
Das Cytomegalievirus IE1-Protein als Regulator des humanen Transkriptoms und Zielstruktur RNAi-basierter Therapiestrategien



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT III - BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG

vorgelegt von
THERESA KNOBLACH
aus Schweinfurt

im September 2010

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Regensburg, im September 2010

.....

Theresa Knoblach

Promotionsgesuch eingereicht am: 6.9.2010

Tag der mündlichen Prüfung: 2.12.2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Dr. Christina Paulus und Dr. Michael Nevels

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Frank Sprenger (Vorsitzender)
Prof. Dr. Reinhard Sterner (1. Prüfer, Erstgutachten)
PD Dr. Michael Nevels (2. Prüfer, Zweitgutachten)
Prof. Dr. Richard Warth (3. Prüfer)

Für meine Eltern, Geschwister und Andy

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Das humane Cytomegalievirus	3
1.1.1 Klassifizierung, Epidemiologie, medizinische Bedeutung und Zelltropismus	3
1.1.2 Struktur und viraler Infektionszyklus	4
1.1.3 Antivirale Prävention und Therapie	5
1.2 RNA-Interferenz in der klinischen Entwicklung	7
1.3 Das IE1-72kDa-Protein	10
1.3.1 Interaktion von IE1 mit ND10-Kompartimenten	12
1.3.2 Interaktion von IE1 mit Proteinen der STAT-Familie	13
1.3.2.1 Signalweiterleitung durch STAT-Proteine	13
1.3.2.2 IE1-vermittelte IFN-Resistenz von hCMV durch Interaktion mit STAT2.....	16
1.4 Zielsetzung.....	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Antikörper.....	18
2.2 Oligonukleotide	18
2.3 siRNAs.....	20
2.4 HCMV BACmid und Plasmide	22
2.5 Zellen und Viren.....	23
2.5.1 Escherichia coli-Stämme	23
2.5.2 Humane Zellen	23
2.5.3 Viren.....	24
2.6 Nukleinsäure-Methoden	24
2.6.1 Standardmethoden	24
2.6.2 Herstellung neuer Plasmide.....	25
2.6.3 Herstellung des pTNLuc-BACmids	25
2.6.4 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR.....	27
2.6.5 Transkriptomanalyse	29
2.7 Proteinbiochemische Methoden	30
2.7.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	30
2.7.2 Zelluläre Fraktionierung.....	30
2.7.3 SDS-PAGE und Western Blot-Analyse	32

2.7.4 (Immun-)Fluoreszenzmikroskopie	32
2.7.5 Colorimetrischer Sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	33
2.7.6 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP).....	34
2.8 Zellkulturverfahren.....	36
2.8.1 Kultivierung humaner Zellen	36
2.8.2 Annealing und Transfektion von siRNAs	37
2.8.3 TNLuc-Virusrekonstitution und hCMV-Infektion	38
2.8.4 Bestimmung des Titers von hCMV-haltigen Kulturüberständen.....	38
2.8.5 Bestimmung der Luciferaseaktivität TNLuc-infizierter Zellen.....	39
2.8.6 Cytotoxizitätstest	40
2.8.7 Herstellung transgener MRC-5-Zellen mit Hilfe rekombinanter Retroviren	41
2.8.8 Fluoreszenz-basiertes Sortieren von Zellen.....	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Identifizierung antiviraler siRNAs	43
3.1.1 Herstellung und Charakterisierung eines Luciferase/EGFP-Reportervirus.....	43
3.1.2 Bestimmung geeigneter Zielgene und siRNA-Sequenzen	46
3.1.3 Untersuchung siRNA-abhängiger Effekte auf die Zellstoffwechselaktivität.....	47
3.1.4 Untersuchung der siRNA-vermittelten Knockdown-Effizienzen	49
3.1.5 Bestimmung von siRNA-vermittelten antiviralen Effekten.....	51
3.2 Optimierung IE1- und IE2-spezifischer siRNAs im Hinblick auf eine therapeutische Nutzung.....	54
3.2.1 IE1- und IE2-spezifische siRNAs mit konservierten Zielsequenzen	54
3.2.2 Wirkungsdauer der IE2-spezifischen siRNA UL122#1	56
3.2.3 Chemisch-modifizierte IE1- und IE2-spezifische siRNAs.....	57
3.3 Mechanismen der IE1-abhängigen Aktivierung zellulärer Gene	60
3.3.1 Herstellung und Charakterisierung einer Zelllinie mit induzierbarer IE1-Expression.....	60
3.3.2 Transkriptomanalyse IE1-induzierbarer Zellen.....	63
3.3.3 IE1 vermittelt eine IFN- γ -ähnliche Antwort	68
3.3.4 Zweiphasiger Mechanismus der IE1-abhängigen Genregulation mit Beteiligung löslicher Faktoren.....	71
3.3.5 IFN-unabhängige Regulation der IE1-vermittelten ISG-Induktion	74
3.3.6 Bedeutung verschiedener Transkriptionsfaktoren für die IE1-abhängige Genregulation.....	76

3.3.7 Bestimmung der subzellulären Lokalisation verschiedener Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von IE1	80
3.3.8 IE1-abhängige Assoziation von STAT1 mit Typ II ISG-Promotoren.....	83
3.3.9 Bedeutung der STAT1-Y ₇₀₁ - und S ₇₂₇ -Phosphorylierungsstellen für die IE1- abhängige ISG-Induktion.....	86
3.3.10 Untersuchung der IE1-abhängigen Genregulation im Kontext einer hCMV- Infektion.....	89
4 Diskussion.....	91
4.1 Anwendung der RNAi-Technologie in der hCMV-Therapie.....	91
4.2 Mögliche biologische Konsequenzen der IE1-vermittelten Genregulation	92
4.2.1 Immunkontrolle	94
4.2.2 Reaktivierung aus der Latenz	95
4.2.3 Dissemination	97
4.2.4 HCMV-Pathogenese.....	97
4.3 Modell der IE1-abhängigen ISG-Aktivierung und Ausblick	98
5 Anhang.....	102
5.1 Literaturverzeichnis	102
5.2 Abkürzungsverzeichnis	113
5.3 Veröffentlichungen.....	115
Danksagung.....	116

Zusammenfassung

Das humane Cytomegalievirus (hCMV) ist ein medizinisch hoch relevantes Herpesvirus, das bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem (z.B. AIDS- und Transplantationspatienten) lebensbedrohliche Krankheiten auslösen kann und zudem die wichtigste infektiöse Ursache für embryonale Defekte ist. Bisher steht jedoch kein wirksamer hCMV-Impfstoff zur Verfügung und das Spektrum geeigneter Therapeutika ist äußerst begrenzt.

Das immediate-early 1 Protein (IE1) ist ein viraler Schlüsselregulator, der Proteine und übergeordnete Strukturen des infizierten Wirtszellkerns in vielfältiger Weise manipuliert und in der initialen Phase der Infektion in entscheidender Weise den weiteren Verlauf der hCMV-Replikation und Pathogenese bestimmt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, das Potential der RNA-Interferenz-Technologie als neues Therapiekonzept gegen hCMV zu untersuchen. Hierfür wurde ein Luciferase-Reportervirus hergestellt, welches das schnelle Screening antiviraler Effekte ermöglicht. Aus insgesamt 40 getesteten hCMV-gerichteten siRNAs konnten acht Moleküle identifiziert werden, die eine spezifische Inhibition der Virusvermehrung um mehr als 90% bewirkten. Die effektivsten Kandidaten wurden in Richtung einer therapeutischen Nutzung optimiert. In diesem Zusammenhang wurden IE1- und/oder IE2-spezifische siRNAs mit Zielsequenzen, die innerhalb aller annotierten hCMV-Stämme konserviert vorliegen und auch gegen klinisch relevante hCMV-Isolate antiviral aktiv waren, ausgewählt und chemisch modifiziert.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von IE1 auf das humane Transkriptom untersucht. Dazu wurde mit einem im Rahmen dieser Arbeit etablierten induzierbaren Expressionssystem, welches die Analyse von funktionellem IE1 außerhalb der komplexen Situation einer Virusinfektion ermöglicht, eine systematische Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dadurch konnten 25 IE1-induzierbare humane Gene identifiziert werden, die zugleich überwiegend in Zusammenhang mit der zellulären Typ II Interferon (IFN)-Antwort stehen. Mit Hilfe verschiedener Techniken wie der quantitativen reversen Transkriptase-PCR, Immunfluoreszenz-Analysen, zellulären Fraktionierungen, Chromatin-immunpräzipitationen sowie der Herstellung transgener Zellen, konnte ein zweiphasiger Mechanismus der IE1-vermittelten Genregulation mit Beteiligung löslicher Faktoren ermittelt werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die IE1-abhängige Induktion der normalerweise durch Typ II IFN regulierten Gene interessanterweise IFN-unabhängig erfolgt. Sie ist aber dennoch abhängig vom aktivierten (Y₇₀₁-phosphorylierten) signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), einem kritischen zellulären Mediator der IFN-Antwort. In

Korrelation dazu konnte eine IE1-vermittelte nukleäre Akkumulation sowie eine spezifische Assoziation des STAT1-Proteins mit den Promotoren Typ II IFN-stimulierter Gene beobachtet werden.

Aufgrund der gewonnenen Daten ließ sich schließlich ein vorläufiges Modell für die IE1-induzierte Typ II IFN-artige Antwort entwickeln. Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizieren IE1 als vielversprechende neue Zielstruktur für die hCMV-Therapie und offenbaren eine bisher noch unbekannte Funktion des viralen Proteins, die im Zusammenhang mit der hCMV-vermittelten Pathogenese oder der Virusreaktivierung stehen könnte.

1 Einleitung

1.1 Das humane Cytomegalievirus

1.1.1 Klassifizierung, Epidemiologie, medizinische Bedeutung und Zelltropismus

Das humane Cytomegalievirus (hCMV) ist einer von acht humanpathogenen Vertretern der Familie der Herpesviridae und gehört zur Unterfamilie der β -Herpesvirinae, die sich durch strikten Wirtstropismus sowie vergleichsweise langsame Replikation in Zellkultur auszeichnen (Modrow et al., 2010). In Abhängigkeit von Alter und sozioökonomischem Status beträgt die Seroprävalenz in Industriestaaten zwischen 30% und 70%, in Schwellenländern kann sie gegen 100% gehen. Die Übertragung findet durch Körpersekrete statt, wobei vor allem Kleinkinder eine bedeutende Infektionsquelle darstellen (Ludwig & Hengel, 2009). Eine Primärinfektion verläuft bei gesunden Individuen in der Regel asymptomatisch und führt, ähnlich wie bei anderen Herpesviren, zu einer lebenslangen Persistenz des Virus, die von regelmäßigen Reaktivierungen gekennzeichnet ist. In seltenen Fällen kann es zu einem Mononukleose-ähnlichen Krankheitsbild kommen (Cohen & Corey, 1985). Schwerwiegende Erkrankungen können allerdings bei immunsupprimierten Menschen, beispielsweise nach Organtransplantationen oder bei AIDS-Patienten auftreten. Sie reichen von einer eher harmlosen Fieberreaktion bis hin zu lebensbedrohlichen Organmanifestationen wie Hepatitis, Chorioretinitis, Enzephalitis, gastrointestinaler Ulzeration oder interstitieller Pneumonie. Letztere tritt bei 10-15% der Herz-, Lungen- oder Knochenmarktransplantationspatienten auf und führt unbehandelt in 80-90% der Fälle zum Tod. Sowohl eine hCMV-Primärinfektion als auch eine Reaktivierung können bei organtransplantierten Patienten zur Abstoßung des Transplantats führen (Becker et al., 1999; Britt, 1996; Harari et al., 2002; Jacobson & Bredt, 2002). Des Weiteren können schwere Schädigungen bei intrauterin infizierten Föten auftreten (Crough & Khanna, 2009). Besonders dieser Punkt ist von epidemiologischer Bedeutung, da je nach Land 0,15% bis 2% aller Neugeborenen betroffen sind (Malm & Engman, 2007). Die kongenitale hCMV-Infektion stellt in Europa die Hauptursache für neurologische Schäden bei Kindern dar. Spätfolgen umfassen darüber hinaus vor allem Gehör- und Augenschäden (Damato & Winnen, 2002; Ludwig & Hengel, 2009; Pass et al., 1980). Zudem steht die chronische hCMV-Infektion selbst bei immunkompetenten Erwachsenen in möglicher kausaler Beziehung zu verschiedenen Tumorerkrankungen (Michaelis et al., 2009) und mehreren anderen Krankheiten, wie z.B. Arteriosklerose und Autoimmunerkrankungen (Cheng et al., 2009).

