die dann die von ihnen regulierten Transkripte in RISC-Komplexe binden. Durch einen Pull-Down mit einem spezifischen Antikörper gegen Ago2 erhält man somit den RISC-Komplex, der neben Ago2 auch die miRNA und deren Ziel-mRNA enthält.

4.4.1 Etablierung der RISC-Immunopräzipitation

Zur Identifizierung von Zielgenen zellulärer miRNAs wurde die Methode der Immunpräzipitation von RISC-Komplexen gefolgt von Microarray-Analysen (sogenannte RIP-Chip Analyse) bereits erfolgreich in mehreren aktuellen Publikationen angewandt [137-138, 141-142].

Als Basis diente uns ein vorbeschriebenes Protokoll [138] und der spezifische Anti-Maus-Ago2 Antikörper mAGO2- 6F4. Als Kontrolle diente in allen Experimenten ein monoklonaler Antikörper gegen BrdU (Abcam). Wir optimierten das Protokoll in vielerlei Hinsicht (s. Abb 30). Zum einen transferierten wir alle Schritte in sogenannte *Handee-Columns* anstelle von Falcon-Tubes. Dies verringert v.a. die Verlustrate der Sepharosekügelchen, welche durch unsachgemäße Handhabung und häufige Exposition der anfälligen RNA gegenüber exogenen Einflüssen entsteht. Zweitens erfolgt die Lyse der Kügelchen und die Aufreinigung der miRNAs jetzt mittels eines Trizol-Protokolls, anstelle einer zeitaufwendigen Lyse mit Proteinase K und anschließender Phenol-Chloroform Extraktion sowie Ethanolpräzipitation. Dadurch wird die Bearbeitungszeit enorm verkürzt, die Nukleinsäureausbeute aus organischen Extraktionen erhöht und v.a. der Kontakt der RNA mit flüchtigen organischen Lösungen auf ein Minimum reduziert. Die wesentlichen Verbesserungen spiegelten sich in einem zeitlich verkürzten Protokoll (von zwei Tagen auf einen Tag reduziert) wider. Des Weiteren führten wir die rigorose Kontrolle aller RISC-Pull-downs mittels quantitativer PCR auf zelluläre miRNAs (in der Regel *let7a*) zur Kontrolle der Pull-down Effizienz ein. Hiermit konnten wir die bestehende Methode signifikant verbessern, was sich in einer deutlich besseren Reproduzierbarkeit und einer erhöhten Anreicherung der miRNAs (Ago2-IP vs. BrdU-IP) widerspiegelte.

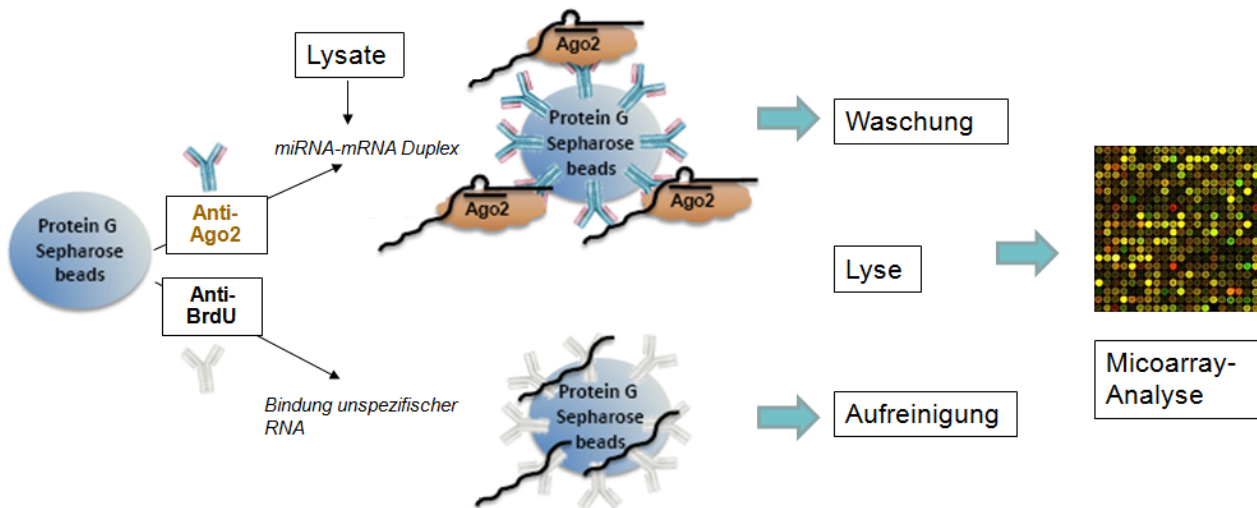


Abb. 30: **Schematische Darstellung des RISC-IP**

Protein G Sepharosekügelchen werden entweder mit dem spezifischen Antikörper Anti-Ago2 oder mit dem Kontrollantikörper Anti-BrdU beschichtet. Anschließend werden die Zelllysate infizierter oder uninfizierter Zellen hinzugegeben und mit den Kügelchen inkubiert. Anti-Ago2 bindet an das Ago2-Protein im RISC-Komplex. Es schließen sich Waschungen an, sowie die Lyse von den Kügelchen und die RNA-Aufreinigung mittels Trizol-Protokoll. Zum Schluss erfolgt die Kontrolle mittels qPCR und die Durchführung von Microarray-Analysen. (Microarraybildernachweis: von Microarray lab in Institute of Biomedical Science @NCHU; nchu.edu.tw)

Zur Reduzierung des unspezifischen Backgrounds blockierten wir die mit dem Antikörper inkubierten Sepharosekügelchen vor Zugabe der Zelllysate mit unspezifischer E.coli rRNA, was jedoch keine Optimierung erbrachte. Auch der Versuch, die Ausbeute der Lyse mittels Glycinpuffer (pH 2,5) zu erhöhen, brachte keine Verbesserung.

Das neue Protokoll wurde von uns an NIH 3T3 Mauszellen, sowie sechs verschiedenen humanen Zelllinien (u.a. DG75-eGFP, DG75-10/11 und BCBL-1) getestet und für selbige etabliert [11]. Die endgültige Form des Protokolls ist unter 3.2.5 beschrieben.

4.4.2 Virale miRNAs akkumulieren in RISC-Komplexen

Es wurden NIH 3T3 Zellen mit wtMCMV infiziert und 48 h.p.i. ein Ago2 Pull-Down durchgeführt. Als Kontrolle wurden nichtinfizierte NIH 3T3 Zellen (Mock) gleichermaßen behandelt und ebenfalls nach 48h ein Ago2 Pull-Down durchgeführt. Die gewonnene RNA wurde mit dem miRNeasy Kit (Qiagen) aufgereinigt. Unser Kooperationspartner Sébastien Pfeffer (Straßburg) führte im Anschluss eine small RNA Klonierung durch. Abbildung 31 zeigt die Schematische Verteilung der verschiedenen, im RISC-Komplex gefundenen, RNAs. Während in den infizierten Zellen die viralen miRNAs deutlich überwiegen, wurden im Kontroll-Pull-Down lediglich zelluläre miRNAs nachgewiesen. Mit diesem Versuch konnte

gezeigt werden, dass virale miRNAs während der subakuten Infektion im RISC-Komplex akkumulieren und mittels Ago2 Pull-Down und Aufreinigung nachweisbar sind.

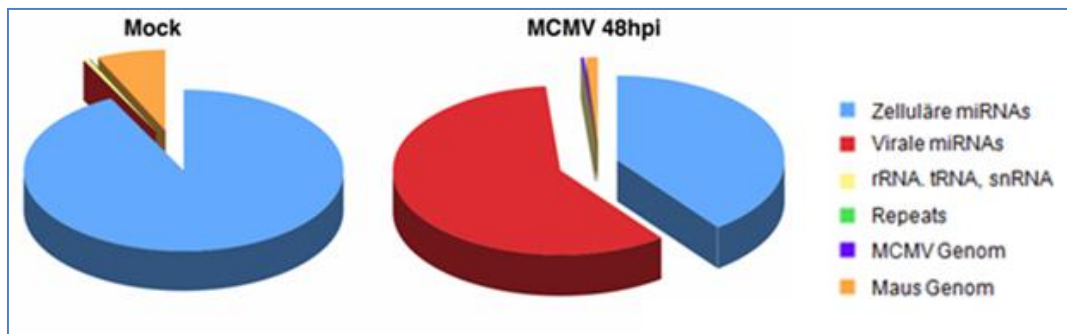


Abb. 31: **Small RNA Klonierung**

Darstellung der durch den Ago2 Pull-Down erhaltenen RNAs. Bei den infizierten NIH 3T3 Zellen überwiegen im RISC-Komplex die viralen miRNAs. Im Vergleich dazu finden sich im Kontroll-Pull-Down uninfizierter Zellen lediglich zelluläre miRNAs im RISC-Komplex.

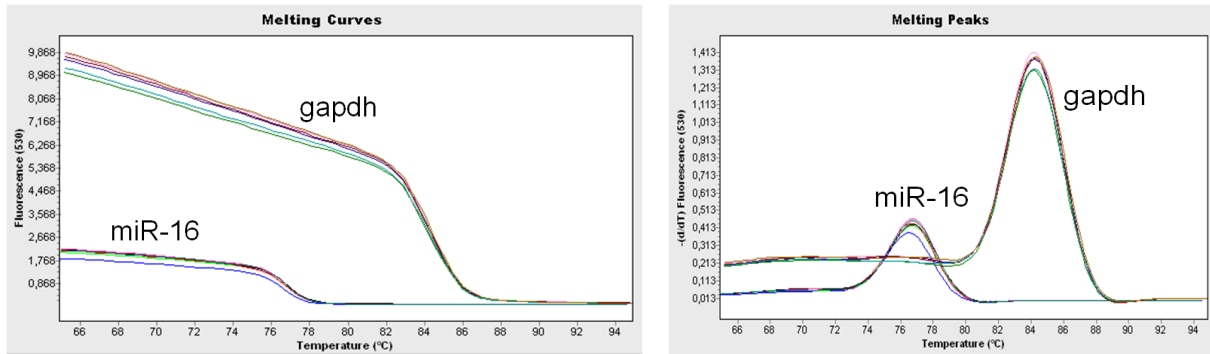
4.4.3 Anreicherung von miRNAs in der RISC-IP

Der Nachweis von miRNAs mittels Northern-Blot ist sehr zeitaufwändig und schlecht quantifizierbar. Deshalb wurde der Nachweis von miRNAs durch eine quantitative PCR etabliert. Hierfür verwendeten wir das miScript Kit (Qiagen), welches die Komponenten für die cDNA-Synthese und die sich anschließende quantitative PCR enthält. Zunächst wurde die PCR an Präparationen kompletter RNA aus nichtinfizierten NIH 3T3 Zellen etabliert, bevor die PCR auf RNA aus Pull-Downs infizierter und nichtinfizierter NIH 3T3 Zellen angewendet wurde.

Zunächst wurde die qPCR an nichtinfizierten NIH 3T3 Zellen getestet. Hierbei sollte die Menge der zellulären house-keeping miRNA miR-16 bestimmt werden. Die komplette RNA aus NIH 3T3 Zellen wurde präpariert, mit dem miScript reverse Transkriptase Set umgeschrieben und anschließend mit dem miScript SYBR Green Kit und dem speziellen Primer miR-16-for im Light Cycler™ quantifiziert. Abbildung 32 zeigt exemplarisch die Schmelzkurvenanalyse und die Standardkurve dieses Experiments.

Das Protokoll wurde auch für Let7a, eine weitere zelluläre house-keeping miRNA, etabliert. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die Quantifizierung von miRNAs mittels miScript System zuverlässig funktioniert.