Die hCMV-Infektion kann sich in fast jedem Organ manifestieren. Hauptzielzellen von hCMV sind Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten, aber auch Hepatozyten, Neuronen, glatte Muskelzellen und Zellen des hämatopoetischen Systems (Sinzger et al., 1995). Vermutlich nehmen Monozyten und Granulozyten durch Kontakt mit infizierten Endothelzellen das Virus auf und führen somit zu dessen Verbreitung in verschiedene Organe sowie ins Knochenmarkstroma (Gerna et al., 2000). Im Knochenmark werden während der Virämie CD33- und CD34-positive hämatopoetische Vorläuferzellen durch Kontakt mit Stromazellen infiziert und können damit als Verteiler von hCMV im hämatopoetischen System fungieren (Goodrum et al., 2002; Hahn et al., 1998).

1.1.2 Struktur und viraler Infektionszyklus

Das hCMV-Genom gehört mit über 230000 Nukleotiden doppelsträngiger DNA zu den größten Virusgenomen und enthält etwa 165 Gene (Davison et al., 2003). Die Nomenklatur der Gene richtet sich nach ihrer Position in der unique long (U_L)- oder unique short (U_S)-Region bzw. in den terminal repeat (TR_L , TR_S)- oder internal repeat (IR_L , IR_S)-Bereichen (jeweils long oder short) (siehe Abb. 1.1). Eine Besonderheit bei der Expression ist die bidirektionale Transkription von Genen (Jacobs & Langland, 1996). Somit können beide DNA-Stränge als Matrize dienen. Die DNA befindet sich in Virionen im Inneren eines ikosaedrischen Kapsids, das wiederum von einer als Tegumentschicht bezeichneten Proteinmatrix sowie einer Lipidhülle mit eingelagerten viralen Glykoproteinen umgeben ist. Das gesamte Viruspartikel hat einen Durchmesser von ca. 200 nm (Mocarski et al., 2007).

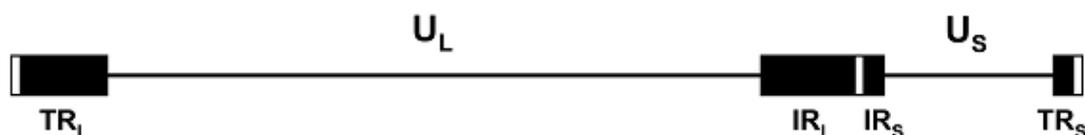


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der hCMV-Genomorganisation. Das Genom des hCMV besteht aus zwei nicht repetitiven Regionen, dem U_L (unique long)- und dem U_S (unique short)-Segment, die an den Enden von repetitiven Sequenzen, den terminal repeats (TR) und den internal repeats (IR), flankiert werden (jeweils long oder short).

Während der Infektion kommt es nach Anheftung des Virions an die Zelloberfläche je nach Zelltyp sofort oder erst nach Rezeptor-vermittelter Endozytose zu einer Membranfusion, so dass Kapsid- und Tegumentproteine ins Zytoplasma der Wirtszelle entlassen werden. Der Transport des Kapsids zum Kern erfolgt mit Hilfe des Mikrotubuli-Netzwerkes wobei auch Aktin- und Intermediärfilamente beteiligt zu sein scheinen (Miller & Hertel, 2009). Durch die

Kernporen werden die hCMV-Genome in den Kern eingeschleust, wo sie zirkularisieren und nach dem Prinzip des rolling circle repliziert werden (McVoy & Adler, 1994).

Im lytischen Infektionszyklus erfolgt die Expression der viralen Gene gemäß der drei kinetischen Klassen immediate early (IE), early (E) und late (L) kaskadenartig. Die IE-Proteine werden sofort nach Eintritt des Genoms in den Wirtszellkern exprimiert und sind auf folgende vier Regionen des hCMV-Genoms verteilt: UL36-37, UL122-123 (IE1 und IE2), US3 sowie TRS1/IRS1. Sie wirken unter anderem als Transaktivatoren auf die Expression der E- und L-Gene. Die E-Proteine sind notwendig für die virale DNA-Replikation, an der mindestens 23 verschiedene viruskodierte Genprodukte beteiligt sind. Hierzu zählen z.B. die zwei Untereinheiten der DNA-Polymerase, die katalytische Untereinheit (UL54) und der Prozessivitätsfaktor (UL44). Die L-Gene, deren Expression von der viralen DNA-Replikation abhängt, kodieren hauptsächlich für Strukturkomponenten des Viruspartikels aber auch für Regulatoren der Kapsidreifung und der DNA-Verpackung. Die „späten“ Genprodukte tragen somit zur Virionmorphogenese und anschließenden Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle bei (Mocarski et al., 2007).

Wie alle Herpesviren kann hCMV neben dem lytischen Infektionszyklus eine Latenz mit stark eingeschränktem Transkriptionsprofil und ohne Virionenproduktion etablieren (Kondo & Mocarski, 1995; Reeves & Sinclair, 2008). Die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Latenz sowie die Reaktivierung zur lytischen Replikation wird vermutlich über hCMV-Latenz-assoziierte-Transkripte, die unter anderem von der major IE-Promotor (MIEP)-Region kodiert werden, reguliert (Kondo & Mocarski, 1995; Slobedman & Mocarski, 1999). Daneben hat der Differenzierungsgrad der infizierten Zelle einen Einfluss auf die Art der Infektion. Während hCMV beispielsweise in Monozyten, myelomonozytären Vorläuferzellen des Knochenmarks und Endothelzellen offenbar latent verweilen kann, wird etwa in differenzierten Makrophagen der lytische Infektionszyklus ausgelöst (Khaiboullina et al., 2004; Prösch et al., 1999; Söderberg-Nauclér & Nelson, 1999). Der genaue Mechanismus, welcher zur Etablierung einer latenten hCMV-Infektion führt, ist bisher allerdings nicht bekannt.

1.1.3 Antivirale Prävention und Therapie

Die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes gegen hCMV scheiterte bisher (Schleiss, 2008; Steininger, 2007) und für die systemische Therapie stehen nur wenige niedermolekulare Moleküle, wie die Nukleosidanaloga Ganciclovir/Valganciclovir, Acyclovir/Valacyclovir sowie Cidofovir und das Pyrophosphonatanalogon Foscarnet, zur Verfügung (Gandhi & Khanna, 2004). Zur lokalen Therapie der hCMV-Retinitis, die besonders bei AIDS-Patienten

auftritt, findet das antisense-Therapeutikum Fomiviren Anwendung. Die 21 Nukleotide lange antisense-DNA ist spezifisch gegen die mRNA des Hauptaktivators der lytischen Replikation (IE2) gerichtet und wird in den Glaskörper des Auges appliziert. Das Nukleosidanalogen Ganciclovir sowie dessen Esterderivat Valganciclovir, welches eine bessere orale Verfügbarkeit aufweist, wird von der viralen Proteinkinase des UL97-Genproduktes monophosphoryliert, von zellulären Kinasen di- und triphosphoryliert und anschließend von der viralen DNA-Polymerase (UL54-Genprodukt) als Substrat akzeptiert. Es folgt der Abbruch des Polymerisationsvorganges. Die limitierenden Nebenwirkungen von Ganciclovir bzw. Valganciclovir bestehen in einer Myelotoxizität mit Leukopenie und Thrombozytopenie. Der Wirkmechanismus von Acyclovir und dessen Derivat Valacyclovir ist vergleichbar mit dem von Ganciclovir. Allerdings wird Acyclovir als Substrat der viralen DNA-Polymerase weniger gut akzeptiert und hat somit eine deutlich niedrigere Wirksamkeit. Acyclovir wird deshalb hauptsächlich zur prophylaktischen hCMV-Therapie nach Organtransplantationen und kaum bei einer akuten Infektion verwendet. Das Nukleosidanalogen Cidofovir wird ausschließlich von zellulären Kinasen phosphoryliert und so in die aktive Form umgewandelt. Es besitzt eine ausgeprägte irreversible Nephrotoxizität und wird bei Organtransplantierten kaum eingesetzt (Mercorelli et al., 2008). Ein alternatives Medikament ist das Pyrophosphonatanalogon Foscarnet, welches keiner initialen intrazellulären Aktivierung bedarf. Es hemmt die virale DNA-Polymerase nichtkompetitiv durch Blockierung der Phosphatbindungsstelle mit daraus folgender Inhibition der Pyrophosphatabspaltung aus dNTPs. Allerdings ist es nephrotoxisch und kann eine Hypokalcämie auslösen.

Nicht nur die starken Nebenwirkungen der Medikamente und die eher geringe Bioverfügbarkeit, sondern auch Kreuz-Resistenzbildungen aufgrund von Mutationen in der viralen DNA-Polymerase, welche die Angriffsstelle aller zugelassenen, systemisch applizierbaren Medikamente ist, stellen ein zentrales Problem in der hCMV-Therapie dar. Zudem gibt es kein zugelassenes Medikament, mit dem kongenitale hCMV-Infektionen behandelt werden können. Somit besteht ein dringender Bedarf an neuen, alternativen Medikamenten, die nicht nur die DNA-Polymerase, sondern weitere virale oder aber auch provirale zelluläre Genprodukte als Ziel haben (Schreiber et al., 2009).

1.2 RNA-Interferenz in der klinischen Entwicklung

Trotz intensiver Forschungsbemühungen sind die Möglichkeiten zur Behandlung von Viruserkrankungen, wie beispielsweise hCMV, noch immer begrenzt. In der jüngsten Vergangenheit wurden daher große Hoffnungen in die Technologie der RNA-Interferenz (RNAi) gesetzt, die unter Umständen neue Therapieoptionen für verschiedenste Erkrankungen eröffnen könnte.

RNAi ist ein evolutionär hochkonservierter Mechanismus und wurde im Jahr 1998 durch Andrew Fire und Craig Mello (Fire et al., 1998) entdeckt. Sie zeigten, dass lange doppelsträngige RNA (dsRNA), die künstlich in den Fadenwurm *C. elegans* eingebracht wurde, zum Abbau der entsprechenden endogenen mRNA und somit zum Verlust des korrespondierenden Proteins führte. Für diese Entdeckung wurden die beiden Forscher 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin geehrt. Zunächst konnte RNAi nur in niederen Modellorganismen angewandt werden, da lange doppelsträngige RNA-Moleküle in Säugerzellen eine unspezifische Interferon (IFN)-Antwort auslösen (Dallas & Vlassov, 2006). Erst durch die Erkenntnisse der Arbeitsgruppe von Thomas Tuschl wurde es möglich, RNAi auch in höheren Eukaryonten einzusetzen. So konnte gezeigt werden, dass die Expression eines Zielgens mit Hilfe kurzer doppelsträngiger RNA-Moleküle (small interfering RNAs, siRNAs) sequenzspezifisch inhibiert werden kann, ohne dabei die IFN-Antwort zu induzieren (Elbashir et al., 2001).

Bei einer siRNA handelt es sich um einen 19–21 Nukleotide langen RNA-Doppelstrang mit symmetrischen 2–3 Nukleotide langen 3'-Überhängen und 5'-Phosphatgruppen (Bernstein et al., 2001; Zamore et al., 2000). Dieser Duplex besteht aus einem sense- und einem antisense-Strang (siehe Abb. 1.2 A), wobei der antisense-Strang als Matrize für das sequenzspezifische „gene silencing“ durch die RNAi-Maschinerie dient (Rana, 2007). Die siRNAs werden üblicherweise chemisch synthetisiert und anschließend in die Zellen eingebracht, um dort den Abbau einer Ziel-RNA zu bewirken. Die siRNAs wirken nur über einen begrenzten Zeitraum, da aufgrund von Zellteilungen bzw. RNA-Abbau die siRNA-Menge stetig abnimmt. Für eine längerfristige Herunterregulierung werden daher Plasmide verwendet, von denen in der Zelle kontinuierlich eine doppelsträngige short hairpin-RNA (shRNA) transkribiert wird. Diese endogen exprimierten dsRNAs werden in das Zytoplasma exportiert und dort mittels Dicer, einem Enzym, das der RNase III Proteinfamilie angehört, zur siRNA prozessiert (Okamura et al., 2008; Okamura & Lai, 2008). Dicer wirkt zusammen mit dem dsRNA-Bindeprotein HIV-transactivating response RNA-binding protein (TRBP), welches an die thermodynamisch