A



B

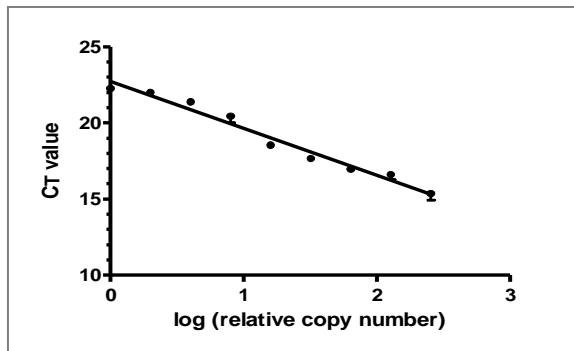


Abb. 32:

- A) Schmelzkurvenanalyse der zellulären miRNA miR-16
- B) Standardkurve von miR-16

In weiteren Versuchen wurde diese qPCR jetzt verwendet, um die Menge von miRNAs zu bestimmen, die man durch den Ago2 Pull-Down, bzw. den BrdU Pull-Down, erhält. Diese Menge wurde verglichen mit den Mengen der miRNAs, die aus der Präparation von kompletter RNA erhalten wird. So ließ sich die Anreicherung der miRNAs durch den Pull-Down errechnen. Des Weiteren wurde die Anreicherung von vermuteten Ziel-mRNAs in Ago2/BrdU Pull-Downs von infizierten und nicht-infizierten Zellen untersucht. In Abbildung 32 sind exemplarisch der Anreicherungsfaktor sowie die Auffangrate der zelluläre house-keeping miRNA miR-16 gezeigt, welche sich durch den Ago2 Pull-Down ergaben. Zusätzlich wurde die Menge an vermuteten Ziel-mRNAs in infizierten und uninfizierten Zellen mittels qPCR bestimmt.

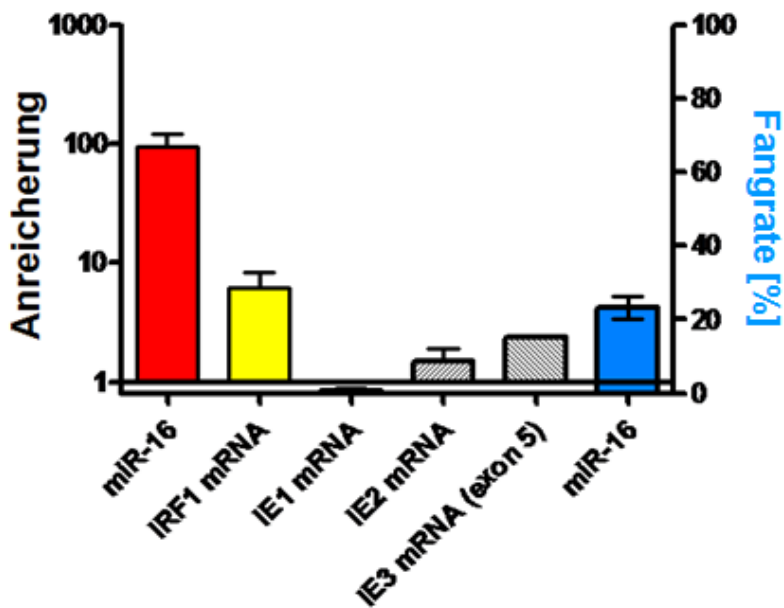


Abb. 33: **Ergebnis der light Cyclor PCR**

NIH 3T3 Zellen wurden mit MCMV infiziert und nach 0, 24, 48 und 72h.p.i. ein Ago2-Pull-Down durchgeführt. Die erhaltene RNA von 24,48 und 72 h.p.i. wurden gepoolt, die RNA der uninfizierten Zellen gesondert behandelt. In beiden Proben wurden mittels qPCR die Menge an miR-16, IRF1 mRNA, IE1mRNA, IE2mRNA und IE3mRNA bestimmt. Mittels des Ago2 Pull-Downs lässt sich eine Anreicherung von miR-16 um das 100fache und eine Auffangrate von ~20% erzielen. Die IRF1 mRNA, eine Ziel-mRNA von zellulären miRNAs, zeigte eine signifikante Anreicherung in der AGO2-IP. Die Ergebnisse der qPCR für IE2 und IE3 - von uns vermutete Ziel-mRNAs des MCMV – waren nicht eindeutig und allenfalls sehr schwach angereichert. Eine Anreicherung von IE1-mRNA konnte nicht beobachtet werden.

Die Daten von Abbildung 33 zeigen, dass man mithilfe des Ago2 Pull-Downs RISC-gebundene miRNAs und deren Ziel-mRNAs anreichern kann, welche sich durch die qPCR nachweisen und quantifizieren lassen. Die Effizienzkontrolle der Ago2 und der BrdU Pull-Downs erfolgte daher im weiteren Verlauf immer durch miScript qPCR. Jeder Pull-Down wurde auf diese Art im doppelten Ansatz kontrolliert.

4.4.4 Identifizierung von zellulären und viralen miRNA Zielgenen

4.4.4.1 Microarray-Analysen der RISC-IP (RIP-Chip)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass zelluläre und virale miRNAs im Ago2-Komplex gebunden sind und diese zusammen mit ihren Ziel-mRNAs mittels Ago2-IP angereichert werden können, war der nächste Schritt die Identifikation der so erhaltenen Ziel-mRNAs. Als Versuchsansatz wählten wir die Identifikation mithilfe von Microarrays, welche bereits erfolgreich für diesen Zweck verwendet worden sind [92]. Microarray-Analysen erlauben die

Ermittlung der Expressionslevel unterschiedlicher Gene in Abhängigkeit von verschiedenen endogenen wie auch exogenen Faktoren. Sie ermöglichen es, die Aktivität von zehntausenden verschiedenen Genen gleichzeitig zu messen. Anschließende bioinformatische Analysen der so gewonnenen Daten lassen einen Rückschluss auf die involvierten biologischen Pathways zu.

Alle Arrays wurden von unserem Kooperationspartner Reinhard Hoffmann vom Institut für Mikrobiologie der TU München durchgeführt. Es wurden Ago2-IPs von nicht-infizierten und mit MCMV-infizierten NIH 3T3 Fibroblasten präpariert und anschließend mittels Affymetrix Gene ST 1.0 Arrays untersucht. Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der Anreicherung von zellulären und viralen miRNA Zielgenen in der Ago2-IP für die am stärksten angereicherten Gene.

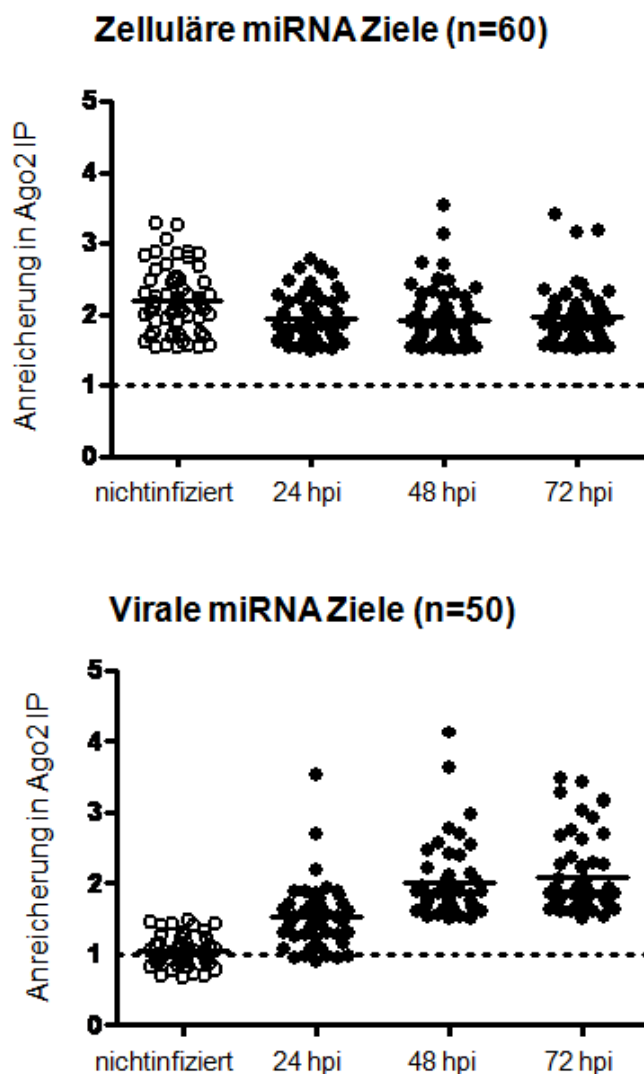


Abb. 34: **Microarray-Analyse der Anreicherung von zellulären und viralen Zielgenen im Ago2-IP**

Oben: Es wurden Ago2-IPs von nicht-infizierten und MCMV-infizierten NIH 3T3 Zellen durchgeführt und mittels Microarrayanalyse 60 Zielgene zellulärer miRNA identifiziert. Grau wurden hierbei die Ergebnisse eines Ago2 Pull-Downs von nicht-infizierten NIH 3T3 Zellen dargestellt, welche als Kontrollgruppe fungierte. Das Diagramm zeigt, dass diese Zielgene im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen während der Infektion nicht vermehrt angereichert werden.

Unten: Der Versuchsansatz entspricht dem des obigen Experiments. Grau war analog zum obigen Experiment eine Kontroll-Ago2-IP nicht-infizierter NIH 3T3 Zellen. Mittels Microarray-Analysen wurden 50 virale miRNA Zielgene identifiziert. Deutlich zu sehen ist deren zunehmender Anreicherung während der MCMV-Infektion.

Anhand der ermittelten Daten wurde eine Liste erstellt, welche die Gene mit der stärksten Anreicherung im Ago2-IP von MCMV-infizierten Zellen listet. Es zeigte sich, dass die Zielgene v.a. zu den NK-Zellliganden zählen, allen voran waren die verschiedenen Unterformen des frühen Retinoinsäuretranskriptes 1 (*retinoic acid early transcript 1*) vertreten.

Tab. 6: Top-Kandidaten für virale miRNA-Zielgene

Die 14 im Pull-Down am stärksten angereicherten Zielgene der MCMV miRNAs, gelistet nach dem Grad der Anreicherung und begonnen mit dem am stärksten (01) angereicherten Gen.

Platz	Name des Gens
01	F-box protein 25 (Fbxo25)
02	Retinoic acid early transcript 1, alpha (Raet1a)
03	Retinoic acid early transcript 1, beta (Raet1b)
04	Retinoic acid early transcript 1, epsilon (Raet1e)
05	Immediate early response 3 (Ie3)
06	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 (Cks2)
07	Fatty acid binding protein 5, epidermal (Fabp5)
08	Nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 1
09	Phenylalkylamine Ca ²⁺ antagonist binding protein (Ebp)
10	Ribosomal protein L34 (Rpl34), transcript variant 2
11	Retinoic acid early transcript 1 delta (Raet1d)
12	Polymerase (RNA)II (DNA directed) polypeptide D (Polr2d)
13	Sestrin 1 (Sesn1)
14	SET and MYND domain containing 3

4.4.4.2 Validierung zellulärer MCMV miRNA Zielgene durch TaqMan PCR

Wir wählten aus den MCMV miRNA Zielgenen, welche mittels Microarrays definiert worden sind, wiederum 14 aus, um die Anreicherung der miRNAs mit einer anderen Methode, der TaqMan PCR zu überprüfen. Hierfür wurden RISC-IPs in je zwei unabhängigen Replikaten durchgeführt; zum einen von nicht-infizierten NIH 3T3 Zellen und zum anderen von NIH 3T3 Zellen die mit wtMCMV infiziert wurden. Dabei wurde der Ago2-IP bei der einen Hälfte der infizierten Zellreihe nach 48 h.p.i., bei der anderen Hälfte nach 72 h.p.i. durchgeführt. Die

durch die Pull-Downs erhaltene RNA wurde aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und für die qPCRs benützt. Anschließend erfolgte die Normalisierung der Expressionshöhen auf das house-keeping Gen GAPDH, welches in keinem der Ago2-spezifischen IPs angereichert war. IRF1, ein Zielgen zellulärer miRNAs [159], wurde als Positivkontrolle herangezogen. Von den 14 postulierten Zielgenen konnten 11 mittels TaqMan PCR bestätigt werden. Sie zeigten eine signifikante Anreicherung in den IPs der infizierten Zellen vs. den nicht-infizierten Zellen. Sesn, Cks2 und Ler3 konnten hingegen nicht als virale miRNA-Zielgene bestätigt werden. Es gab keinen signifikanten Unterschied in ihrer Anreicherung in infizierten Zellen gegenüber den nicht-infizierten. Vielmehr waren sie um das zweifache gegenüber dem Referenzgen GAPDH angereichert, was ein Hinweis auf die Regulation durch zelluläre miRNAs sein könnte.