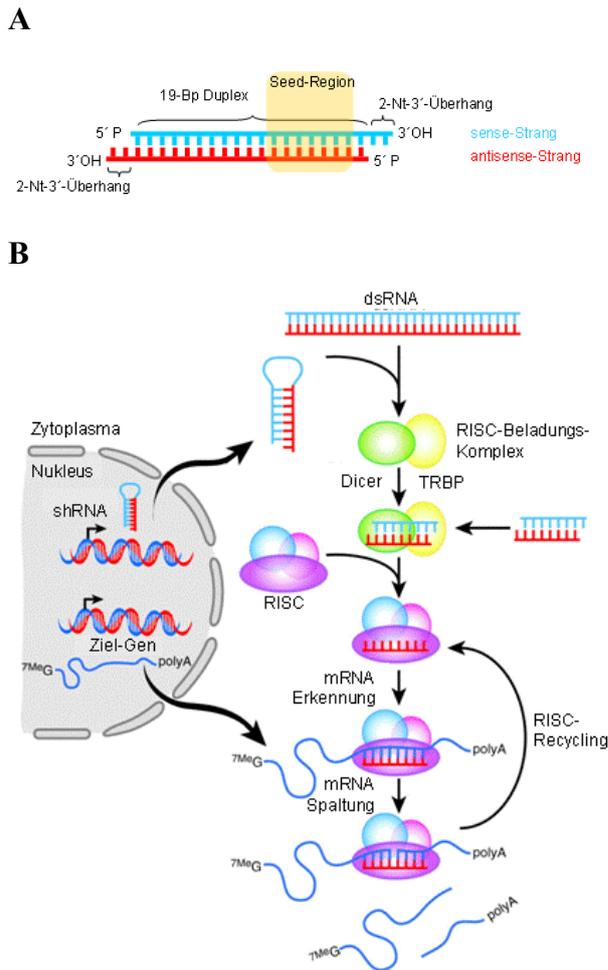


Abb. 1.2 Schematische Darstellung einer siRNA (A) und des RNAi-Mechanismus (B). (A) Die siRNA besteht aus einem sense- und einem antisense-Strang. Bindet die Seed-Region (gelb hinterlegt) an das 3'-UTR von Nicht-Ziel-mRNAs, kann dies zur Translationshemmung führen (off-target-Effekt). Nt, Nukleotid, Bp, Basenpaar

(B) Von Plasmiden transkribierte shRNAs oder längere exogen eingebrachte dsRNAs werden durch das Enzym Dicer zu siRNAs prozessiert. Diese oder exogen applizierte siRNAs werden in der Zelle vom RISC-Beladungs-Komplex (einschließlich TRBP) in den RISC eingebaut. Der RISC-Komplex mit dem perfekt komplementären antisense-Strang bindet an die Ziel-mRNA und induziert deren Spaltung. Der siRNA-RISC-Komplex kann anschließend weitere mRNA-Spaltungen initiieren (Dominska & Dykxhoorn, 2010).

stabileren Enden des RNA-Duplexes bindet. Diese Interaktion bestimmt die spezifische Beladung des RNA-induced silencing complex (RISC) mit dem antisense-Strang. Der sense-Strang des siRNA-Duplexes wird verworfen und abgebaut, während der im RISC gebundene antisense-Strang an die komplementäre Sequenz in der Ziel-mRNA bindet und deren Spaltung in der Mitte der Zielsequenz induziert. Dies wird durch das Argonaut 2 (Ago2)-Protein vermittelt, welches die katalytische Einheit des RISC bildet (Chendrimada et al., 2005; Gregory et al., 2005; Leuschner et al., 2006; Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005; Tomari et al., 2004). Die gespaltene mRNA wird schließlich durch Nukleasen abgebaut und steht folglich nicht mehr für die Translationsmaschinerie zur Verfügung. Der aktivierte siRNA-RISC-Komplex wirkt katalytisch, da er mehrere Runden der mRNA-Spaltung durchlaufen kann (siehe 1.2 B).

Die Entwicklung neuartiger, auf siRNAs beruhender Medikamente begann kurz nachdem Tuschl und Kollegen im Jahre 2001 die prinzipielle Durchführbarkeit von RNAi in humanen Zellen demonstriert hatten. Bereits 2003 wurde eine erste Studie publiziert, in der es gelang durch Injektion

von siRNAs in die Blutbahn der Maus die Expression eines leberspezifischen Gens auszuschalten (Dykxhoorn & Lieberman, 2006). Mittlerweile wird die RNAi-Technologie als Therapieansatz bei Erkrankungen des Menschen, wie beispielsweise der altersbedingten Degeneration der Macula und zahlreichen Viruserkrankungen, in verschiedensten klinischen Studien getestet (siehe Tabelle 1.1) (Tiemann & Rossi, 2009).

Tabelle 1.1 Entwicklung RNAi-basierter Therapien

Erkrankung	Status	RNAi-Reagenz	Firma
Altersbedingte Degeneration der Macula	Phase III	siRNA	Acuity Pharmaceuticals
	Phase II	siRNA	Opko
	Phase II	siRNA	Merck-Sirna Therapeutics
	Phase I	siRNA	Quark Pharmaceuticals
Respiratorisches Syncytial Virus	Phase II	siRNA	Alnylam Pharmaceuticals
Pachyonychia congenita	Phase I	siRNA	Trans Derm Inc.
Solide Tumoren	Phase I	siRNA	Calando
Hepatitis C Virus	Phase I	LNA-anti miRNA	Santaris
Akutes Nierenversagen	Phase I	siRNA	Quark Pharmaceuticals
Metastatisches Melanom	Phase I	siRNA	Duke University
AIDS Lymphom	prä-klinisch	shRNA	City of Hope National Medical Center

LNA = locked nucleic acid

Untersuchungen verschiedener Gruppen machten jedoch deutlich, dass die siRNA-vermittelte Herunterregulierung weniger spezifisch ist als zunächst angenommen. So wurde beobachtet, dass siRNAs teilweise auch die Expressionsprofile von Nicht-Ziel-mRNAs beeinflussen können (Jackson et al., 2003; Persengiev et al., 2004; Saxena et al., 2003; Scacheri et al., 2004; Sledz et al., 2003). Dieses Phänomen wird als sogenannter off-target-Effekt bezeichnet und ist auf verschiedene Ursachen zurückzuführen, wie zum Beispiel die Inkorporation des sense-Strangs in den RISC, die unspezifische Aktivierung des IFN-Systems oder die ungewollte Beteiligung des siRNA-Signalwegs am microRNA (miRNA)-Signalweg (Birmingham et al., 2006; Jackson et al., 2006) (siehe Abb. 1.3). Hier erfolgt, im Gegensatz zum siRNA-Signalweg, kein mRNA-Abbau, sondern eine Translationshemmung aufgrund unvollständiger Basenpaarung zwischen antisense-Strang und mRNA (Bagga et al., 2005; He & Hannon, 2004; Kim, 2005; Lai, 2002; Stark et al., 2003; Yekta et al., 2004). Die Spezifität dieses Mechanismus wird durch eine 6–7 Nukleotide lange Seed-Region am 5'-Ende des antisense-Strangs der miRNA bestimmt (siehe Abb. 1.2 A).

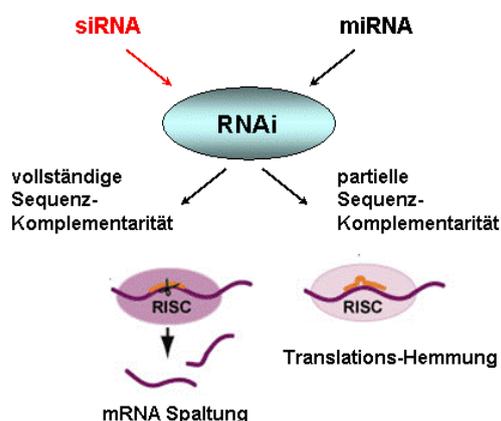


Abb. 1.3 Kleine RNA-Moleküle (miRNA und siRNA) können die mRNA-Translation durch RNAi regulieren. Abhängig von Sequenz-Komplementaritäten zwischen dem kleinen RNA-Molekül und der mRNA wird die mRNA entweder abgebaut (vollständige Komplementarität) oder translationell gehemmt (partielle Komplementarität). Off-target-Effekte können unter anderem durch partielle Sequenz-Komplementarität der siRNA mit Nicht-Ziel-mRNAs entstehen (Thermo Scientific, 2008).

Neben den oben beschriebenen unspezifischen off-target-Effekten sieht sich die RNAi-Technologie mit weiteren Problemen konfrontiert. Diese betreffen vor allem die Anfälligkeit der siRNAs gegenüber Nukleaseabbau, was zu einer sehr kurzen Halbwertszeit führt, sowie die zelluläre Aufnahme und die Pharmakokinetik, welche die zentralen Herausforderungen der RNAi-Technologie bei Anwendungen im Organismus darstellen. Mit Hilfe chemischer Modifikationen, die Einfluss auf Stabilität, Spezifität, Wirksamkeit und zelluläre Aufnahme der siRNAs nehmen, können diese Probleme adressiert werden. Es sind zahlreiche chemische Modifikationen beschrieben, die an den Basen, den Zuckereinheiten oder den Phosphodiesterbindungen der siRNA eingeführt werden können (siehe Abb. 1.4). Wichtig ist, dass das 5'-Ende des antisense-Strangs eine freie Hydroxyl- oder Phosphatgruppe behält, während das 3'-Ende des sense- und des antisense-Strangs modifiziert werden kann. Um beispielsweise die zelluläre Aufnahme der siRNA bei Anwendungen im Organismus zu verbessern, kann an das 3'- oder das 5'-Ende des sense-Strangs eine Cholesterineinheit angefügt werden. Es wurde unter anderem bereits gezeigt, dass eine Cholesterin-konjugierte anti-Apolipoprotein B

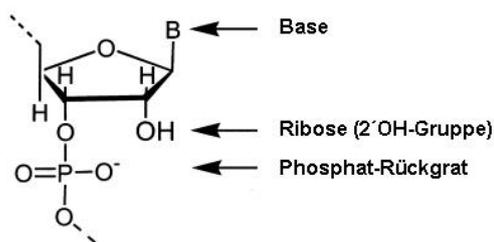


Abb. 1.4 Möglichkeiten zum Einführen chemischer Modifikationen in eine siRNA.

(Apo B) siRNA im Nagermodell erfolgreich in die Leber und andere Organe transportiert wurde (Soutschek et al., 2004; Zimmermann et al., 2006). Als allgemeine Faustregel gilt, dass die meisten Modifikationen im sense-Strang die Funktionalität der siRNA nicht negativ beeinflussen, solange die A-Form-Duplexstruktur erhalten bleibt. Modifikationen, die im funktionellen antisense-Strang eingeführt werden, können falsch platziert jedoch zu einer verminderten Wirksamkeit führen (Rana, 2007). Obwohl sicherlich noch einige Jahre an Forschungsarbeit bis zum Einsatz der RNAi-Technologie zur Therapie humaner Erkrankungen nötig sind, stellen siRNAs als Vermittler der RNAi dennoch eine vielversprechende neuartige Substanzklasse zur Bekämpfung verschiedenster Krankheiten dar.

1.3 Das IE1-72kDa-Protein

Das einzige zugelassene antisense-Medikament Fomiviren zeigt, dass der antisense-Mechanismus, der ähnlich zum RNAi-Mechanismus bereits die Herstellung des Proteins verhindert, sich als antivirale Strategie gegen hCMV eignet. Durch spezifische Inhibition der IE2-Expression kann der virale lytische Replikationszyklus nicht aktiviert werden.

Neben IE2 ist auch das IE1-Protein ein viraler Schlüsselregulator, der Proteine und übergeordnete Strukturen des infizierten Wirtszellkerns in vielfältiger Weise manipuliert. Damit stellt IE1 eine vielversprechende neue Zielstruktur für die antivirale Prävention oder Therapie dar. Die beiden nukleären Phosphoproteine IE1 und IE2 entstehen ausgehend von einem differentiell gespleißten Primärtranskript, das unter der Kontrolle des MIEP steht (Mocarski et al., 2007). Sie teilen sich 85 Aminosäuren im aminoterminalen Bereich, kodiert durch Exon 2 und 3, besitzen aber getrennte carboxyterminale Abschnitte, kodiert durch Exon 4 (IE1) bzw. Exon 5 (IE2).

Allgemein sind IE1 und IE2 als promiskuitive transkriptionelle Regulatoren bekannt und von entscheidender Bedeutung für eine effiziente Virusvermehrung. IE2 ist dabei, wie oben schon erwähnt, der wichtigste Aktivator des lytischen Infektionszyklus von hCMV und ist essentiell für eine produktive Virusreplikation (Marchini et al., 2001). Verglichen mit IE2 ist die Rolle von IE1 für die hCMV-Infektion weniger eindeutig, weshalb die funktionelle Charakterisierung des Proteins von grundlegendem Interesse ist. IE1 ist das erste neusynthetisierte nachweisbare virale Protein und akkumuliert in großen Mengen im Kern der Wirtszelle. Virusmutanten mit spezifischen Deletionen in der IE1-Sequenz weisen unter hohen Infektionsmultiplizitäten (multiplicities of infection, MOI) eine effiziente Replikation auf. Unter niedrigen MOI geht das Fehlen von IE1 jedoch mit einer partiellen Expressionsblockade viraler E-Gene einher, die zu einem attenuierten Viruswachstum führt (Gawn & Greaves, 2002; Greaves & Mocarski, 1998; Mocarski et al., 1996). Es wird daher angenommen, dass IE1 seine Schlüsselfunktion in der frühen Phase der hCMV-Infektion ausübt und maßgeblich am Erfolg der produktiven Infektion beteiligt ist.

Übereinstimmend mit der Rolle als allgemeiner Transaktivator kann IE1 neben viralen Genen auch zahlreiche zelluläre Gene aktivieren (Mocarski et al., 2007). Zur Ausführung dieser Funktion sind vermutlich auch Interaktionen mit zellulären Proteinen nötig. So wurde IE1 als Interaktionspartner verschiedenster transkriptioneller Kofaktoren sowie der Histondeacetylase (HDAC) 3 beschrieben. Des Weiteren interagiert IE1 unter anderem mit Chromatin, dem Promyelozytischen Leukämie (PML)-Protein und Proteinen der signal transducer and activator of transcription (STAT)-Familie (STAT1, 2, 3) (Krauss et al., 2009; Krauss, unveröffentlichte Beobachtungen; Paulus et al., 2006). Neben den transaktivierenden Eigenschaften wird dem viralen Protein auch antiapoptotisches, mutagenes, mitogenes und onkogenes Potential zugeschrieben (Castillo & Kowalik, 2002; Shen et al., 1997; Zhu et al., 1995).

1.3.1 Interaktion von IE1 mit ND10-Kompartimenten

Das PML-Protein ist zentraler Bestandteil subnukleärer, interchromatinischer Strukturen, den sogenannten PML-Körpern oder ND10 (nukleäre Domäne 10). Hierbei handelt es sich um Multiproteinkomplexe, die eine Größe von 0,2-1 µm haben und mit ca. 10-30 Komplexen pro Zellkern in nahezu allen Zelltypen vorkommen (Tavalai & Stamminger, 2008). Neben PML sind weitere Proteine bekannt, die permanent in den ND10-Kompartimenten vorhanden sind, wie beispielsweise das humane Todes-Domänen assoziierte Protein (hDaxx), das Sp100 nukleäre Antigen (Sp100), der small ubiquitin-like Modifier 1 (SUMO-1) und das Bloom-Syndrom Protein (BLM). Des Weiteren können Proteine wie das Retinoblastom-Protein (pRB), der Tumorsuppressor p53 (p53) und das CREB-Bindeprotein (CBP) transient rekrutiert werden (Alcalay et al., 1998; Ishov et al., 1999; LaMorte et al., 1998; Müller et al., 1998; Seeler et al., 1998; Zhong et al., 2000a, 2000b). Die meisten dieser Proteine sind an der Regulation der Transkription beteiligt. Aktuelle Vorstellungen zufolge stellen die ND10-Kompartimente eine Art Depot dar, welches durch Rekrutierung, Modifikation und Freisetzung die Aktivität von Transkriptionsfaktoren sowie Kofaktoren für die Transkription reguliert (Zhong et al., 2000b). Dies könnte auch die Beteiligung der ND10 an zahlreichen zellulären Prozessen wie z.B. der DNA-Schadensantwort, der Stressantwort, der Apoptose und der IFN-Antwort erklären (Bernardi & Pandolfi, 2003; Dellaire & Bazett-Jones, 2004; Everett & Chelbi-Alix, 2007; Maul et al., 1995; Regad & Chelbi-Alix, 2001; Tavalai et al., 2008). Eine fehlerhafte Ausbildung von ND10 kann zur Entstehung von Krebs und einer verstärkten Anfälligkeit gegenüber viralen Krankheitserregern führen.

Ein generelles Merkmal von DNA-Viren, die im Zellkern replizieren (hCMV eingeschlossen), ist die enge Assoziation der Inputgenome und der Transkriptionsinitiation mit den ND10. Bisher ist noch nicht abschließend geklärt, ob diese Viren ND10 für ihre eigene Replikation benötigen oder ob ND10 antiviral aktiv sind (Ishov et al., 1997; Sourvinos & Everett, 2002). In Bezug auf hCMV und andere Herpesviren sind diese Strukturen eher als antiviral zu bewerten. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass einzelne Komponenten von ND10 wie PML, Sp100 und hDaxx als Repressoren der viralen Transkription fungieren (Everett et al., 2009; Maul et al., 1995; Saffert & Kalejta, 2008; Tavalai et al., 2008; Tavalai & Stamminger, 2008). Das typischerweise im Kern der Wirtszelle lokalisierte IE1-Protein hat die bemerkenswerte Eigenschaft, über PML mit den ND10-Strukturen zu interagieren und deren vollständige Auflösung zu frühen Zeitpunkten nach Infektion oder auch nach ektopischer Expression zu initiieren (Ahn & Hayward, 1997; Castillo & Kowalik, 2002; Kelly et al., 1995; Koriath et al., 1996; Nevels et al., 2004; Wilkinson et al., 1998). Die Relevanz dieser Funktion zeigt sich

durch die effiziente Kompensation des Replikationsdefekts einer IE1-defizienten Virusmutante infolge eines siRNA-vermittelten PML-Knockdowns (Tavalai et al., 2006). Und nicht zuletzt sind zahlreiche weitere Viren, darunter das Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV-1) und das Epstein-Barr-Virus (EBV), in der Lage, die PML-Körper im Zuge der lytischen Infektion aufzulösen. Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass ND10-assoziierte Proteine Teil eines zellulären antiviralen Abwehrmechanismus sind, welcher durch viruskodierte Proteine wie IE1 inaktiviert wird (Tavalai et al., 2008).

1.3.2 Interaktion von IE1 mit Proteinen der STAT-Familie

1.3.2.1 Signalweiterleitung durch STAT-Proteine

Die STAT-Proteine bilden eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die für die Signaltransduktion von über 50 Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren von zentraler Bedeutung sind (Mertens & Darnell, 2007; Schindler & Plumlee, 2008). In Säugetierzellen besteht die Familie der STAT-Proteine aus sieben Mitgliedern (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b und 6), die sowohl strukturell als auch funktionell verwandt sind. Sie spielen eine wichtige Rolle bei verschiedensten zellulären Prozessen wie der Embryonalentwicklung, der Organogenese, der Regulation von Zellwachstum und Apoptose sowie bei der angeborenen und erworbenen Immunität (Levy & Darnell, 2002).

Die Signaltransduktion über den Jak-STAT-Signalweg beginnt mit der Bindung des Botenstoffs an den Rezeptor, was eine Dimerisierung der membranständigen Rezeptoren zur Folge hat. Durch die Ligandenbindung kommt es außerdem zur Aktivierung der permanent Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen (Jak). Zu ihnen gehören Jak1-3 sowie die Tyrosinkinase 2 (Tyk2) (van Boxel-Dezaire et al., 2006). Infolgedessen kommt es zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten zytoplasmatischer Rezeptorbereiche, die in dieser Form als Rekrutierungsstellen für bestimmte Proteine mit src homology 2 (SH2)-Domänen agieren können. Dazu gehören auch die STAT-Proteine, die infolge ihrer Rezeptorassoziation ebenfalls phosphoryliert werden. In ihrem aktivierten Zustand dissoziieren die STAT-Proteine von der zytoplasmatischen Rezeptoruntereinheit und translozieren als Hetero- oder Homodimere in den Zellkern. Dort binden sie an definierte cis-regulatorische Elemente in den Promotorbereichen der Zielgene (Bonjardim et al., 2009; Der et al., 1998).

Typ I IFN, deren Hauptvertreter IFN- α und - β sind, können von allen kernhaltigen Zellen als Antwort auf eine Virusinfektion produziert werden und induzieren hauptsächlich einen Komplex aus STAT1, STAT2 und IRF9 (IFN regulatory factor 9), den heterotrimeren IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3), der nach Translokation in den Zellkern ISRE (IFN-

stimulated response element)-Sequenzen in Promotoren binden kann und dadurch die Transkription der entsprechenden Zielgene aktiviert (van Boxel-Dezaire et al., 2006; Schindler & Plumlee, 2008). Viele dieser Gene kodieren für antivirale Genprodukte.

Das Immun-IFN IFN- γ , als einziger Vertreter der **Typ II IFN**, wird vor allem von T-Lymphocyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produziert und führt hauptsächlich zur Ausbildung von STAT1-Homodimeren. Nach Translokation in den Zellkern binden diese an IFN- γ -activated sites (GAS) und initiieren dadurch die Expression von Zielgenen (Schroder et al., 2004) (siehe Abb. 1.5).

Beide IFN-Typen können zusätzlich auch zur Aktivierung alternativer STAT-Komplexe beitragen. So konnte beispielsweise die Beteiligung von STAT1-STAT2- und STAT1-STAT3-Heterodimeren an der IFN- γ -Antwort festgestellt werden, wenngleich die Ausbildung dieser Komplexe weniger stark ausgeprägt ist als die Bildung von STAT1-Homodimeren (Bromberg & Darnell, 2000; Kalvakolanu, 2003; Wesoly et al., 2007). Die biologische Wirkung von IFN- γ scheint, im Gegensatz zu den Typ I IFN, die hauptsächlich antiviral wirken, vor allem immunmodulatorisch zu sein. IFN- γ induziert beispielsweise die Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen (Farrar & Schreiber, 1993; Perussia et al., 1983), vermittelt die Differenzierung von T-Helferzellen (Th1-Immunantwort) sowie das Anlocken von Immunzellen und kann antiproliferativ und proapoptotisch wirken (Schroder et al., 2004). Somit fungiert IFN- γ als eine Art Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunantwort (Indraccolo et al., 2007).

Die **Interleukin (IL)-6** Signaltransduktion wird durch IL-6-Typ-Zytokine wie IL-6, IL-11, IL-27, den Leukämie inhibitorischen Faktor (LIF) und Oncostatin M (OSM) induziert. Diese Zytokine entfalten ihre Wirkung durch Bindung an spezifische Zelloberflächen-Rezeptoren auf ihren Zielzellen. Gemeinsamer Bestandteil aller Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ-Zytokine ist das Glykoprotein (gp) 130. Dadurch ergibt sich zum Teil eine Überschneidung der biologischen Wirkung der verschiedenen IL-6-Familienmitglieder. Unterschiede werden durch die zusätzliche Rekrutierung Zytokin-spezifischer Rezeptorketten vermittelt (Hirano et al., 1997), deren Wirkung sowohl pro- als auch antiinflammatorisch sein kann. Sie sind unter anderem an der Akutphase-Reaktion des Körpers, an der Hämatopoese, der Differenzierung und dem Wachstum von B- und T-Zellen sowie an der neuronalen Differenzierung beteiligt (Grivennikov et al., 2009; Hirano et al., 2000). Durch Ligandenbindung und darauffolgende Phosphorylierungsreaktionen wird STAT3 aktiviert, welches infolgedessen hauptsächlich Homodimere, seltener aber auch Heterodimere mit STAT1 ausbildet, die in den Zellkern

translozieren, um dort an enhancer-Elemente verschiedener Zielgene zu binden (Horvath, 2004) (siehe Abb. 1.5).

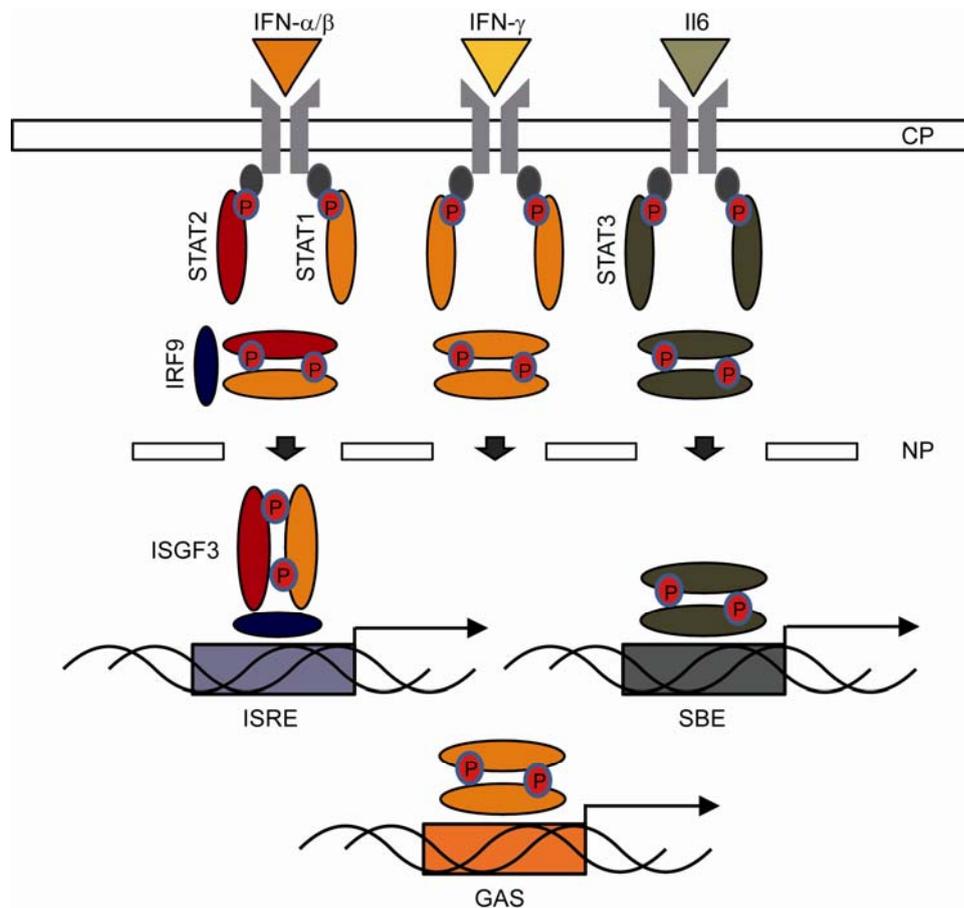


Abb. 1.5 Vereinfachte schematische Darstellung der Signalweiterleitung durch STAT-Proteine. Die Bindung von IFN- α/β , IFN- γ bzw. IL-6 induziert die Oligomerisierung der Rezeptoren und führt zu einer Aktivierung der kovalent gebundenen Kinasen der Jak-Familie (kleine, graue Ovale). Die aktivierten Kinasen phosphorylieren zunächst die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors. Über ihre SH2-Domäne binden die STAT-Proteine an phosphorylierte Tyrosine der Rezeptoren und werden ebenfalls Jak-vermittelt Tyrosinphosphoryliert. Daraufhin homo- oder heterodimerisieren die STAT-Proteine (STAT1-STAT2-Komplexe können dabei zusätzlich mit IRF9 interagieren) und binden im Kern an spezifische Sequenzelemente in den Promoterregionen ihrer Zielgene. GAS, IFN- γ -activated site, IRF9, IFN regulatory factor 9, ISGF3, IFN-stimulated gene factor 3, ISRE, IFN-stimulated response element, SBE, STAT-binding element, ZP = Zytoplasma, NP = Nukleoplasma