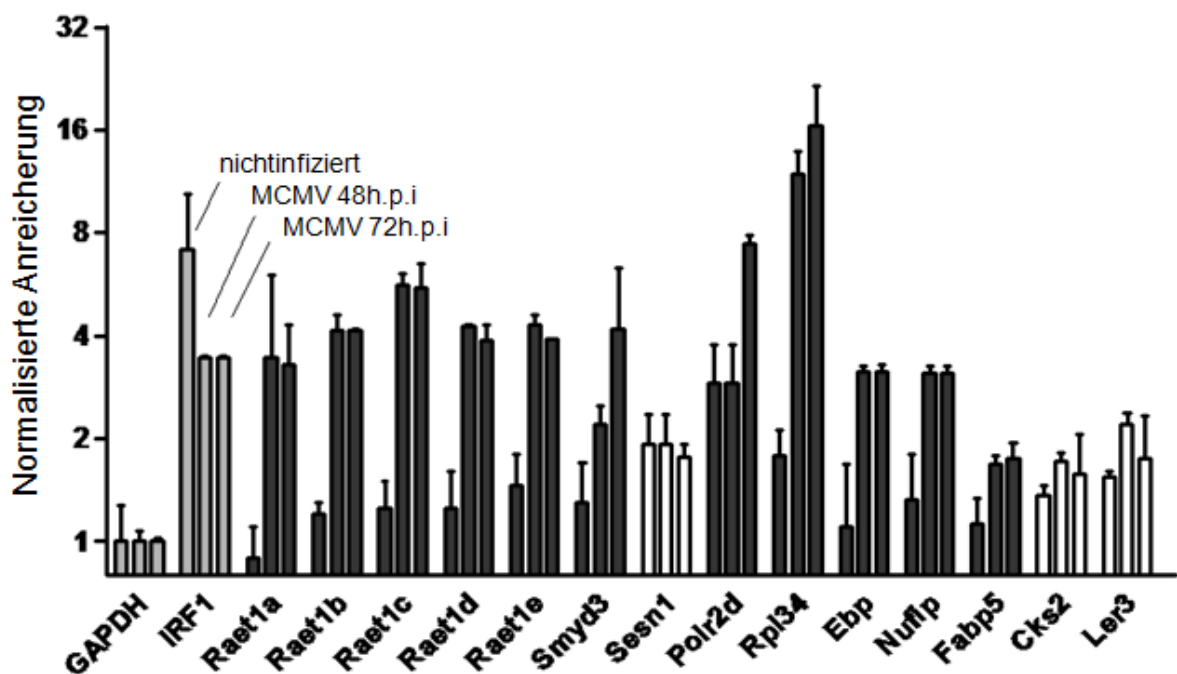


Abb. 35: Validierung der MCMV miRNA Ziel-Gene mittels TaqMan-PCR

Es werden die Anreicherungen der Transkripte in Ago2-spezifischen Immunopräzipitationen nicht-infizierter vs. infizierter Zellen nach Normalisierung auf das GAPDH-Transkript gezeigt. Der linke Balken steht für nicht-infizierte Zellen, der mittlere für den Pull-Down infizierter Zellen 48 h.p.i. und der rechte für den Pull-Down 72 h.p.i. Die Transkripte mit signifikanter Anreicherung sind in dunkelgrau, die mit nichtsignifikanter Anreicherung in weiß dargestellt. Hellgrau unterlegt sind das GAPDH-Transkript, das als Normalisierung diente, sowie das IRF1 Transkript, welches als Positivkontrolle herangezogen wurde.

4.4.5 GO-Analysen (Gen-Ontologie) der identifizierten Zielgene

Die Genexpressionsdaten, die mithilfe von Microarrays gewonnen werden, stellen eine enorme Datenmenge dar. Die Herausforderung dabei ist ihre korrekte Interpretation, die sich der Bioinformatik und Statistik bedient. Die ersten Versuche, Microarraydaten zu interpretieren, waren Gen-für-Gen Analysen. Man betrachtet einzelne Gene hinsichtlich ihres Expressionsniveaus und versucht diesen unter der Fragestellung eine Bedeutung zuzuweisen. Unter 4.4.5.1 ist die Gen-für-Gen Analyse unserer Microarraydaten als Tabelle gelistet. Da allerdings in den seltensten Fällen die Aktivität einzelner Gene für bestimmte Effekte, z.B. das Vorhandensein einer Krankheit, ausschlaggebend sind, sondern vielmehr das komplexe Zusammenspiel diverser Gengruppen biologische Prozesse widerspiegeln, bedient man sich heutzutage komplexerer bioinformatischer Datenauswertung. Sie fußt auf der Analyse funktioneller Gengruppen um die biologischen Prozesse besser verstehen und erforschen zu können. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten sogn. Gengruppen zu bilden. Ein häufig genutztes Verfahren ist die Analyse von „*Gene Ontology (GO)*“ Gruppen [160]. Diese Datenbank ist frei zugänglich unter <http://www.geneontology.org>. In ihr sind derzeit bekannte Funktionen und Zusammengehörigkeit von Genen und Genprodukten verzeichnet. Sie bildet eine Plattform der wichtigsten Genome aus allen Bereichen des Bios: Vom Prokaryonten bis zum Eukaryonten sind alle vertreten. Die Verknüpfungen werden laufend erweitert und von einem speziellen Gremium überwacht. Suchanfragen können bidirektional laufen. Zu einem bestimmten Gen können alle Zugehörigkeiten zu GO-Begriffen gesucht werden, oder aber man sucht für einen bestimmten Begriff alle zugehörigen Gene heraus. Tabelle 7 zeigt, inwiefern die postulierten viralen miRNA-Zielgene in die verschiedenen molekularen Prozesse der Zelle eingebunden sind.

Tab. 7: **GO-Analyse der postulierten MCMV miRNA-Zielgene**

Die viralen miRNA-Zielgene (n=120) sind an der Regulation zentraler zellulärer Prozesse beteiligt

Zellulärer Prozess	Anzahl der Ziel-Gene	p-Wert
Ubiquitin Konjugationsprozess	9	0,00017
Apoptose	8	0,029
positive Regulation der Apoptose	4	0,061
Regulation des Zellzyklus	5	0,077
Regulation zellulärer Prozesse	24	0,049
Genexpression	17	0,031
Regulierung der Transkription	10	0,69
Intrazellulärer Signaltransduktion	10	0,076

4.4.6 Virale miRNAs sind während der lytischen Infektion funktional

Nachdem gezeigt werden konnte, dass virale miRNAs in RISC-Komplexen akkumulieren und diese, sowie ihre Ziel-mRNAs, mittels Immunpräzipitation und Aufreinigung erhalten werden können, war die Frage, ob virale miRNAs während der lytischen Infektion wirklich funktional sind. Auch wenn unsere RIP-Chip Daten eindeutig dafür sprachen, fehlte bisher jeglicher formale Beweis, dass CMV miRNAs während der lytischen Infektion wirklich die Proteinspiegel der von ihnen regulierten Gene beeinflussen können.

Wir etablierten daher ein Luziferase-basiertes Testsystem, um die regulatorischen Effekte der MCMV miRNAs durch Interaktion mit den 3'UTRs („*Untranslated Region*“) zellulärer Gene während der lytischen Infektion zu untersuchen. Dieses Testsystem basiert auf dem kommerziellen Vektor pSIcheck2 (Promega).

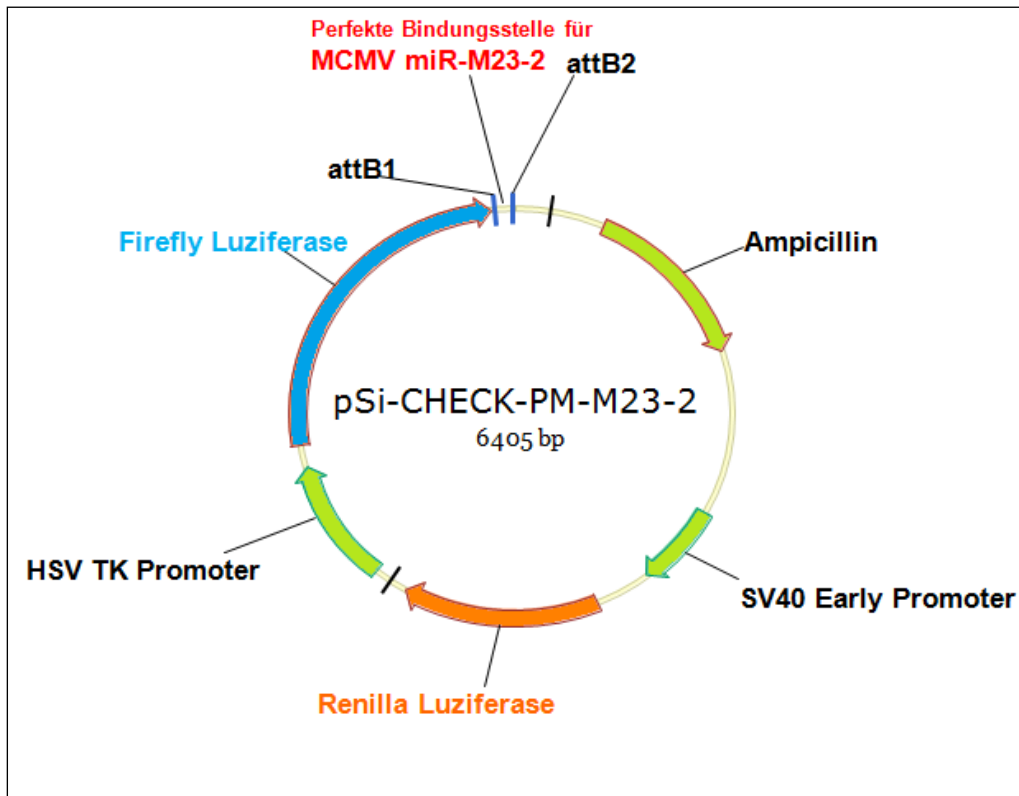


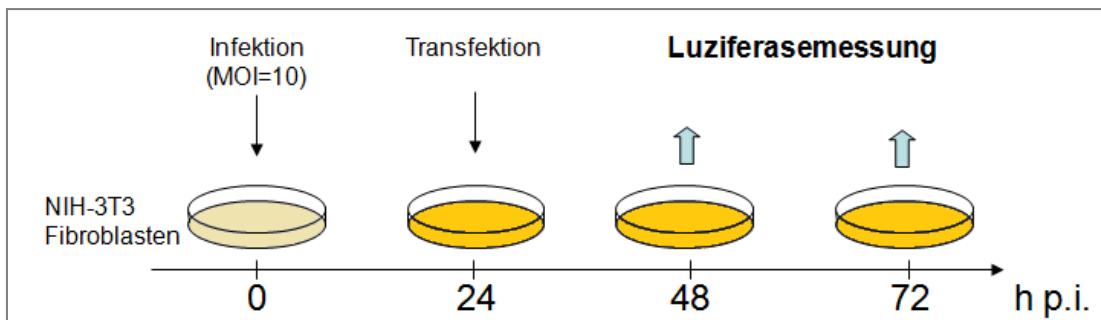
Abb. 36: Schematische Darstellung des dualen Luciferase-Plasmids mit perfekter Bindungsstelle für miR-M23-2

Das Plasmid enthält eine Firefly- und eine Renilla-Luziferase. Hinter der Firefly-Luziferase wurde über die attB1- und attB2-Sequenzen entweder eine perfekte Bindungsstelle (PM= perfect match) für die miRNA miR-M23-2 inkliniert, oder der Vektor blieb ganz leer (eV= empty Vektor). Hierbei diente die Renilla Luziferase als Transfektionskontrolle und die Firefly Luziferase als Read-out.