Neben dem klassischen Modell der Jak-STAT-Signaltransduktion gibt es zudem Hinweise, die auf alternative Mechanismen der STAT-Signalweiterleitung hindeuten. So ist beispielsweise bekannt, dass STAT-Proteine nicht nur im aktiven (phosphorylierten) Zustand dimerisieren (Mao & Chen, 2005). Vielmehr scheinen STAT-Proteine auch im inaktiven Zustand als Homo- oder Heterodimere im Zytoplasma vorzuliegen (Braunstein et al., 2003; Novak et al., 1998). Diese Erkenntnisse führten zu neuen Denkansätzen, welche von einer Phosphorylierungs-unabhängigen Dimerisierung der STAT-Proteine ausgehen. Demzufolge

wird angenommen, dass im Zuge der Phosphorylierung eine Konformationsänderung auftritt, welche inaktive antiparallele STAT-Dimere in die aktive parallele Form versetzt (Mertens et al., 2006; Wenta et al., 2008; Zhong et al., 2005). Die Jak-STAT-vermittelte Aktivierung von Genen ist darüber hinaus abhängig von einem kontinuierlichen Kreislauf der Signalproteine zwischen Kern und Zytoplasma. Inaktive STAT-Proteine pendeln durch Karyopherin-unabhängige (Import) und Exportin 1 (CRM1)-abhängige (Export) Mechanismen ständig zwischen Zytoplasma und Zellkern. Infolge eines Zytokinstimulus werden die aktivierten STAT-Komplexe hingegen Karyopherin-abhängig in den Zellkern transportiert und dort bis zu ihrer Inaktivierung (Dephosphorylierung) zurückgehalten (Meyer & Vinkemeier, 2007; Reich & Liu, 2006; Sehgal, 2008).

Neben der Tyrosinphosphorylierung sind weitere posttranslationale Modifikationen einzelner STAT-Proteine berichtet worden. So wird bei fast allen STAT-Proteinen (STAT 1, 3, 4, 5A, 5B) zusätzlich ein carboxyterminaler Serinrest phosphoryliert, der für die optimale Induktion der Zielgene wichtig ist (Decker & Kovarik, 2000). Ebenso spielt die Acetylierung der STAT-Proteine eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsaktivierung (Shankaranarayanan et al., 2001; Wang et al., 2005; Yuan et al., 2005). Einige Studien beschreiben eine SUMOylierung von STAT1 (Ungureanu et al., 2005; Vanhatupa et al., 2008). Des Weiteren sind Ubiquitylierungen, ISGylierungen sowie Arginin-Methylierungen beschrieben. Die ISGylierung wird analog zur Ubiquitylierung oder SUMOylierung durch kovalente Bindung eines kleinen Ubiquitin-ähnlichen 15 kDa Proteins vermittelt. Die genauen Rollen dieser Modifikationen sind noch nicht abschließend geklärt (Lim & Cao, 2006), doch erhalten die betreffenden STAT-Proteine dadurch möglicherweise ein erweitertes Wirkungsspektrum.

1.3.2.2 IE1-vermittelte IFN-Resistenz von hCMV durch Interaktion mit STAT2

Durch Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte bislang gezeigt werden, dass IE1 mit STAT1, STAT2 und STAT3 interagieren kann (Krauss, unveröffentlichte Beobachtungen; Paulus et al., 2006). Durch die direkte Interaktion des viralen Proteins mit STAT2 ist IE1 in der Lage, neben intrinsischen zellulären Abwehrmechanismen, die in Zusammenhang mit ND10 stehen, einen entscheidenden weiteren Zweig der angeborenen Immunantwort zu blockieren. Die Interaktion verhindert die DNA-Bindung des ISGF3-Komplexes und damit die Induktion Typ I IFN-aktivierter antiviraler Gene. Somit verleiht IE1 dem Virus eine weitgehende Resistenz gegenüber Typ I IFN. Höchstwahrscheinlich wird dies durch Sequestrierung von STAT2 in nukleäre Kompartimente (wie z.B. ND10) und Auflösung der ISGF3-Komplexe erreicht (Huh et al., 2008; Krauss et al., 2009; Krauss, unveröffentlichte

Beobachtungen; Paulus et al., 2006). Es wird postuliert, dass die Interaktion mit STAT2 neben der Auflösung der ND10-Kompartimente eine von mindestens zwei verschiedenen Mechanismen des IE1-Proteins darstellt, mit denen es die antivirale IFN-Antwort zugunsten der viralen Replikation unterdrückt. Die Bedeutung der Interaktion von IE1 mit STAT1 und STAT3 wurde dagegen bisher noch nicht ausführlich untersucht.

1.4 Zielsetzung

Die Behandlung von hCMV-bedingten Erkrankungen bei Kindern im Mutterleib und immunsupprimierten Patienten stellt immer noch ein großes medizinisches Problem dar. Die derzeitige systemische Therapie mit verschiedenen Virostatika, welche alle gegen die virale DNA-Polymerase gerichtet sind, kann die Virusvermehrung zwar in der Regel kontrollieren, doch ist der Einsatz aufgrund von starken Nebenwirkungen, einer eher geringen Bioverfügbarkeit sowie von Resistenzbildungen limitiert. Die RNAi-Technologie wird in den letzten Jahren zunehmend als innovative Möglichkeit zur Bekämpfung verschiedenster Krankheiten angesehen. Somit bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, das Potential der RNAi-Technologie als neues Therapiekonzept gegen hCMV zu untersuchen. Damit verbunden sollten antivirale siRNAs mit Hilfe eines geeigneten Screening-Verfahrens identifiziert und im Hinblick auf eine therapeutische Nutzung optimiert werden. Des Weiteren sollten Zielstrukturen, welche sich als vielversprechend erwiesen, hinsichtlich einer Wechselwirkung mit zellulären Genprodukten näher charakterisiert werden. Dementsprechend sollte im zweiten Teil der Arbeit eine umfassende Analyse zum Einfluss des hCMV-kodierten IE1-Proteins auf die Regulation des humanen Transkriptoms durchgeführt werden. Weiterführende Untersuchungen sollten vor allem zur Aufklärung der mechanistischen Grundlagen der IE1-Funktion beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zum immunologischen Nachweis von Proteinen im Western Blot (WB, siehe 2.7.3) bzw. Immunfluoreszenz (IF, siehe 2.7.4)-Verfahren und für Chromatinimmunpräzipitationen (ChIP, siehe 2.7.6) verwendet.

Tabelle 2.1 Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Quelle	Eingesetzte Verdünnungen/Mengen	Nr.*
rb-anti-GAPDH	Abcam, ab9485	1:2000 (WB)	77
rb-anti-H2A	Abcam, ab13923	1:250 (WB)	128
rb-anti-IRF1 (C-20)	Santa Cruz, sc-497	1:300 (WB)	148
rb-anti-NFκB	Santa Cruz, sc-372 X	1:200 (IF), 1:1000 (WB)	192
m-anti-PML (5E10)	Stuurman et al., 1992	1:100 (WB)	158
m-anti-STAT1 (C-136)	Santa Cruz, sc-464	1:500 (WB)	130
rb-anti-STAT1 (E-23)	Santa Cruz, sc-346 X	1:500 (IF), 1:2000 (WB), 10 μg (ChIP)	132
rb-anti-STAT1 alpha (C-24)	Santa Cruz, sc-345 X	10 μg (ChIP)	131
rb-anti-STAT2 (H-190)	Santa Cruz, sc-22816	1:200 (IF), 1:1000 (WB)	137
rb-anti-STAT2 (C-20)	Santa Cruz, sc-476 X	10 μg (ChIP)	138
rb-anti-STAT2 (N-17)	Santa Cruz, sc-839 X	10 μg (ChIP)	139
rb-anti-STAT3 (C-20)	Santa Cruz, sc-482 X	1:200 (IF), 1:1000 (WB)	141
m-anti-α-Tubulin	Invitrogen, A11126	1:2000 (WB)	167
m-anti-IE1 (1B12)	Zhu et al., 1995	1:10 (WB)	29
m-anti-IE2 (3A9)	T. Shenk, Princeton	1:10 (WB)	32
m-anti-pp28 (10B4-29)	Silva et al., 2003	1:10 (WB)	71
m-anti-pp65 (8F5)	T. Shenk, Princeton	1:100 (WB)	72
m-anti-TRIS1(9A1)	Adamo et al., 2004	1:100 (WB)	73
m-anti-ppUL44 (10D8)	GeneTex, GTX 26501	1:2000 (WB)	86
gt-anti-mIgG +HRP	Dianova, 115-036-003	1:10000-1:50000 (WB)	202
gt-anti-rbIgG +HRP	Millipore, AP156P	1:10000-1:50000 (WB)	203
gt-anti-mIgG +Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11001	1:1000 (IF)	204
gt-anti-mIgG +Alexa Fluor 594	Invitrogen, A11032	1:1000 (IF)	205
gt-anti-rbIgG +Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11008	1:1000 (IF)	206
gt-anti-rbIgG +Alexa Fluor 594	Invitrogen, A11037	1:1000 (IF)	207
IgG aus rb-Serum	Sigma, I5006	10 μg (ChIP)	-

Hellgraue Schattierung: Antikörper gegen zelluläre Proteine, mittelgraue Schattierung: Antikörper gegen virale Proteine, dunkelgraue Schattierung: Sekundärantikörper, Speziesbezeichnungen: gt = Ziege, m = Maus, rb = Kaninchen, IgG = Immunglobulin G, * Nummer in der Antikörper-Datenbank der Arbeitsgruppe

2.2 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion und Biomers synthetisiert und durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gereinigt. Sie kamen bei der Herstellung rekombinanter Plasmide (siehe 2.6.2), des pTNLuc-BACmids (siehe 2.6.3) sowie in der quantitativen Echtzeit-PCR (q-PCR) (siehe 2.6.4) zum Einsatz.