Das erste Experiment wurden durchgeführt um abschätzen zu können, wie stark die regulatorische Wirkung von miR-M23-2 ist und wie lange sie während der lytischen Infektion funktional ist.

NIH 3T3 Zellen werden mit einer MOI von 10 mit wtMCMV infiziert und mit dem pSi-CHECK-PM-M23-2 Plasmid transfiziert. Die vom Virus exprimierte miRNA miR-M23-2 bindet im dualen Luciferase-Plasmid an die inklinierte PM-Bindungsstelle. Hierdurch wird die Translation der Firefly Luziferase unterdrückt. Das Verhältnis des Read-outs von Firefly/Renilla zeigt die Aktivität der miRNA an.

Abb. 37: **Schematische Darstellung des dualen Luziferase-Protokolls** (Erläuterung im Fließtext)



Zuerst wurden NIH 3T3 Zellen mit wtMCMV oder MCMV-miR-M23-2mut infiziert (MOI=10). Nach exakt 24 h.p.i. wurden die Zellen mit dem pSi-CHECK-PM-M23-2 transfiziert. Anschließend wurden die Luziferase-Aktivitäten von Firefly und Renilla 48 h p.i. und 72 h p.i. gemessen (Dual-Luciferase Reporter Assay, Promega) und deren Quotient gebildet (siehe Abb. 37). Das Ergebnis des wtMCMV infizierten Ansatzes wurde gleich 1 gesetzt. Das Experiment zeigt, dass die miR-M23-2 funktional ist (Repression der Aktivität der Firefly-Luziferase). Zudem ist sie sogar während der späten Infektion aktiv (72 h.p.i.). Da die Repression der Luziferase-Aktivität 72 h.p.i. größer war als 48 h.p.i. wurde in den folgenden Experimenten der Zeitpunkt der Aktivitätsmessung auf 72 h.p.i. gelegt.

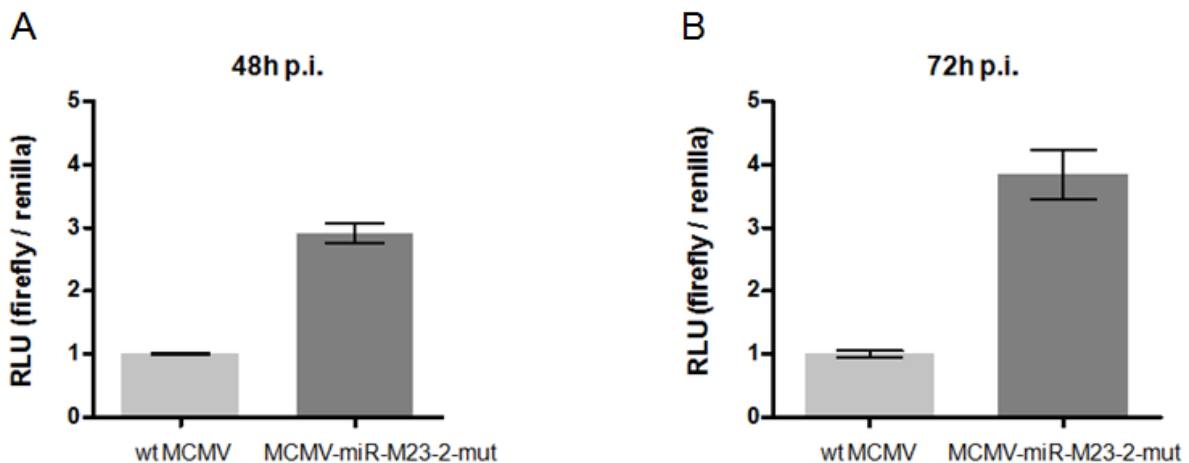


Abb 38: **Auswertung des Dualen Luziferase Experiments**

A) NIH 3T3 Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert und anschließend mit dem pSi-CHECK-PM-M23-2 Vektor transfiziert. 48 h.p.i. wurden die Luziferase-Aktivitäten gemessen und standardisiert. Die Aktivität der Firefly Luziferase wurde durch die Aktivität von miR-M23-2 um 2/3 verringert.

B) Der experimentelle Ansatz war der gleiche wie unter A). Die Messungen der Luziferase-Aktivitäten erfolgte 72 .p.i. Die Aktivität der Firefly Luziferase wurde durch die Aktivität von miR-M23-2 ungefähr um 3/4 verringert.

In einem weiteren Experiment sollte die regulatorische Wirkung von miR-M23-2, exprimiert von der Revertante, gezeigt werden.

Hierfür wurden NIH 3T3 Zellen mit den Viren MCMV-miR-M23-2-mut und MCMV-miR-M23-2-mut-rev infiziert (MOI= 10) und mit den Plasmiden pSi-CHECK-eV, pSi-CHECK-PM-M23-2 transfiziert. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Revertante mit ihrer Expression von miR-M23-2 in der Lage ist, die Firefly-Aktivität um das ~5fache zu reprimieren. Dies beweist, dass die Revertante auch bezüglich der Expression der untersuchten miRNA voll funktionstüchtig ist.

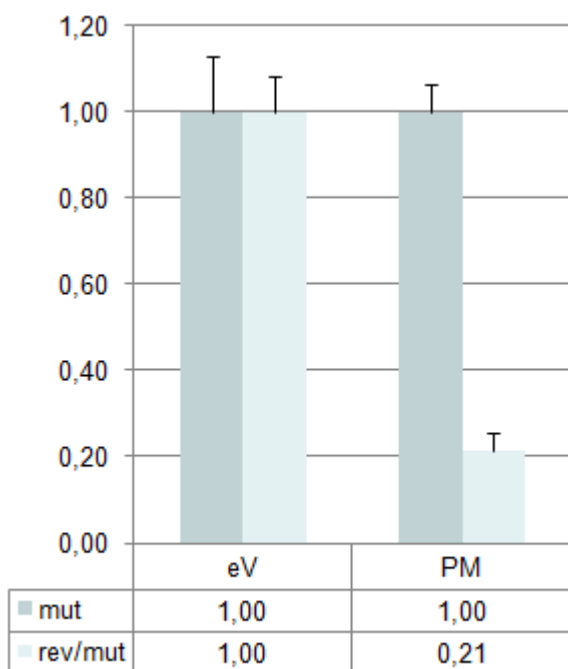


Abb. 39: Vergleich der Dual Luziferaseaktivitäten der Virusmutante und deren Revertante

NIH 3T3 Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert und mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Die Ergebnisse wurden normiert. Hierbei wurde das Verhältnis des Read-outs von Firefly/Renilla der MCMV-miR-M23-2-mut infizierten Zellen gleich 1 gesetzt.

5 Diskussion

5.1 Kinetik miRNA bedingter Regulationsmechanismen

In Rahmen dieser Arbeit wurde der erste *in vivo* Phänotyp von viralen miRNAs identifiziert [8, 161]. Interessanterweise zeigte sich eine selektive Attenuierung des Virus in Speicheldrüsen, nicht aber in Lungen von C57BL/6 Mäusen. Des Weiteren konnten wir substantielle Unterschiede in deren Ausprägung insbesondere bei Balb/c beobachten.

Sowohl in C57BL/6 als auch Balb/c Mäusen zeigten sich 3 Tage nach der Infektion (d.p.i) mit Wildtypvirus, Mutanten und Revertanten in keinem Organ (Lunge, Milz, Niere, Leber und Speicheldrüse) signifikante Unterschiede in den Virustitern. Zeit spielt daher offensichtlich bei viralen miRNAs eine wichtige Rolle. Hierbei sind wesentliche Aspekte der Funktionsweise von miRNA-bedingter Regulation zu beachten.

MiRNAs hemmen nur die Neubildung von Proteinen, auf bereits gebildete Proteine haben sie keinerlei Einfluss. Die Kinetik ihrer Effekte wird somit wesentlich durch die Halbwertszeiten der von ihnen regulierten Proteine bestimmt. Von unter Infektion induzierten Proteinen abgesehen, zeigen sich daher ihre Effekte erst, wenn die bereits vorhandenen Proteine in relevantem Maße abgebaut wurden. Bei einer mittleren Proteinhalbwertszeit in Säugetierzellen von knapp einem Tag [161] geschieht dies aber nur recht langsam. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass die meisten viralen miRNAs erst nach >12 Stunden nach Infektion (h.p.i) wirklich regulationsrelevante Spiegel erreichen. Die Zeit, die die Rekrutierung signifikanter Mengen ihrer Ziel-mRNAs in RISC-Komplexen dauert verlängert dieses Intervall womöglich noch deutlich. Die ersten neugebildeten Viren werden bereits 24 h.p.i aus der infizierten Zelle freigesetzt [162]. Somit bleibt den meisten viralen miRNAs wahrscheinlich nicht ausreichend Zeit, den Großteil ihrer Zielgene während der frühen Stadien der Infektion substantiell zu regulieren. Daher ist der fehlende Phänotyp *in vitro* und nach drei Tagen lytischer Infektion *in vitro* und *in vivo* nicht allzu verwunderlich.

Insgesamt weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass die ausgeschalteten miRNAs eine recht spezifische Funktion erfüllen. Sie tragen offensichtlich dazu bei, eine bestehende Infektion in den Speicheldrüsen längere Zeit aufrechtzuerhalten. Hingegen spielen sie offensichtlich keine Rolle in der raschen, lytischen Virusvermehrung in anderen Organen. Bislang wurden bereits einige MCMV-Gene identifiziert, die sowohl für die Weiterverbreitung des Virus, als auch für die Aufrechterhaltung einer persistierenden Infektion in den Speicheldrüsen vonnöten sind [158]. Auf welche Weise diese Gene allerdings agieren ist bislang unbekannt. Möglicherweise kann durch die Identifikation und Charakterisierung von MCMV miRNAs diese Lücke in naher Zukunft geschlossen werden

5.2 Das Ausmaß der Attenuierung zeigt Abhängigkeit von Mausstamm und Dosierung

In den *in vivo* Experimenten zeichnete sich sehr schnell ab, dass der genetische Hintergrund der Mäuse bei der Studie von MCMV miRNAs eine bedeutende Rolle spielt (4.3.3 und 4.3.5). So zeigte die miRNA Deletionsmutante in den Speicheldrüsen von BALB/c Mäusen nur eine sehr geringe in C57BL/6 Mäusen aber eine deutlich (>50-fache) Attenuierung.

Der wichtigste Unterschied zwischen C57BL/6 und Balb/c Mäusen ist, dass das Immunsystem der C57BL/6 in der Lage ist, eine effiziente Viruskontrolle während der akuten MCMV-Infektion aufzubauen. Hingegen sind Balb/c Mäuse für die MCMV-Infektion deutlich empfänglicher. Dies beruht auf der Expression des aktivierenden NK-Zellrezeptors Ly49H in C57BL/6, nicht aber in Balb/c Mäusen. Dieser NK-Zellrezeptor erkennt direkt das MCMV m157 Protein, was zu einer starken NK-Zellaktivierung und somit zu einer verstärkten Viruskontrolle führt [163-164].

Interessanterweise führte die Infektion von Balb/c Mäusen mit einer 20-fach geringeren Virusdosis zu einer signifikant höheren Attenuierung des mutierten Virus in den Speicheldrüsen von BALB/c Mäusen. Somit spielen offensichtlich nicht nur immunologische, sondern auch inflammatorische Mechanismen und das Ausmaß der Virusausbreitung eine Rolle. Dies könnte auf die Beteiligung von Zytokinen hindeuten.

Um den Einfluss des genetischen Hintergrundes weiter zu untersuchen wurden eine Reihe von *in vivo* Experimenten mit diversen Mausstämmen durchgeführt, die zwar alle eine signifikante Attenuierung der Deletionsvariante des Virus zeigten, dies jedoch in recht unterschiedlichem Ausmaß. Insbesondere die IFN γ -Knock-out Mäuse zeigten dabei trotz sehr hoher Virustiter eine deutlich Attenuierung der miRNA-Knock-out Mutante. Somit sind die Virustiter sowohl vom Mausstamm, als auch von der Infektionsdosis abhängig.

Warum aber sieht man die miRNA-Effekte hauptsächlich in den Speicheldrüsen und nicht in den anderen Organen?

Die Viruspersistenz im Speicheldrüsengewebe scheint in den Hauptzügen die Situation in azinösen glandulären Epithelzellen widerzuspiegeln. Dabei dauert es etwa 7 Tage nach i.v. Infektion bevor erstmalig Virus von diesen Zellen produziert und freigesetzt wird. Die Kinetik der Infektion verläuft hier also offensichtlich völlig anders als in allen anderen Organen. Des Weiteren repliziert MCMV in diesen Zellen mit einer ganz speziellen Morphogenese zu sehr

hohen Virustitern ohne namhaften Gewebsschaden zu verursachen [165]. Die infektiösen Partikel werden in großen zytoplasmatischen Vakuolen gelagert und von dort aus sezerniert. Die Orientierung dieser Speichervakuolen ist in Richtung der Ausführungsgänge gelegen und sie sind mit Unmengen an Virionen (~1000 Stück) angefüllt [166]. Dieser speziellen Speicherung ist es u.a. zu verdanken, dass das Virus vor diversen antiviralen Mechanismen geschützt wird.

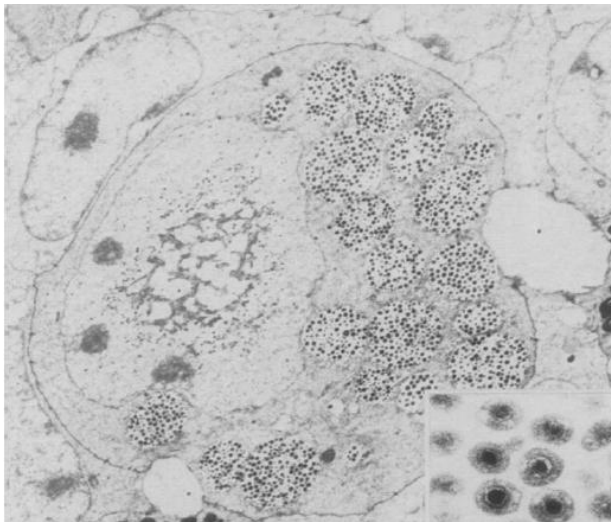


Abb. 40: **MCMV infizierte glanduläre Epithelzelle**
(modifiziert nach [166])

Interessanterweise ist das Virus, welches aus Speicheldrüsen 14 d.p.i. von naiven Mäusen isoliert wurde, um einiges virulenter als Virus, das aus irgendeinem anderen Gewebe oder Organ isoliert wurde. Der Grund hierfür ist bislang ungeklärt. Allerdings geht dieser Zuwachs an Virulenz sofort verloren, wenn das Virus auch nur ein einziges Mal in Zellkultur weiter passagiert wird [167].

Da das Virus also in Speicheldrüsen wesentlich länger repliziert und zudem kaum zytopathogenen Schaden hinterlässt, ist es sehr wahrscheinlich, dass den miRNAs hier deutlich mehr Zeit zur Entfaltung ihrer Wirkung bleibt. Somit können die miRNAs ihre Funktion voll entfalten und dies zeigt sich letztlich in veränderten Virustitern.

Dass in den Lungen der infizierten Mäuse 14 d.p.i. und 25 d.p.i. keine Attenuierung zu sehen war ist zwar ungewöhnlich, könnte sich aber dadurch erklären lassen, dass hier die lytische Virusinfektion vorherrscht und die viralen miRNAs nicht ausreichend Zeit haben funktional relevant zu werden. In der Lunge führt eine lang anhaltende und unkontrolliert schnell ablaufende lytische MCMV-Infektion zu schweren Schäden im Lungengewebe. Dies ist zugleich eine der Haupttodesursachen bei Mäusen, die mit einer letalen MCMV-Virusdosis infiziert werden [51]. Zeitfaktor und Replikations-Charakteristik (lytisch vs. persistierend) könnten daher die von uns gefundenen Daten z.T. erklären, jedoch ist es auch denkbar, dass die selektive Attenuierung der miRNA-knock-out Mutante in den Speicheldrüsen einen

spezifischen viralen miRNA-Effekt darstellt. Möglicherweise ist die Kontrolle des Immunsystems in diesem speziellen Organ durch die MCMV miRNAs auch von besonderer Wichtigkeit, oder es stellt einen miRNA vermittelten Effekt dar, der z.B. in anderen Organen durch andere virale Gene vermittelt wird.

5.3 Kombinierte Depletion von NK- Zellen und CD4⁺ T-Zellen revertiert den Phänotyp aber beeinflusst die infizierten Zelltypen in den Speicheldrüsen

Herpesviren haben sich über den langen Zeitraum der Koevolution eine Vielzahl von Strategien zurechtgelegt, dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen. Die Speicheldrüsen stellen hierbei einen ganz besonderen Ort für die CMV-Infektion dar. Hier persistiert das Virus und die Weiterverbreitung des Virus über den Speichel stellt einen der Hauptwege der horizontalen Transmission dar, ebenso wie die Weitergabe über die genitalen Schleimhäute.

Tatsächlich wurde MCMV ursprünglich zum ersten Mal aus den Speicheldrüsen einer chronisch infizierten Maus isoliert und als „Speicheldrüsen-Virus der Maus“ benannt [168]. Schon früh wurde vermutet, dass die Immunantwort in diesen Geweben wohl nicht der des übrigen Körpers entspricht und dass es das Virus hier geschafft hat, sich einer suffizienten Kontrolle zu entziehen. Dafür sprechen der Übertragungsweg von CMV und die hohe Reaktivierung des latenten Virus in diesen Geweben [158]. Trotz einer inflammatorischen Antwort etabliert sich eine chronische Infektion in den Speicheldrüsen, die z.T. noch nach Monaten sich replizierendes Virus aufweist, während hingegen die Infektion in allen anderen Organen bereits lange terminiert ist. Eine starke antivirale Immunantwort wird durch CD8⁺ T-Zellen vermittelt, die für die Viruseliminierung aus anderen Zielorganen, wie z.B. Milz und Lunge, eine wichtige Rolle spielen. Im Gegensatz dazu ist eine mögliche Eliminierung des Virus aus der Speicheldrüse durch das Immunsystem weitestgehend unabhängig von CD8⁺ T-Zellen [158]. Dies liegt allerdings weniger in einer fehlenden Effektivität von CD8⁺ T-Zellen, als in einer äußerst effizienten Immunevasion durch das Virus begründet. In den Speicheldrüsen sind vielmehr die CD4⁺ T-Zellen von Bedeutung. Sie entfalten ihre protektive Wirkung in enger Kooperation mit NK-Zellen, vor allem durch die Sekretion von TNF α und IFN γ [158]. Diese Zytokine haben einerseits direkte antivirale Eigenschaften und rekrutieren andererseits weitere Zellen in der Kaskade der viralen Immunabwehr, wie z.B. NK-Zellen.

Die Depletionsversuche wurden durchgeführt, um zu testen inwieweit die zwei MCMV miRNAs in der immunologischen Kontrolle des Virus in den Speicheldrüsen involviert sind. Die kombinierte Depletion von NK-Zellen und CD4⁺ T-Zellen war in der Lage, den Phänotyp der Attenuierung vollständig zu revertieren, Einzeldepletion vermochten dies nicht (siehe 4.3.6). Wie lässt sich dies erklären?

Unter starker Immunsuppression bleibt die persistierende Infektion in den Speicheldrüsen nicht auf die Speicheldrüsenepithelzellen beschränkt, sondern es kommt zur lytischen Infektion von Bindegewebszellen [166]. Daher ist es nicht auszuschließen, dass die verstärkte lytische Virus-Replikation in Bindegewebszellen (aufgrund der kombinierten NK- und CD4⁺ T-Zelldepletion) den selektiv in Speicheldrüsenepithelzellen auftretenden Phänotyp der viralen miRNAs einfach maskiert. Die Revertierung der Attenuierung der Mutante in den Speicheldrüsen nach kombinierter NK- und T-Zell Depletion muss daher nicht unbedingt für die Regulation der Immunantwort durch die beiden ausgeknockten MCMV miRNAs sprechen, sondern kann ebenso Ausdruck eines veränderten Zelltropismus von MCMV durch die fehlende immunologische Kontrolle sein.

Nichtsdestotrotz weisen unsere Ergebnisse klar darauf hin, dass zumindest eine der ausgeschalteten miRNAs eine persistierende MCMV-Infektion in den Speicheldrüsen unterstützt und so eine effizientere horizontale Transmission des Virus ermöglicht.

5.4 Identifizierung von miRNA Zielgenen mittels RIP-Chip

Neben der Identifizierung des ersten in vivo Phänotyps viraler miRNAs hat die erfolgreiche Entwicklung und Etablierung der Immunopräzipitation von RISC-Komplexen gefolgt von Microarray-Analysen (RIP-Chip) wesentlich zu unserem Verständnis der Funktion viraler miRNAs beigetragen. MicroRNAs eröffnen den Organismen eine unglaublich feingesteuerte und vielfältige Möglichkeit tausende von eigenen, wie auch fremden Genen (siehe Interaktion Virus – Zelle) zu regulieren. Hat die Entdeckung von zellulären miRNAs schon gezeigt, dass unser Wissen um die biologischen Regulationswege der Zelle bei Weitem noch nicht in ihrer vollen Komplexität erfasst sind, so gab uns die Erkenntnis, dass auch Viren ihre eigenen miRNAs kodieren, weitere Rätsel um die unglaublich vielfältige Interaktion von Virus und Wirt auf. Da virale miRNAs nachgewiesener Weise sowohl virale, als auch zelluläre Gene regulieren [169], ist die Identifikation von Zielgenen, eingedenk der mangelnden evolutionären Konservierung der miRNAs, sowie der Tatsache, dass miRNAs eine vergleichsweise sehr geringe Komplementarität zu ihrer Bindungsregion brauchen, ein schwieriges und mühsames Unterfangen. Frühere Versuche miRNA-Zielgene alleine mit bioinformatischen Vorhersagen zu identifizieren scheiterten häufig aufgrund dieser Besonderheiten. Ähnlich fehlerbehaftet waren die Versuche, miRNA-Zielgene mittels Microarray-Expressionsprofilanalysen zu identifizieren welche auf der Auswertung von Veränderungen der Gesamt-RNA einer Zelle basieren. Zum einen muss sich keine Änderung in Expressionsprofilen von mRNA ergeben, wenn nämlich der Effekt der miRNA hauptsächlich auf posttranslationaler Ebene stattfindet [169]. Zum anderen sind die Effekte

zum Teil so klein, dass sie mit der Anwendung eines zu engen Cutt-offs bei der Datenauswertung verloren gehen.