Tabelle 2.2 Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz 5'→3'	Kurze Beschreibung	Nr.*
Luc	fw	TTGCA <u>AGATCT</u> ATGGAAGACG CCAAAAAC	Amplifizierung der Luciferase-cDNA	420
	rv	TTGCAGT <u>CGACTT</u> ACACGGCG ATCTTTCC		421
Luc-UL21,5	fw	GGCACACAGCCAGACGCGTTC GTCAGCAGCGACGCCGACAAG ACCTCAGCATGGAAGACGCCA AAAACAT	Amplifizierung der Luciferase-cDNA mit UL21,5-homologen Enden	423
	rv	TAATAAAAAACAAGATAGTCA ACATGGTCTTTAACCCCTGGGA TCTGCTGCGTCGTGGAATGCCT TCGAA		424
Kan-FRT	fw	TTAGGCAAGCTTAAGGTGCA	Sequenzierung des Plasmids #636	425
	rv	TGTCGTCGTCGTCCTTGTA		426
IE1	fw	TTGCA <u>AGCTT</u> ATGGAGTCCTC TGCCAAGAGAAAG	Amplifizierung der IE1-cDNA	483
	rv	TTGCAG <u>AATTCTT</u> ACTGGTCAG CCTTGCTTCTAG		484

fw = vorwärts, rv = rückwärts, unterstrichen sind vorhandene Restriktionsschnittstellen, * Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

Tabelle 2.3 Verwendete Oligonukleotide und Bedingungen für die q-PCR

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz 5'→3'	Temp. (°C) [†]	Zeit (s) [*]	Produkt- größe (Bp)	PCR- Effizienz	Nr.*
CXCL9	fw	GAGTGCAAGGAACCCAGTAGT	66-56	8	72	1,87	531
	rv	GGTGGATAGTCCCTTGTTGGT					532
CXCL9_P	fw	TGTGCCAAAGGCTATCAGTG	66-56	10	120	1,9 [#]	618
	rv	CTGGGGGAAACCCTAGTCTC					619
CXCL10	fw	TCCACGTGTTGAGATCATTGC	66-56	8	80	1,95	533
	rv	TCTTGATGGCCTTCGATTCTG					534
CXCL11	fw	CAAGGCTTCCCCATGTTCA	66-56	8	71	1,88	535
	rv	CCCAGGGCGTATGCAAAGA					536
GAPDH	fw	TCGACAGTCAGCCGCATCT	66-56	8	69	1,9 [#]	492
	rv	CTAGCCTCCCGGGTTTCTCT					493
GBP4	fw	GCTCCAAGCAGTCCTTTCAC	66-56	12	197	1,95	537
	rv	GTGGTGGCTCATGCCTAAAT					538
GBP4_P	fw	GGTGAAGAGGGACAAACAA	66-56	10	187	1,9 [#]	547
	rv	CCAGCCGGATTACAGACAT					548
IFIT2_P	fw	GGAGGAAAAAGAGTCCTCTA	63	10	172	1,9 [#]	103
	rv	AGCTGCACTCTTCAGAAA					104
IFN-γ	fw	TCCCATGGGTTGTGTGTTA	66-56	12	198	1,9 [#]	529
	rv	AAGCACCAGGCATGAAATCT					530
IL-6	fw	TACCCCCAGGAGAAGATTCC	66-56	10	175	1,9 [#]	600
	rv	TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT					601
IRF1	fw	ATTCCCTGTGCACCGTAG	66-56	8	81	1,9 [#]	117
	rv	CCATATCCACCATGATGC					118
OAS1_P	fw	TTGGCTGGAGGTTAAAATGC	66-56	12	213	1,9 [#]	614
	rv	AGCTTGGACTGCTGTTGGTT					615
PML	fw	AGCTTGGACTGCTGTTGGTT	66-56	8	80	1,9 [#]	111
	rv	ATGGTGGCTTGAATCTCAG					112
RPL30	fw	CAAGGCAAAGCGAAATTGGT	66-56	8	73	1,9 [#]	494
	rv	GCCCGTTCAGTCTCTTCGATT					495

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz 5'→3'	Temp. (°C) [†]	Zeit (s) [‡]	Produktgröße (Bp)	PCR-Effizienz	Nr.*
STAT1	fw	TTCAGGAAGACCCAATCCAG	66-56	8	112	1,88	596
	rv	TGAATATTCCCCGACTGAGC					597
STAT2	fw	CTGGACAATCTCACACCTTAC	66-56	8	70	1,9 [#]	457
	rv	GAACATCTTGGAGCAATGTC					458
STAT2_2	fw	GGGCTATGATGGAGAAGCTG	66-56	8	104	1,9 [#]	631
	rv	AGAGGGTGTCTTCCCTTTGG					632
STAT3	fw	AGTGAGTAAGGCTGGGCAGA	66-56	8	100	1,9 [#]	598
	rv	AAGGCACCCACAGAAACAAC					599
TAP1	fw	GCAGCTCATGGAGAAAAAGG	66-56	8	74	1,9 [#]	619
	rv	AAGGCTTTCATTCTGGAGCA					617
TAP1_P	fw	GCAGGCCACTTTTGGGAAGTA	66-56	10	119	1,9 [#]	612
	rv	GGAAAGTCCCAGGAACAGG					613
Tubulin	fw	TATCAGCAGTACCAGGATGC	66-56	8	102	1,92	363
	rv	TGAGAAGCCTGAGGTGATG					364
TRS1/IRS1	fw	GGTAGCGGCAACAATAGC	60	8	65	1,9 [#]	477
	rv	TCCACCGGAATCTGAGAC					478
UL44	fw	CTTCAACGACGCGAAAGAG	60	8	70	1,9 [#]	469
	rv	CTTGGTGTTAGGGACGAACTC					470
UL54_P	fw	CACCAAAGACACGTCGTT	58	8	71	1,94	294
	rv	GTCCTTTGCGACCAGAAT					295
UL78	fw	GTGGACCTCACCATCAAG	60	8	71	1,9 [#]	459
	rv	TCTACCACGTTAGCCAGTAC					460
UL83	fw	ACGGTTCAGGGTCAGAATC	60	8	71	1,9 [#]	463
	rv	GCGAAGATGCGGTAGATG					464
UL97	fw	CCGCTTCTACCACGAATG	60	8	66	1,9 [#]	461
	rv	AGACGCTCCACGTTCTTTC					462
UL99	fw	GAGGACAAGGCTCCGAAAC	60	8	77	1,9 [#]	473
	rv	CTTTGCTGATGGTGGTGATG					474
UL122_1	fw	CCTAGTGTGGATGACCTA	58	8	112	1,88	292
	rv	GTGACACCAGAGAATCAG					293
UL122_2	fw	CCAGTATGCACCAGGTGTTAG	60	8	74	1,9 [#]	475
	rv	CTGGATGCCCTTGTTGTTTC					476
UL123	fw	TCCCTAAGACCACCAATG	60	8	64	1,9 [#]	471
	rv	GAGCACTGAGGCAAGTTC					472

Hellgraue Schattierung: Primer für zelluläre Gene, dunkelgraue Schattierung: Primer für virale Gene, fw = vorwärts, rv = rückwärts, P = Promotor, [†] Hybridisierungstemperatur, [‡] Polymerisationszeit, [#] PCR-Effizienz wurde nicht bestimmt, sondern ein Faktor von 1,9 angenommen, * Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

2.3 siRNAs

Die folgenden siRNAs, die gegen hCMV-mRNAs gerichtet sind, wurden von der Firma BioDec mit dem Programm „siReNA“ vorhergesagt und von der Firma IBA hergestellt. Die siRNAs, die gegen zelluläre mRNAs gerichtet sind, wurden von den Firmen Invitrogen oder Ambion bezogen.

Tabelle 2.4 Verwendete siRNAs, die gegen hCMV-mRNAs gerichtet sind

Bezeichnung	virale Ziel-mRNA	Sequenz des antisense-Strangs 5'→3'	Nr.*
siIRS1#1	IRS1	UUCGCGAAACAUGAACUCCdCdA	86
siIRS1#2		UUGUUUUUAUAUCGUCGGGUdCdG	87
siTRS1/IRS1#1	TRS1 und IRS1	UAUUCAGUUCGUCAGCGdCdC	64
siTRS1/IRS1#2		UUUGGUACGCAAACCGCGCdTdC	65
siTRS1/IRS1#3		UACUUGCACCAGUUCGCCGdCdG	88
siTRS1/IRS1#4		AAAGUCACAGCAGACCCCAAdCdG	89
siUL32#1	UL32	UAUCGAAUUCGGUACGGUCdTdA	80
siUL32#2		UUGUUUUAGACGAAGCCGGdTdT	81
siUL37x1#1	UL37 Exon 1	UUCAAGGCGUUUCGCUGGdAdT	82
siUL37x1#2		UUCUCACCGUCA AUGACGdCdA	83
siUL44#1	UL44	AAAUUGCCGAGCAGCGGGdTdG	18
siUL44#2		UCUUGUGCUCUCGU AUUUdTdT	19
siUL52#1	UL52	UUCGUA AUGACGGUAACGGdTdT	84
siUL52#2		UUUUUUAGCGUGCUCUCGdTdG	85
siUL54#1	UL54	UUAUGCUUGAUCAACCCCGdTdC	97
siUL54#2		UUA AUGACGGCAAUGUGCGdGdC	99
siUL55#1	UL55	UAGACUCGUACCUAAAAGGdTdG	94
siUL55#2		UAAAUGAUAAUGACGACGGdCdT	95
siUL78#1	UL78	UAGCCCGCUUCAACGCCUGdCdA	20
siUL78#2		UCGUCGUUACCAACGGCdCdG	21
siUL83#1	UL83	UGUAGUAGACGUCGGGCUCdTdT	74
siUL83#2		UCGUUGUCGGAAUCCUCGUdCdG	75
siUL83#3		UAAAGUACGUGUGCUCACdCdT	92
siUL83#4		UUCAUCAAUAGGUUACCGdAdG	93
siUL89#1	UL89	UUAAAAGAUGUCGAUGGAGGdTdC	78
siUL89#2		UUAGUGUUGCCUCCACGGdCdG	79
siUL97#1	UL97	GUUUUCUUCGAGCACCGCGdTdC	66
siUL97#2		AGGGUGGUAACAUCGCGdAdG	67
siUL99#1	UL99	UUCUUGGAGCCGUCGUGGGdCdG	22
siUL99#2		ACGUGUUUCAACAGCACAdTdT	23
siUL104#1	UL104	UAAA AUGUCGCGGAGCGCGdCdC	90
siUL104#2		UAAUUGGAGUAGACGAUGGdCdC	97
siUL115#1	UL115	UACA AUACCAACGGGCGdCdA	96
siUL115#2		UAAAAGAGCGUGAUGCCCUdCdG	97
siUL122#1	UL122	CUCGCUAUCAGAGAUACGdAdT	14
siUL122#1_m1		CUCGCUAUCAGAGAUACGdAdT ‡	155
siUL122#1_m2		CUCGCUAUCAGAGAUACGdAdT	156
siUL122#2		GAUAUUGCGCACCUUCUCGdTdT	15
siUL122#3		AUCGAUACCGGCAUGAUUGdAdC	134
siUL122#4		AGGAGUGUUAGUAACCGCGdAdC	135
siUL122#5		UUUUGCGCGUUUCUUAACGdCdG	136
siUL122#6		AUCACCUUGAAAGGACGCGdTdG	137
siUL122#7		AUCGAUAAUCUUGUUGCGdTdA	138
siUL122#8		AGAGGAACUAUCUUAUCGdGdG	139
siUL122/123#1		UAUGUCUGCAGGAACGUCGdTdG	70
siUL122/123#1_m1	UAUGUCUGCAGGAACGUCGdTdG ‡	157	
siUL122/123#1_m2	AUA GUCUGCAGGAACGUCGdTdG	158	
siUL122/123#2	AUCUUUCUCGGGUUCUCGdTdT	71	
siUL122/123#3	GUUCUCGUUGCAAUCCUCGdGdT	130	
siUL123#1	UL123	CAUAGUUAGCCCAAUACAdTdT	16
siUL123#2		GUAUACAAUAGUGACGUGdGdA	17

Bezeichnung	virale Ziel-mRNA	Sequenz des antisense-Strangs 5'→3'	Nr.*
siUL123#3	UL123	AUCAUAUUAAGGCGCCAGdTdG	131
siUL123#4		UACAAUGUAGUUCUCAUACdAdT	132
siUL123#4_m1		UACAAUGUAGUUCUCAUACdAdT ‡	153
siUL123#4_m2		UACAAUGUAGUUCUCAUACdAdT	154
siUL123#5		AUCAUGUGCGUGAGCACCdTdT	133

rot markierte Nukleotide: 2'-O-Me-Modifikation im antisense-Strang, d = desoxy, ‡ Cholesterinmodifikation am 5'-Ende des sense-Strangs, * Nummer in der siRNA-Datenbank der Arbeitsgruppe

Tabelle 2.5 Verwendete siRNAs, die gegen zelluläre mRNAs gerichtet sind und Kontroll-siRNAs

Bezeichnung	zelluläre Ziel-mRNA	Sequenz des antisense-Strangs 5'→3'	Firma	Nr.*
siIRF1#1	IRF1	UCUGUUGUAGCUUCAGAGGdTdG	Ambion	159
siIRF1#2		UUGGUUGGAAUUAUCUGCdAdT	Ambion	160
siIRF1#3		AAGUUGUACAGAUACUGGdTdG	Ambion	161
siRelA#1	NFκB (RelA)	UCAGGGAUGACGUAAAGGGdAdT	Ambion	162
siRelA#2		UAUAGCCUCAGGGUACUCCdAdT	Ambion	163
siRelA#3		UGACGUAAAGGGAUAGGGCdTdG	Ambion	164
siPML#4	PML	UCUUGGAUACAGCUGCAUCdTdT	Ambion	141
siPML#6		UGCGCAUCCACAAUCUGCCdGdG	Ambion	148
siSTAT1#1	STAT1	UUCGUGUAGGGUUAACCGdCdA	Ambion	140
siSTAT1#3		UCCGCAACUAUAGUGAACCCdAdG	Ambion	146
siSTAT2#1	STAT2	AAGAUUCUGCAGCAUUUCCACUCC	Invitrogen	6
siSTAT2#3		UUAGAGACCACAAUGAGCCdTdG	Ambion	152
siSTAT3#2	STAT3	UCUAGGUCAAUCUUGAGGGCdCdT	Ambion	143
siSTAT3#4		AAUCUUAGCAGGAAGGUGCdCdT	Ambion	151
siKontrolle#1	EGFP	GAACUUCAGGGUCAGCUUGCdCdG †	IBA	1
siKontrolle#2	keine	nicht angegeben	Invitrogen	10
siKontrolle#3	keine	nicht angegeben	Ambion	149

Hellgraue Schattierung: siRNAs gegen zelluläre mRNAs, dunkelgraue Schattierung: siRNA-Kontrollen, d = desoxy, † AlexaFluor 594-Modifikation am 3'-Ende des sense-Strangs, * Nummer in der siRNA-Datenbank der Arbeitsgruppe

2.4 HCMV BACmid und Plasmide

Das BACmid pTNwt (J. Alwine, Philadelphia) kam bei der Herstellung des pTNLuc-BACmids (siehe 2.6.3) zum Einsatz. Folgende Plasmide wurden zur Herstellung rekombinanter Retroviren in Phoenix- bzw. H1299-Zellen transfiziert oder für Subklonierungen verwendet (siehe 2.6.2 und 2.8.7).

Tabelle 2.6 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Verwendung	Quelle	Nr.*
pKan-FRT	Klonierung des Plasmids pKan-FRT-Luc	W. Brune, Berlin	32
pGL3-Control		Promega	354
pCGN-pp71	Herstellung des Reportervirus TNLuc	T. Shenk, Princeton	117
pKan-FRT-Luc		Diese Arbeit	636

Bezeichnung	Verwendung	Quelle	Nr.*
pEGFP-TNcIE1	Klonierung des Plasmids pLKO.DCMV.TetO.cIE1	Meinel (2006)	473
pLKO.DCMV.TetO.cICP0		R. Everett, Glasgow	687
pCMV.TetO.cICP0		R. Everett, Glasgow	688
pCMV.TetO.cIE1		Diese Arbeit	695
pLKOneo.CMV.EGFPnlsTetR	Herstellung von TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen mittels rekombinanter Lentiviren	R. Everett, Glasgow	689
pMD2.G		Addgene	691
psPAX2		Addgene	693
pLKO.DCMV.TetO.cIE1		Diese Arbeit	696
pLHCX-STAT1	Herstellung von TetR-IE1-Zellen, die STAT1-Varianten exprimieren mittels rekombinanter Retroviren	Seiler (2010)	791
pLHCX-STAT1*		Seiler (2010)	792
pLHCX-STAT1*Y701F		Seiler (2010)	793
pLHCX- STAT1*S727A		Seiler (2010)	794

* siRNA#146-resistent, * Nummer in der Plasmid-Datenbank der Arbeitsgruppe

2.5 Zellen und Viren

2.5.1 Escherichia coli-Stämme

Für Klonierungen und die Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die Bakterienstämme GM169 (Quelle: R. Wagner, Regensburg) bzw. DH10B (Quelle: Bethesda Research Laboratories, Washington) verwendet. Der Escherichia (E.) coli-Stamm EL250 (Lee et al., 2001) wurde für homologe Rekombinationen zur Herstellung des pTNLuc-BACmids verwendet.

2.5.2 Humane Zellen

Zur Durchführung aller Infektionsstudien wurden die für hCMV permissiven primären humanen Lungenfibroblasten MRC-5 (European Collection of Cell Cultures) (Jacobs et al., 1970) und für Plasmidtransfektionen die humane Lungenkarzinomzelllinie H1299 (Mitsudomi et al., 1992) verwendet. Zur Erzeugung rekombinanter Retroviren dienten Phoenix-Zellen (Kinsella & Nolan, 1996). Außerdem wurden mit, auf MRC-5-Zellen basierenden, induzierbar IE1-exprimierenden Zellen (TetR-IE1) gearbeitet. Als Kontrollzellen dienten MRC-5-Zellen, die nur den Tetracyclin-Repressor (TetR) exprimieren. Beide Zelltypen wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Des Weiteren wurden TetR-IE1-Zellen verwendet, die verschiedene STAT1-Varianten exprimieren und ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden. Als Positivkontrolle für den IFN- γ mRNA-Nachweis mittels quantitativer reversen-Transkriptase-PCR (q-RT-PCR), dienten mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC), die von der Arbeitsgruppe Deml isoliert und für 6 h mit je

1 µg/ml Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) und Ionomycin (Sigma Aldrich, P8139 bzw. I0634) stimuliert wurden (Barabas et al., 2008; Lindner et al., 2005).

2.5.3 Viren

Alle hCMV-Stämme wurden auf MRC-5 (TNwt, TNrevIE1, TRwt, TNLuc) bzw. TetR-IE1-Zellen (TNdIE1) generiert, serumfrei und zelltrümmerfrei geerntet (Winterling, 2009) und bei -80°C gelagert. Als Wildtyp-Viren kamen der laboradaptierte, EGFP-exprimierende Towne (TN)-Stamm TNwt (Marchini et al., 2001), die Revertante TNrevIE1 (Hauer, unveröffentlicht), der klinische, Ganciclovir- und Cidofovir-resistente TR-Stamm TRwt (Alain et al., 1997) sowie das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Reportervirus TNLuc (siehe 2.6.3) zum Einsatz. Zusätzlich wurde das IE1-defiziente TN-Virus TNdIE1 verwendet (Knoblach, 2006). Die Anzahl infektiöser Partikel in den Präparationen wurde mittels Plaque-Test auf MRC-5-Zellen (Card & Enquist, 1995) bzw. durch Quantifizierung zellassoziierter Virusgenome (TNdIE1) (siehe 2.8.4) ermittelt.

2.6 Nukleinsäure-Methoden

2.6.1 Standardmethoden

Die Protokolle für grundlegende Methoden, wie z.B. die Ethanol-fällung, Phenol-Chloroformextraktion von Nukleinsäuren oder die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA-Lösungen, wurden allgemein gebräuchlichen Laborhandbüchern entnommen (Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989). Enzymatische Reaktionen, wie Ligation oder die Restriktionsspaltung von DNA, erfolgten nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der entsprechenden Enzyme und Puffer. Zur Plasmid- und BACmid-Präparation wurde der NucleoBond AX500 Plasmid DNA Purification Kit (Machery & Nagel, 740.531.50) verwendet (Protokoll: low-copy plasmid purification). Plasmid- bzw. BACmid-Präparationen wurden sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke in 0,7% bis 1,5%igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. (Seakem LE Agarose, Biozym, Gelapparatur: HE Mini Submarine Unit oder HE 99X Max Submarine Unit, GE Healthcare Life Sciences). Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen bzw. von PCR-Produkten erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben unter Verwendung des QIAEX II Gel Extraktion Kits (Qiagen, 28106) bzw. QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, 28106). Für Klonierungszwecke wurden kompetente Zellen des E. coli-Stammes GM169 oder DH10B (siehe 2.5.1) mit den Ligationsansätzen transformiert. Nach alkalischer Schnelllyse konnten die gewünschten Klone durch Restriktionsverdau des gewonnenen Plasmids identifiziert

werden (Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989). DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GeneArt (Regensburg) durchgeführt.

2.6.2 Herstellung neuer Plasmide

Um das pTNLuc-BACmid zu generieren (siehe 2.6.3) wurde zunächst das Plasmid pKan-FRT-Luc (#636, siehe Tabelle 2.6) hergestellt. Hierfür wurde die Luciferase-cDNA mit Hilfe des Primerpaars #420/#421 und des Plasmids #32 (siehe Tabelle 2.2 und 2.6) amplifiziert. Über die eingeführten BglIII und SalI Restriktionsschnittstellen wurde die Luciferase-cDNA in das Plasmid #354 (siehe Tabelle 2.6) inseriert, welches eine von FRT (Flp recognition target)-Sequenzen flankierte Kanamycin (Kan)-Resistenzkassette (FRT-Kan-FRT) trägt.

Zur Erzeugung der TetR-IE1-Zellen (siehe 2.8.7) mittels rekombinanter Lentiviren musste zunächst das Plasmid pLKO.DCMV.TetO.cIE1 (#695, siehe Tabelle 2.6) hergestellt werden. Hierfür wurde das pLKO.1puro-Derivat pLKO.DCMV.TetO.cICP0 (#687, siehe Tabelle 2.6) verwendet. Dies vermittelt die Expression des HSV-1 infected cell Proteins 0 (ICP0) unter der Kontrolle von Tandem Tet-Operator (TetO)-Sequenzen, welche sich stromabwärts zu einer verkürzten Version des hCMV MIEP (DCMV) befinden (Everett et al., 2009). Zunächst wurde die IE1-cDNA des hCMV TN-Stammes in Vektor #473 mit dem Primerpaar #483/#484 (siehe Tabelle 2.2 und 2.6) amplifiziert. Über die eingeführten HindIII und EcoRI Restriktionsschnittstellen wurde die IE1-cDNA in das Plasmid pCMV.TetO.cICP0 (#688, siehe Tabelle 2.6) kloniert, um das Konstrukt pCMV.TetO.cIE1 (#695, siehe Tabelle 2.6) zu erzeugen. Das NdeI-EcoRI-Fragment dieses Plasmids wurde schließlich verwendet, um die ICP0-cDNA in Plasmid pLKO.DCMV.TetO.cICP0 (#687, siehe Tabelle 2.6) zu ersetzen.

2.6.3 Herstellung des pTNLuc-BACmids

Die Herstellung rekombinanter hCMV-Viren erfolgt in der Regel mittels bacterial artificial chromosome (BAC)-Mutagenese. Das gesamte hCMV-Genom liegt hier als BACmid in *E. coli* vor, wodurch mittels homologer Rekombination verschiedenste Arten von Mutationen eingeführt werden können. Ein System zur genetischen Manipulation von BACmiden wurde von Lee et al., 2001 vorgestellt. Der von DH10B abgeleitete *E. coli*-Stamm EL250 (siehe 2.5.1) enthält alle relevanten Rekombinationsfunktionen, da diese durch einen integrierten, defekten Prophagen zur Verfügung gestellt werden. Die Rekombinationsfunktion kann durch Temperaturerhöhung auf 42°C transient aktiviert werden, da die Gene *gam*, *exo* und *bet* der Kontrolle des temperatursensitiven λ -Repressors unterliegen. *Gam* inhibiert die *E. coli*-eigene RecBCD-Nuklease, welche sonst elektroporierte lineare DNA, die zur homologen Rekombination benötigt wird, abbauen würde. *Exo* und *Bet* stellen die Rekombinations-

funktion. Zusätzlich enthält der Stamm EL250 das durch Arabinose induzierbare *flp*-Gen, welches für die FLP-Rekombinase kodiert. Dies ermöglicht den gezielten Verlust eines Gens (z.B. Resistenzmarker), das von FRT-Sequenzen flankiert ist und z.B. nach der Selektion nicht mehr benötigt wird.

Die EL250-Bakterien mussten zunächst mit dem pTNwt-BACmid (siehe 2.4), das unter anderem die Sequenz des hCMV-Stammes TN, einen Chloramphenicol (Cam)-Resistenzmarker sowie eine EGFP-Expressionskassette enthält, transformiert werden. Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erhalten, wurden frisch hergestellte, elektrokompente (Sambrook et al., 1989) EL250-Zellen mit 1 µg des frisch präparierten pTNwt-BACmids elektroporiert und bei 30°C auf LB-Cam-Platten (20 µg/ml) kultiviert. Die Integrität des hCMV-Genoms im BACmid wurde durch eine EcoRI-Restriktionsanalyse verifiziert (Daten nicht gezeigt). Damit sollten größere spontane Rekombinationsereignisse ausgeschlossen werden, die zwischen den internen viralen Sequenzwiederholungen sowie zwischen viralen und bakteriellen Sequenzen auftreten können. Anschließend wurden elektrokompente EL250-pTNwt-Zellen hergestellt, wobei in diesem Fall eine Temperaturerhöhung auf 42°C erfolgte, welche zur Expression der für die Rekombination erforderlichen Gene führte.

Zur Herstellung des linearen PCR-Produkts für die homologe Rekombination wurden das Plasmid #636 (siehe 2.6.2 und Tabelle 2.6) und das Primerpaar #423/#424 (siehe Tabelle 2.2) verwendet. Die Primer enthalten homologe Sequenzen stromaufwärts bzw. stromabwärts des zu ersetzenden nicht-essentiellen hCMV-Gens UL21,5.