Somit war die Identifikation von viralen Zielgenen lange Zeit ein Versuch-und-Irrtum-Unterfangen, bevor die ersten Experimente mittels RISC-IP und anschließender Microarray-Analyse begonnen wurden (RIP-Chip).

Wir benutzten den für Maus-Ago2 –spezifischen monoklonalen Antikörper, entwickelt im Labor von Gunther Meister (Max-Planck-Institut, Martinsried), um die Ago2-RISC-Komplexe zu isolieren. Hiermit erzielten wir beispielsweise eine ~1000fache Anreicherung von zellulären miRNAs (z.B. Let7a oder miRNA16), verglichen mit dem Kontroll-Pulldown mit einem unspezifischen Antikörper.

Auf diese Weise konnten wir zeigen, dass die MCMV miRNAs viele zentrale zelluläre Vorgänge wie Apoptose, Zellzyklus und Signaltransduktion regulieren, die alle ebenfalls durch eine ganze Reihe viraler Proteine reguliert werden. Dies deutet auf eine enge Kooperation von viralen miRNAs und viralen Proteinen bei der Optimierung des zellulären Milieus hin.

5.4.1 Kooperation von viralen Proteinen und miRNAs bei der Regulation von aktivierenden NK-Zell Liganden

Ein Charakteristikum der Herpesviren ist es, dass sie in der Lage sind eine lebenslange Infektion des Wirts aufrechtzuerhalten. Dies wird ihnen u.a. dadurch ermöglicht, dass sie sich im Laufe der Koevolution mit dem Wirt ein breites Repertoire an Strategien zurechtgelegt haben, dessen Immunsystem zu entgehen. Bei der Eliminierung virusinfizierter oder tumorös transformierter Zellen durch das Immunsystem spielen NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) eine große Rolle [170]. Veränderungen in der Balance zwischen einer Vielzahl von aktivierenden und inhibierenden Faktoren resultieren in der unmittelbaren Abtötung der markierten Zellen. Der NKG2D-Rezeptor ist einer der stärksten Aktivatoren der NK-Zellen [171]. Dieser erkennt verschiedene Liganden, u.a. MICA, MICB und ULBP1-4 und wird durch sie aktiviert. Diese Liganden werden stress-induziert hochreguliert und dann vermehrt auf den Zellen präsentiert. „Stress“ kann hierbei eine Virusinfektion sein, aber auch eine tumoröse Transformation, Hitzeschock oder DNA-Schäden [121]. Für Viren ist es daher von besonderer Bedeutung, die Aktivierung dieses potenten NK-Zellrezeptors zu vermeiden.

2007 wurde MICB als Zielgen der miRNA miR-UL112 des humanen Zytomegalovirus entdeckt. Dies zeigte zum ersten Mal, dass eine virale miRNA dazu benutzt wird, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen [83]. Im Folgenden konnte die gleiche Arbeitsgruppe

zeigen, dass die Regulation von MICB über eine virale miRNA in diversen Herpesviren (HCMV, KSHV und EBV) konserviert ist [121]. Interessanterweise gibt es zwischen den miRNAs dieser Viren keinerlei Sequenzhomologie, lediglich die Funktion ist konserviert. Wenn also in einer dieser Bindungsstellen eine Mutation geschieht, wird dadurch die Bindung und Funktion von lediglich einer miRNA verhindert, ohne dabei die Herunterregulierung von MICB durch die anderen, weiterhin funktionstüchtigen miRNAs zu beeinflussen. Zusätzlich produzieren manche dieser Viren Proteine wie K5 (KSHV) und UL16 (HCMV), die ebenfalls MICB und andere NKG2D-Liganden herabregulieren. Dies weist darauf hin, dass MICB und dessen Funktionskaskade eine immens wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Herpesviren und Mensch spielt.

Während MICA/B in der Maus nicht vorkommen, regulieren und aktivieren hier eine ganze Reihe von Stress-induzierten Liganden den NKG2D-Rezeptor – darunter auch die Familie der Retinsäure-induzierten frühen Transkripte (*retinoic acid early inducible transcripts 1 – Raet1*). Sie wurden zuerst in Mäusen entdeckt, bevor ihre Homologe dann auch im Menschen nachgewiesen wurden [172]. Die humanen Vertreter werden ebenfalls als Raet1 bzw. als ULBP bezeichnet [173-174].

Unter den durch RISC-IP ermittelten und mittels TaqMan-PCR bestätigten Zielgenen der untersuchten miRNAs waren auffällig viele Vertreter der Raet1-Liganden (4.4.5.1 und 4.4.5.2). Auch wenn wir die dafür verantwortliche miRNA noch nicht identifizieren konnten deuten diese Ergebnisse doch darauf hin, dass miRNAs in der NK-Zellevasion von MCMV eine Rolle spielen und die infizierten Zellen vor der NK-Zell-vermittelten Abtötung schützen. Die Identifizierung der verantwortlichen miRNA und die Charakterisierung von Virusmutanten, denen nicht nur diese miRNA sondern auch die Raet1-Liganden regulierenden viralen Proteine fehlen, wird in Zukunft wesentlich zu einem besseren Verständnis der Kooperation zwischen miRNA- und Protein-bedingter Regulation beitragen.

5.4.2 Identifikation von viralen miRNAs in KSHV/EBV mittels RIP-Chip

Die in dieser Arbeit etablierte Methode der RIP-Chip Analyse wurde ebenfalls erfolgreich auf die Identifikation von viralen miRNAs in KSHV und EBV angewendet. KSHV und EBV zählen zu den γ -Herpesviren und haben beide onkogene Eigenschaften (siehe 2.1). Zielzellen beider Viren sind die B-Lymphozyten des Wirtes. In diesen Zellen gehen die Viren in Latenz und persistieren so lebenslang im Wirtskörper. In diesem Zustand werden nur wenig virale Proteine produziert, die meisten dienen zur Aufrechterhaltung des Latenzzustandes. Erstaunlich jedoch ist die Tatsache, dass die vielfältigen Veränderungen, die die Wirtszelle während der Viruslatenz durchmacht, nicht alleine auf die wenigen exprimierten viralen

Proteine zurückzuführen sind. Im Gegensatz zu den miRNAs des Zytomegalovirus, welches seine miRNAs v.a. während der lytischen Infektion zu exprimieren scheint, werden die miRNAs von KSHV und EBV während der Latenz der Viren exprimiert und sind maßgeblich an deren Aufrechterhaltung beteiligt [11, 169]. Mit Hilfe eines hochspezifischen monoklonalen Antikörpers gegen menschliches Argonaute2 (α -hAgo2;11A9), der ebenfalls aus dem Labor von Gunther Meister stammte [11], konnten wir so mehr als 150 Zielgene von KSHV und EBV miRNAs identifizieren und somit den ersten Atlas von miRNA-Zielgenen der humanen γ -Herpesviren erstellen [11]. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte hierbei die Etablierung des RIP-Chip-Protokolls auch für den humanen Ago2-Antikörper und MCMV (Murines CMV). Dieses Protokoll wurde eins zu eins für die Identifikation der miRNA-Zielgene von KSHV und EBV übernommen, die Proben aus den ersten drei von insgesamt sechs Zellreihen (DG75-eGFP, DG75-10/11 und BCBL-1) wurden im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet.

5.4.3 Ausblick

Die Entwicklung von UV-crosslinking Technologien (HITS-CLIP und PAR-CLIP), kombiniert mit *Next-Generation Sequencing* eröffnet inzwischen neue Möglichkeiten, nicht nur die von miRNAs regulierten Gene, sondern auch ihre Bindungsstellen auf der gesamten Transkriptionsebene zu identifizieren [175-176]. Erst kürzlich erschienen hierzu die ersten beiden Arbeiten, die hunderte Zielgene von KSHV und EBV miRNAs identifizierten [144-145]. Interessanterweise fanden sie eine signifikante Überlappung der von diesen beiden Viren mittels ihrer miRNAs regulierten Gene.

Bis vor Kurzem bestand das wesentliche Problem bei der Erforschung viraler miRNAs noch darin, überhaupt Gene zu identifizieren, die durch diese reguliert werden. Mit diesen beiden Arbeiten hat sich dies nun grundlegend verändert. Die wichtige Aufgabe wird es nun sein, aus der Vielzahl der regulierten Gene die wirklich infektions-relevanten Gene zu identifizieren. Hierbei ist es wichtig zu bedenken, dass PAR-CLIP und HITS-CLIP keine quantitative Aussage zur Stärke der miRNA-bedingten Regulation erlauben. Wie wir zeigen konnten, ist dies aber zumindest zum Teil mittels RIP-CHIP möglich [169]. Die Zukunft der Forschung an viralen miRNAs liegt somit in der Kombination aus RIP-Chip, CLIP-Seq sowie quantitativen Proteomics Technologien (SILAC) um die von miRNAs regulierten Gene, ihre Bindungsstellen und ihre Effekte auf Proteinmengen parallel zu bestimmen. Zusammen mit den etablierten Tiermodellen wird sich dann klären lassen, ob sich virale miRNAs als Zielstrukturen für neue antivirale Medikamente eignen.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.p.i.	Tage nach Infektion
dsDNA	Doppelstrang DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
evtl.	eventuell
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCMV	Humanes Zytomegalovirus
HHV	Humanes Herpesvirus
h.p.i.	Stunden nach Infektion
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
i.d.R.	in der Regel
kbp	Kilobasenpaare
LB	lysogeny broth
MCMV	Murines Zytomegalovirus
miRNA	microRNA
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger RNA
mut	Mutante
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
ORI	Origin of Replication
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFU	Plaque Forming Unit
qPCR	Real-Time-quantitative-PCR
rev	Revertante
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

s.	siehe
SILAC	Selective isotope labelling of aminoacids in cell culture
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	TRIS-Azetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tx	Transplantation
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vs.	versus
VSB	Virusstandardpuffer
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

6.2 Lebenslauf

Angaben zur Person

Nachname/ Vorname(n) **Kothe, Sheila Isabella Karola**

Adresse Lerchenweg 7, 82061 Neuried

Staatsangehörigkeit Deutsch

Geburtsdatum 11.03.1985

Geschlecht weiblich

Schul- und Berufsbildung

Zeitraum 09/2011

Bezeichnung der erworbenen Qualifikation Beginn der beruflichen Tätigkeit als Assistenzärztin im Klinikum Bogenhausen München (StkM)

Hauptfächer/berufliche Fähigkeiten Neurochirurgie

Zeitraum 06/2011

Bezeichnung der erworbenen Qualifikation Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Approbation erteilt

Hauptfächer/berufliche Fähigkeiten Humanmedizin

Zeitraum 08/09 2006

Bezeichnung der erworbenen Qualifikation Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Hauptfächer/berufliche Fähigkeiten Humanmedizin

Zeitraum 10/2004

Bezeichnung der erworbenen Qualifikation Studentin

Hauptfächer/berufliche Fähigkeiten Humanmedizin

Zeitraum 1995 -2004

Bezeichnung der erworbenen Qualifikation Allgemeine Hochschulreife, bayerisches Abitur

Zeitraum 1991-1995

Bezeichnung der erworbenen Qualifikation Grundschulzeit, Übertritt ins Gymnasium

Berufserfahrung

Zeitraum	10/2010 – 01/2011
Beruf oder Funktion	PJ ,Tertial III
Tätigkeitsfeld	Neurologie
Name des Arbeitgebers	Neurologische Klinik und Poliklinik, Campus Großhadern
Zeitraum	06/2010 – 10/2010
Beruf oder Funktion	PJ, Tertial II
Tätigkeitsfeld	Innere Medizin
Name des Arbeitgebers	Medizinische Klinik Innenstadt
Zeitraum	02/2010 – 06/2010
Beruf oder Funktion	PJ, Tertial I
Tätigkeitsfeld	Chirurgie
Name des Arbeitgebers	Städtisches Klinikum München Harlaching
Zeitraum	03/2009
Beruf oder Funktion	Famulatur
Tätigkeitsfeld	Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Name des Arbeitgebers	Medizinische Klinik und Poliklinik III, Campus Großhadern
Zeitraum	02/2009 – 03/2009
Beruf oder Funktion	Internationaler Forschungsaustausch, Indonesien
Tätigkeitsfeld	Tropenmedizin
Name des Arbeitgebers	ifmsa
Zeitraum	09/2008
Beruf oder Funktion	Famulatur
Tätigkeitsfeld	Praxis für Innere Medizin, Nephrologie, Dialyse
Name des Arbeitgebers	KfH Nierenzentrum, Seybothstrasse, München Harlaching
Zeitraum	03/2008
Beruf oder Funktion	Famulatur
Tätigkeitsfeld	Medizinische Mikrobiologie
Name des Arbeitgebers	Max v. Pettenkofer Institut München
Zeitraum	02/03 2007
Beruf oder Funktion	Famulatur
Tätigkeitsfeld	Innere Medizin Schwerpunkt Onkologie, Gastroenterologie
Name des Arbeitgebers	Städtisches Klinikum München Bogenhausen

Persönliche Fähigkeiten und Kompetenzen

Muttersprache	Deutsch
Sonstige Sprachen	Englisch, Französisch, Latein
Führerschein(e)	Klasse B

7 Referenzen

1. E.S. Mocarski, J.T.S.R.F.P., *Cytomegaloviruses*, in *Fields Virology*, D.M.K.P.M. Howley, Editor. 2007, Lipincott Williams & Wilkins p. 2701-2772.
2. Scalzo, A.A., et al., *The interplay between host and viral factors in shaping the outcome of cytomegalovirus infection*. *Immunol Cell Biol*, 2007. **85**(1): p. 46-54.
3. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. *Nature*, 2004. **431**(7006): p. 350-5.
4. Baek, D., et al., *The impact of microRNAs on protein output*. *Nature*, 2008. **455**(7209): p. 64-71.
5. Selbach, M., et al., *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. *Nature*, 2008. **455**(7209): p. 58-63.
6. Gottwein, E. and B.R. Cullen, *Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity*. *Cell Host Microbe*, 2008. **3**(6): p. 375-87.
7. Dolken, L., et al., *Mouse cytomegalovirus microRNAs dominate the cellular small RNA profile during lytic infection and show features of posttranscriptional regulation*. *J Virol*, 2007. **81**(24): p. 13771-82.
8. Dolken, L., et al., *Cytomegalovirus microRNAs facilitate persistent virus infection in salivary glands*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(10): p. e1001150.
9. Polic, B., et al., *Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection*. *J Exp Med*, 1998. **188**(6): p. 1047-54.
10. Polic, B., et al., *Lack of MHC class I complex expression has no effect on spread and control of cytomegalovirus infection in vivo*. *J Gen Virol*, 1996. **77** (Pt 2): p. 217-25.
11. Dolken, L., et al., *Systematic analysis of viral and cellular microRNA targets in cells latently infected with human gamma-herpesviruses by RISC immunoprecipitation assay*. *Cell Host Microbe*, 2010. **7**(4): p. 324-34.
12. Cummins, J.M. and V.E. Velculescu, *Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis*. *Oncogene*, 2006. **25**(46): p. 6220-7.
13. Roizman, P.P.B., *The Family: Herpesviridae A Brief Introduction*, in *Fields Virology*, D.M.K.P.M. Howley, Editor. 2007, Lipincott Williams & Wilkins. p. 2479-2500.
14. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: a tale of two membranes*. *Curr Opin Microbiol*, 2006. **9**(4): p. 423-9.
15. Zhou, Z.H., et al., *Protein subunit structures in the herpes simplex virus A-capsid determined from 400 kV spot-scan electron cryomicroscopy*. *J Mol Biol*, 1994. **242**(4): p. 456-69.
16. Field, H.J., S. Biswas, and I.T. Mohammad, *Herpesvirus latency and therapy--from a veterinary perspective*. *Antiviral Res*, 2006. **71**(2-3): p. 127-33.
17. Mitchell, B.M., et al., *Herpes simplex virus-1 and varicella-zoster virus latency in ganglia*. *J Neurovirol*, 2003. **9**(2): p. 194-204.
18. Barozzi, P., et al., *B cells and herpesviruses: a model of lymphoproliferation*. *Autoimmun Rev*, 2007. **7**(2): p. 132-6.
19. Dourmishev, L.A., et al., *Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003. **67**(2): p. 175-212, table of contents.
20. Radaszkiewicz, T., M.L. Hansmann, and K. Lennert, *Monoclonality and polyclonality of plasma cells in Castleman's disease of the plasma cell variant*. *Histopathology*, 1989. **14**(1): p. 11-24.

21. Delecluse, H.J., et al., *Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist*. J Clin Pathol, 2007. **60**(12): p. 1358-64.
22. Ho, M., *The history of cytomegalovirus and its diseases*. Med Microbiol Immunol, 2008. **197**(2): p. 65-73.
23. Wittek, M.B., Doerr, H.W., *Das humane Zytomegalievirus (HCMV)*. MTA Dialog, 2008. **9**(8): p. 648-50.
24. Britt, W., *Manifestations of Human Cytomegalovirus Infection: Proposed Mechanisms of Acute and Chronic Disease*, in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, T.S. Shenk, M., Editor. 2008, Springer Verlag: Heidelberg.
25. Hahn, F.K.U., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 5th ed. 2004, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
26. Rafailidis, P.I., et al., *Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review*. Virol J, 2008. **5**: p. 47.
27. Hufschmidt, A., Lücking, C.H., et al., *Neurologie compact*. 4 ed, ed. A. Hufschmidt, Lücking, C.H. 2006, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
28. Pereira, L., *Cytomegalovirus Infection in the Human Placenta:maternal Immunity and Developmentally Regulated Receptors on Trophoblasts Converge*, in *Human Cytomegalovirus*, T.S. Shenk, M., Editor. 2008, Springer Verlag: Heidelberg.
29. Boppana, S.B., et al., *Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity*. N Engl J Med, 2001. **344**(18): p. 1366-71.
30. Fowler, K.B., S. Stagno, and R.F. Pass, *Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection*. JAMA, 2003. **289**(8): p. 1008-11.
31. Wintergerst, U., *Severe congenital CMV infection despite maternal CMV seropositivity. Case report and review of the literature*. Monatsschr Kinderheilkd, 2006: p. 558-64.
32. Muhlemann, K., et al., *Cytomegalovirus infection of the human placenta: an immunocytochemical study*. Hum Pathol, 1992. **23**(11): p. 1234-7.
33. Hodl, S., et al., [*Blueberry muffin baby: the pathogenesis of cutaneous extramedullary hematopoiesis*]. Hautarzt, 2001. **52**(11): p. 1035-42.
34. Boppana, S.B., et al., *Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality*. Pediatr Infect Dis J, 1992. **11**(2): p. 93-9.
35. Hamprecht, K., et al., *Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding*. Lancet, 2001. **357**(9255): p. 513-8.
36. Hamprecht, K., et al., *Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation*. J Clin Virol, 2008. **41**(3): p. 198-205.
37. Steininger, C., *Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(10): p. 953-63.
38. Perez-Sola, M.J., et al., *Indirect effects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2008. **26**(1): p. 38-47.
39. Rowshani, A.T., et al., *Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients*. Transplantation, 2005. **79**(4): p. 381-6.
40. Legendre, C. and M. Pascual, *Improving outcomes for solid-organ transplant recipients at risk from cytomegalovirus infection: late-onset disease and indirect consequences*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(5): p. 732-40.
41. Baldanti, F., D. Lilleri, and G. Gerna, *Human cytomegalovirus load measurement and its applications for pre-emptive therapy in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation*. Hematol Oncol, 2008. **26**(3): p. 123-30.
42. O'Sullivan, C.E., et al., *Decrease of cytomegalovirus replication in human immunodeficiency virus infected-patients after treatment with highly active antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 1999. **180**(3): p. 847-9.

43. Steininger, C., E. Puchhammer-Stockl, and T. Popow-Kraupp, *Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART)*. J Clin Virol, 2006. **37**(1): p. 1-9.
44. Griffiths, P.D., *CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS*. J Clin Virol, 2006. **35**(4): p. 489-92.
45. Kovacs, A., et al., *Cytomegalovirus infection and HIV-1 disease progression in infants born to HIV-1-infected women. Pediatric Pulmonary and Cardiovascular Complications of Vertically Transmitted HIV Infection Study Group*. N Engl J Med, 1999. **341**(2): p. 77-84.
46. Modrow, D.F.U.T.S., *Molekulare Virologie*. 2th ed. 2003: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.Berlin.
47. Butel, J.S., *Virology*. 24 ed. Medical Microbiology, ed. M.A. Jawetz. 2007: Mc Graw Hill Medical, Lange.
48. Hudson, J.B., *The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections*. Arch Virol, 1979. **62**(1): p. 1-29.
49. Krmpotic, A., et al., *Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection*. Microbes Infect, 2003. **5**(13): p. 1263-77.
50. Mayo, D.R., J.A. Armstrong, and M. Ho, *Reactivation of murine cytomegalovirus by cyclophosphamide*. Nature, 1977. **267**(5613): p. 721-3.
51. Reddehase, M.J., et al., *Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs*. J Virol, 1985. **55**(2): p. 264-73.
52. Reddehase, M.J., et al., *The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 185-93.
53. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
54. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
55. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
56. Hamilton, A.J. and D.C. Baulcombe, *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants*. Science, 1999. **286**(5441): p. 950-2.
57. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
58. Zamore, P.D. and B. Haley, *Ribo-gnome: the big world of small RNAs*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1519-24.
59. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
60. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
61. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 858-62.
62. Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 862-4.
63. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.

64. Bernstein, E., et al., *Dicer is essential for mouse development*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 215-7.
65. Harris, K.S., et al., *Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2208-13.
66. Harfe, B.D., et al., *The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 10898-903.
67. O'Rourke, J.R., et al., *Essential role for Dicer during skeletal muscle development*. Dev Biol, 2007. **311**(2): p. 359-68.
68. Muljo, S.A., et al., *Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 261-9.
69. Bhatti, I., et al., *Small RNA: a large contributor to carcinogenesis?* J Gastrointest Surg, 2009. **13**(7): p. 1379-88.
70. Carissimi, C., V. Fulci, and G. Macino, *MicroRNAs: novel regulators of immunity*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(6): p. 520-4.
71. Bueno, M.J., I.P. de Castro, and M. Malumbres, *Control of cell proliferation pathways by microRNAs*. Cell Cycle, 2008. **7**(20): p. 3143-8.
72. Blenkiron, C., et al., *MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype*. Genome Biol, 2007. **8**(10): p. R214.
73. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
74. Krutzfeldt, J., et al., *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 685-9.
75. Krutzfeldt, J., et al., *Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(9): p. 2885-92.
76. Brown, J.W., D.F. Marshall, and M. Echeverria, *Intronic noncoding RNAs and splicing*. Trends Plant Sci, 2008. **13**(7): p. 335-42.
77. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
78. Du, T. and P.D. Zamore, *microPrimer: the biogenesis and function of microRNA*. Development, 2005. **132**(21): p. 4645-52.
79. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
80. Pillai, R.S., C.G. Artus, and W. Filipowicz, *Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis*. RNA, 2004. **10**(10): p. 1518-25.
81. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 91-105.
82. Tay, Y., et al., *MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1124-8.
83. Stern-Ginossar, N., et al., *Host immune system gene targeting by a viral miRNA*. Science, 2007. **317**(5836): p. 376-81.
84. Orom, U.A., F.C. Nielsen, and A.H. Lund, *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. Mol Cell, 2008. **30**(4): p. 460-71.
85. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 835-40.
86. Sarnow, P., et al., *MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(9): p. 651-9.

87. Meister, G., et al., *Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs*. Mol Cell, 2004. **15**(2): p. 185-97.
88. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
89. Humphreys, D.T., et al., *MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(47): p. 16961-6.
90. Kiriakidou, M., et al., *An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1141-51.
91. Pillai, R.S., et al., *Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1573-6.
92. Lim, L.P., et al., *Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs*. Nature, 2005. **433**(7027): p. 769-73.
93. Bagga, S., et al., *Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation*. Cell, 2005. **122**(4): p. 553-63.
94. Liu, J., et al., *MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 719-23.
95. Parker, R. and U. Sheth, *P bodies and the control of mRNA translation and degradation*. Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 635-46.
96. Behm-Ansmant, I., et al., *mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes*. Genes Dev, 2006. **20**(14): p. 1885-98.
97. Sheth, U. and R. Parker, *Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies*. Science, 2003. **300**(5620): p. 805-8.
98. Bhattacharyya, S.N., et al., *Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006. **71**: p. 513-21.
99. Bhattacharyya, S.N., et al., *Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1111-24.
100. Brennecke, J., et al., *Principles of microRNA-target recognition*. PLoS Biol, 2005. **3**(3): p. e85.
101. Rehmsmeier, M., et al., *Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes*. RNA, 2004. **10**(10): p. 1507-17.
102. Enright, A.J., et al., *MicroRNA targets in Drosophila*. Genome Biol, 2003. **5**(1): p. R1.
103. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
104. Grun, D., et al., *microRNA target predictions across seven Drosophila species and comparison to mammalian targets*. PLoS Comput Biol, 2005. **1**(1): p. e13.
105. Volinia, S., et al., *Identification of microRNA activity by Targets' Reverse EXpression*. Bioinformatics, 2010. **26**(1): p. 91-7.
106. Robins, H., Y. Li, and R.W. Padgett, *Incorporating structure to predict microRNA targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4006-9.
107. Kertesz, M., et al., *The role of site accessibility in microRNA target recognition*. Nat Genet, 2007. **39**(10): p. 1278-84.
108. Pfeffer, S., et al., *Identification of virus-encoded microRNAs*. Science, 2004. **304**(5671): p. 734-6.
109. Dolken, L., S. Pfeffer, and U.H. Koszinowski, *Cytomegalovirus microRNAs*. Virus Genes, 2009. **38**(3): p. 355-64.
110. Burnside, J., et al., *Marek's disease virus encodes MicroRNAs that map to meq and the latency-associated transcript*. J Virol, 2006. **80**(17): p. 8778-86.

111. Cui, C., et al., *Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5499-508.
112. Yao, Y., et al., *Marek's disease virus type 2 (MDV-2)-encoded microRNAs show no sequence conservation with those encoded by MDV-1*. J Virol, 2007. **81**(13): p. 7164-70.
113. Stevens, J.G., et al., *RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1056-9.
114. Cai, W., et al., *The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 enhances virus replication during acute infection and reactivation from latency*. J Virol, 1993. **67**(12): p. 7501-12.
115. Halford, W.P., et al., *ICP0, ICP4, or VP16 expressed from adenovirus vectors induces reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in primary cultures of latently infected trigeminal ganglion cells*. J Virol, 2001. **75**(13): p. 6143-53.
116. Umbach, J.L., et al., *MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs*. Nature, 2008. **454**(7205): p. 780-3.
117. Stark, T.J., et al., *High-resolution profiling and analysis of viral and host small RNAs during human cytomegalovirus infection*. J Virol, 2012. **86**(1): p. 226-35.
118. Dunn, C., et al., *Human cytomegalovirus glycoprotein ULI6 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity*. J Exp Med, 2003. **197**(11): p. 1427-39.
119. Grey, F., et al., *Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 12095-9.
120. Pfeffer, S., et al., *Identification of microRNAs of the herpesvirus family*. Nat Methods, 2005. **2**(4): p. 269-76.
121. Nachmani, D., et al., *Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(4): p. 376-85.
122. Grey, F., et al., *A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication*. PLoS Pathog, 2007. **3**(11): p. e163.
123. Murphy, E., et al., *Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: implications for latency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5453-8.
124. Buck, A.H., et al., *Discrete clusters of virus-encoded microRNAs are associated with complementary strands of the genome and the 7.2-kilobase stable intron in murine cytomegalovirus*. J Virol, 2007. **81**(24): p. 13761-70.
125. Buck, A.H., et al., *Post-transcriptional regulation of miR-27 in murine cytomegalovirus infection*. RNA, 2010. **16**(2): p. 307-15.
126. Libri, V., et al., *Murine cytomegalovirus encodes a miR-27 inhibitor disguised as a target*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(1): p. 279-84.
127. Tuddenham, L., et al., *Small RNA deep sequencing identifies microRNAs and other small noncoding RNAs from human herpesvirus 6B*. J Virol, 2012. **86**(3): p. 1638-49.
128. Cai, X., et al., *Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed*. PLoS Pathog, 2006. **2**(3): p. e23.
129. Grundhoff, A., C.S. Sullivan, and D. Ganem, *A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses*. RNA, 2006. **12**(5): p. 733-50.
130. Zhu, J.Y., et al., *Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3333-41.
131. Barth, S., et al., *Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(2): p. 666-75.

132. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: tools for microRNA genomics*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D154-8.
133. Griffiths-Jones, S., *The microRNA Registry*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D109-11.
134. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D140-4.
135. Marshall, V., et al., *Conservation of virally encoded microRNAs in Kaposi sarcoma--associated herpesvirus in primary effusion lymphoma cell lines and in patients with Kaposi sarcoma or multicentric Castleman disease*. J Infect Dis, 2007. **195**(5): p. 645-59.
136. Sullivan, C.S., *High conservation of Kaposi sarcoma--associated herpesvirus microRNAs implies important function*. J Infect Dis, 2007. **195**(5): p. 618-20.
137. Baroni, T.E., et al., *Advances in RIP-chip analysis : RNA-binding protein immunoprecipitation-microarray profiling*. Methods Mol Biol, 2008. **419**: p. 93-108.
138. Beitzinger, M., et al., *Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes*. RNA Biol, 2007. **4**(2): p. 76-84.
139. Easow, G., A.A. Teleanu, and S.M. Cohen, *Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification*. RNA, 2007. **13**(8): p. 1198-204.
140. Hendrickson, D.G., et al., *Systematic identification of mRNAs recruited to argonaute 2 by specific microRNAs and corresponding changes in transcript abundance*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2126.
141. Karginov, F.V., et al., *A biochemical approach to identifying microRNA targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19291-6.
142. Keene, J.D., J.M. Komisarow, and M.B. Friedersdorf, *RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 302-7.
143. Yang, J.H., et al., *starBase: a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D202-9.
144. Skalsky, R.L., et al., *The Viral and Cellular MicroRNA Targetome in Lymphoblastoid Cell Lines*. PLoS Pathog, 2012. **8**(1): p. e1002484.
145. Gottwein, E., et al., *Viral microRNA targetome of KSHV-infected primary effusion lymphoma cell lines*. Cell Host Microbe, 2011. **10**(5): p. 515-26.
146. Warming, S., et al., *Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(4): p. e36.
147. Birnboim, H.C., *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA*. Methods Enzymol, 1983. **100**: p. 243-55.
148. Don, R.H., et al., *Touchdown Pcr to Circumvent Spurious Priming during Gene Amplification*. Nucleic Acids Research, 1991. **19**(14): p. 4008-4008.
149. Messerle, M., et al., *Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14759-63.
150. Rawlinson, W.D., H.E. Farrell, and B.G. Barrell, *Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8833-49.
151. Wagner, M., et al., *Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 7056-60.
152. Copeland, N.G., N.A. Jenkins, and D.L. Court, *Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(10): p. 769-79.
153. Court, D.L., J.A. Sawitzke, and L.C. Thomason, *Genetic engineering using homologous recombination*. Annu Rev Genet, 2002. **36**: p. 361-88.

154. Lee, E.C., et al., *A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA*. Genomics, 2001. **73**(1): p. 56-65.
155. Yu, D., et al., *An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5978-83.
156. Cobbold, S.P., et al., *Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo*. Nature, 1984. **312**(5994): p. 548-51.
157. Koo, G.C. and J.R. Peppard, *Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody*. Hybridoma, 1984. **3**(3): p. 301-3.
158. Campbell, A.E., V.J. Cavanaugh, and J.S. Slater, *The salivary glands as a privileged site of cytomegalovirus immune evasion and persistence*. Med Microbiol Immunol, 2008. **197**(2): p. 205-13.
159. De Marchis, M.L., et al., *A new molecular network comprising PU.1, interferon regulatory factor proteins and miR-342 stimulates ATRA-mediated granulocytic differentiation of acute promyelocytic leukemia cells*. Leukemia, 2009. **23**(5): p. 856-62.
160. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 25-9.
161. Schwanhauser, B., et al., *Global quantification of mammalian gene expression control*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 337-42.
162. Sacher, T., et al., *The major virus-producing cell type during murine cytomegalovirus infection, the hepatocyte, is not the source of virus dissemination in the host*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(4): p. 263-72.
163. Arase, H., et al., *Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors*. Science, 2002. **296**(5571): p. 1323-6.
164. Smith, H.R., et al., *Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8826-31.
165. Lussier, G., L. Berthiaume, and P. Payment, *Electron microscopy of murine cytomegalovirus: development of the virus in vivo and in vitro*. Arch Gesamte Virusforsch, 1974. **46**(3-4): p. 269-80.
166. Jonjic, S., et al., *Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes*. J Exp Med, 1989. **169**(4): p. 1199-212.
167. Osborn, J.E. and D.L. Walker, *Virulence and attenuation of murine cytomegalovirus*. Infect Immun, 1971. **3**(2): p. 228-36.
168. Smith, M.G., *Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures*. Proc Soc Exp Biol Med, 1954. **86**(3): p. 435-40.
169. Malterer, G., L. Dolken, and J. Haas, *The miRNA-targetome of KSHV and EBV in human B-cells*. RNA Biol, 2011. **8**(1): p. 30-4.
170. Arnon, T.I., G. Markel, and O. Mandelboim, *Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(5): p. 348-58.
171. Raulet, D.H., *Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 781-90.
172. Zou, Z., et al., *Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: a novel cDNA family encodes cell surface proteins sharing partial homology with MHC class I molecules*. J Biochem, 1996. **119**(2): p. 319-28.
173. Cosman, D., et al., *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 123-33.
174. Radosavljevic, M., et al., *A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3*. Genomics, 2002. **79**(1): p. 114-23.

175. Friedel, C.C., et al., *Conserved principles of mammalian transcriptional regulation revealed by RNA half-life*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(17): p. e115.
176. Chi, S.W., et al., *Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps*. Nature, 2009. **460**(7254): p. 479-86.