PCR-Programm:

1x	98°C	30"	
30x	98°C	10"	touch down-Verfahren 0.5°C/Zyklus
	68°C	20"	
	72°C	42"	
2x	98°C	10"	
	54.5°C	20"	
	72°C	42"	
1x	72°C	10"	
1x	4°C	∞	

Die elektrokompenten EL250-pTNwt-Zellen wurden mit 100 ng des linearen, gereinigten (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, 28106) und Kan-Resistenz-vermittelnden PCR-Produkts transformiert (Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989) und für 16 h bei 30°C auf LB-Kan-Platten (25 µg/ml) inkubiert. Durch homologe Rekombination sollte ein hCMV-

BACmid entstehen, das anstelle des UL21,5-hCMV-Gens die Luciferase-cDNA gefolgt von einer durch FRT-Sequenzen flankierten Kan-Resistenzkassette trägt (siehe Abb. 3.1). Zur Überprüfung des neu erzeugten rekombinanten pTNLucKan-BACmids wurde ein EcoRI-Restriktionsverdau durchgeführt und mit dem ebenfalls EcoRI verdautem pTNwt-BACmid verglichen (Daten nicht gezeigt). Um nun die nicht mehr benötigte Kan-Resistenzkassette zu eliminieren wurde mittels Arabinoseinduktion die F₁p-Rekombinase exprimiert. Dazu wurden 0,2 ml einer 10 ml LB-Cam-Übernachtskultur (20 µg/ml) in 10 ml LB-Cam verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 30°C kultiviert. Nach Zugabe von 0,1% [w/v] L-Arabinose wurden die Kulturen 1 h bei 30°C weiter geschüttelt (220 rpm). Anschließend erfolgte eine 1:10-Verdünnung der Bakteriensuspension mit Arabinose-freiem LB-Cam-Medium gefolgt von einer erneuten Wachstumsphase von 1 h bei 30°C. Anschließend wurde die Bakteriensuspension, welche jetzt nur noch eine Cam-Resistenz aufweisen sollte, auf LB-Cam-Platten ausplattiert. Die Bakterienkolonien wurden auch hinsichtlich ihrer Kan-Sensitivität getestet. Das neu generierte rekombinante pTNLuc-BACmid wurde ebenfalls mittels EcoRI-Restriktionsanalyse überprüft (Daten nicht gezeigt).

2.6.4 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR

TetR- und TetR-IE1-Zellen wurden in 12-wells bzw. in 10 cm-Transwells (Corning, 3419) ausgesät. Nach entsprechender Behandlung der Zellen (z.B. siRNA-Transfektion, Doxycyclin-Induktion, IFN/TNF- α /IL-6-Behandlung, hCMV-Infektion) erfolgte die Zellyse und Stabilisierung der Gesamt-RNA mit 350 µl (12-well) bzw. 1,5 ml (10 cm-Transwell) des im RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104) enthaltenen RLT-Puffers. Bei mehr als 2×10^5 Zellen (10 cm-Transwell) wurde das Zelllysate mit Hilfe des Qias shredder Kits (Qiagen, 79654) nach Herstellerangaben homogenisiert. Die weitere Aufreinigung, einschließlich eines DNase-Verdau (Qiagen, 79254) zur Eliminierung von DNA-Kontaminationen, erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben. Die Generierung von Einzelstrang-cDNA erfolgte aus ca. 1 µg (12-well) bzw. ca. 2 µg (10 cm-Transwell) gereinigter Gesamt-RNA unter Zuhilfenahme von Oligo(dT)₂₀-Primern und der SuperScript III Reversen Transkriptase (RT) (Invitrogen, 18080-051) in einem iCycler der Firma BioRad nach Herstellerangaben. Anschließend wurden 5 µl Einzelstrang-cDNA einer 1:10 Verdünnung zur Bestimmung der relativen mRNA-Menge in die q-PCR eingesetzt.

Die q-PCR ist eine hochsensitive Methode, um die Menge an DNA in einer unbekannt Probe quantitativ zu bestimmen und basiert beispielsweise auf der Anlagerung des Farbstoffes SYBR Green I an die kleine Grube doppelsträngiger DNA, was mit einer deutlichen

Steigerung der Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Emission}} = 530\text{nm}$) im Vergleich zu freiem oder an einzelsträngige DNA gebundenem SYBR Green I einhergeht. So kann mittels Fluoreszenzmessung während der PCR die Zunahme des Produktes ermittelt werden. Die Identität des Produktes wird durch Überprüfung der Schmelztemperatur kontrolliert. Die PCR-Zyklus-Anzahl zu Beginn der exponentiellen Amplifikationsphase wird crossing point value oder cp-Wert genannt. E bezeichnet die PCR-Effizienz und damit den Amplifikationsfaktor für jeden Zyklus. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation gilt:

$$(1) \quad N_n = N_0 \cdot E^n$$

mit N_n = Menge an Amplikon im Zyklus n und N_0 = Menge an Amplikon im Zyklus 0

Damit gilt für den Zyklus cp als Spezialfall von (1):

$$(2) \quad N_0 = N_{cp} \cdot E^{-cp}$$

D. h. die Menge an Amplikon in der Probe ist proportional zu E^{-cp} . Für Proben, die auf das gleiche Amplikon hin untersucht werden, gilt zudem, dass ihre jeweiligen N_{cp} -Werte allesamt identisch sind, weshalb sie z. B. in (3) und (4) gekürzt werden können.

Für die Analyse der ChIP-Ergebnisse (siehe 2.7.6) wurde eine Normierung der output-Amplikon-Mengen auf die input-Amplikon-Mengen (mit input ratio bezeichnet) vorgenommen, um Schwankungen in der DNA-Menge auszugleichen:

$$(3) \quad \text{input ratio} = \frac{N_{0(\text{output})}}{N_{0(\text{input})}} = \frac{E^{-cp_{(\text{output})}}}{E^{-cp_{(\text{input})}}} = E^{(cp_{\text{input}} - cp_{\text{output}})}$$

Eventuelle Probenverdünnungen für die PCR sowie die unterschiedlichen Mengen von output- und input-Proben müssen selbstverständlich vor Einsetzen der cp-Werte in (3) durch Anpassen der cp-Werte berücksichtigt werden. Für einen Verdünnungsfaktor von x folgt aus (2):

$$(4) \quad cp_{\text{angepasst}} = cp_{\text{gemessen}} - \frac{\lg(x)}{\lg(E)}$$

Die Primereffizienz E wurde für einige Primerpaare durch serielle 1:y-Verdünnungen (meist $y = 10$) einer beliebigen DNA-Probe und die Auftragung der zugehörigen cp-Werte gegen den \log_y der enthaltenen DNA-Mengen bestimmt. Die Steigung a der Ausgleichsgeraden liefert dann aus (1) und der Geradengleichung:

$$(5) \quad E = 10^{\frac{\lg(x)}{|a|}} \text{ bzw. als Spezialfall für } y = 10: E = 10^{\frac{1}{|a|}}$$

E gilt mit ausreichender Genauigkeit nur in dem cp-Bereich, in dem die Messpunkte der Verdünnungsreihe auf der Ausgleichsgeraden liegen. Für die übrigen Primerpaare, bei denen E nicht bestimmt wurde, wurde ein Faktor von 1,9 angenommen.

Die q-PCR wurde mit Hilfe des LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I-Kits (Roche 03515885001) in einem LightCycler-Gerät (Roche LightCycler 1.5 Instrument) nach Herstellerangaben mit folgendem Programm durchgeführt, wobei jede Kapillare (Roche, 04929292001) 9 µl H₂O, 4 µl Kit-Mastermix, je 1 µl der beiden Primer (10 µM) und 5 µl DNA-Probe enthielt:

1×	10min	95°C
40×	10s	95°C
	10s	x°C
	ys	72°C
1×	Schmelzkurve von 65°C - 95°C	

(Die x- und y-Werte können für die verwendeten Primerpaare der Tabelle 2.3 entnommen werden)

2.6.5 Transkriptomanalyse

Zur Untersuchung des Einflusses von IE1 auf das humane Transkriptom wurden GeneChip-Expressionsanalysen mit TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen (siehe 2.8.7 und 3.3.1) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen auf 10 cm-Schalen ausgesät, wachstumsarretiert und für 24 h bzw. 72 h mit Doxycyclin behandelt (siehe 2.8.1). Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert. Dies erfolgte mit dem TRIzol-Reagenz (Invitrogen, 15596-018) und 15 ml PhaseLock Gel Heavy Reaktionsgefäßen (Eppendorf, 0032005.250) nach Herstellerangaben. Ein zweiter Aufreinigungsschritt erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits einschließlich eines DNase-Verdaus (siehe 2.6.4) nach Herstellerangaben.

Die Gesamt-RNA wurde an das Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik (KFB) in Regensburg geschickt, wo zunächst die Quantität und Qualität der Gesamt-RNA in einem Bioanalyzer (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) überprüft wurde.

Danach wurden, wie im Affymetrix GeneChip Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay Manual (P/N 701880 Rev.4) beschrieben, aus insgesamt 100 ng Gesamt-RNA mit Hilfe von random Hexamer Primer biotinylierte cRNA-Proben hergestellt sowie die darauffolgende Hybridisierung der Proben auf Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST Arrays vorgenommen. Die gescannten Arrays wurden hinsichtlich Hintergrund, Rauschen, % detektierte/regulierte Gene, Array-Sensitivitätsgrenze sowie 3'-5' Signal-Intensitätsunterschiede untersucht und ein ausführlicher Qualitätsreport erstellt. Die Daten der Einzelhybridisierungen wurden mit der Affymetrix GeneChip Operating (GCOS) 1.4 und Affymetrix Expression Console 1.1 Software generiert.

Die weitere Auswertung der Rohdaten erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit den Datenbanken National Center for Biotechnology Information (NCBI), Ensembl Genome Browser, Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, Interferome sowie dem Programm GeneSpring GX.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus humanen Fibroblasten wurde das Kulturgefäß auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit 2 ml (6-well) bzw. 10 ml (10 cm-Schale) eiskaltem Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM mit L-Glutamin, D-Glucose (4,5 mg/ml) und Natriumpyruvat, Invitrogen, 41966-029) gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers (Fisher Scientific, 3468136) in 300 µl (6-well) bzw. 2 ml (10 cm-Schale) eiskaltem DMEM abgekratzt und jedes Gefäß zweimal mit 300 µl (6-well) bzw. 2 ml (10 cm-Schale) eiskaltem DMEM nachgespült. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 500 x g, 4°C) pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes und erneuter Zentrifugation (1 min, 500 x g, 4°C) wurde der restliche Überstand mit einer Pipette abgenommen, das Zellsediment rasch in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde jedes Pellet in 15 bis 25 µl (6-well) bzw. 100 µl (10 cm-Schale) MIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10% [v/v] Glycerin, 0,5% [v/v] Triton-X 100) mit je 1% [v/v] Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem, 539134) und Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2 (Sigma, P2850 und P5726) resuspendiert und die DNA durch fünfminütige Beschallung im Bioruptor der Firma Diagenode (Energieeinstellung: H (hoch), 30s an/30s aus) fragmentiert. Der Proteingehalt im Lysat wurde anschließend nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt, um gleiche Proteinmengen analysieren zu können. Jede Probe wurde mit einem Volumen 2x Protein-Ladepuffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% [w/v] SDS, 10% [v/v] Glycerin, 0,001% [w/v] Bromphenolblau, 200 mM β-Mercaptoethanol) versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und zentrifugiert (10 min, 16100 x g, 21°C). Die Proteine in den Überständen wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren analysiert (siehe 2.7.3).

2.7.2 Zelluläre Fraktionierung

Der Einfluss des hCMV IE1-Proteins auf die nukleäre Akkumulation verschiedener Proteine wurde unter anderem durch subzelluläre Fraktionierung untersucht. Hierzu wurden wachstumsarretierte TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen in 10 cm-Schalen mit Doxycyclin, IFN bzw.

TNF- α behandelt (siehe 2.8.1). Zur Zellernte wurde das Kulturmedium der Zellen durch Absaugen entfernt und der Zellrasen einmal mit 10 ml 37°C-warmen PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 1,5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% [w/v] Trypsin, 0,02% [w/v] EDTA, PAN, P10023100) für 3 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden unmittelbar danach 5 ml eiskaltes serumfreies DMEM zugegeben, welches mit je 1% [v/v] Protease Inhibitor Cocktail Set III und Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2 (siehe 2.7.1) versehen worden war. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Reaktionsgefäß auf Eis überführt und die Zellen sedimentiert (5 min, 500 x g, 4°C). Das Kulturmedium wurde entfernt und im Anschluss an einen weiteren kurzen Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in dem restlichen Medium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert, in ein 1,5 ml-Röhrchen überführt, erneut sedimentiert (5 min, 800 x g, 4°C) und der Überstand schließlich vollständig abgenommen. Zur Isolierung der Zytoplasmafraktion wurde das Zellsediment in 100 μ l eiskaltem Cytoskeleton (CSK)-Puffer (10 mM Piperazin-N,N-bis[ethansulfonsäure], 300 mM Sucrose, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0,1% [v/v] Igepal CA-630) durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren unter Verwendung von Pipettenspitzen mit weiter Öffnung resuspendiert. Dem Puffer wurden vor Gebrauch je 1% [v/v] Protease Inhibitor Cocktail Set III sowie Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2 (siehe 2.7.1) frisch zugesetzt. Nach Zentrifugation (1 min, 1300 x g, 4°C) wurden 75 μ l des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß auf Eis überführt (Zytoplasmafraktion) und mit 75 μ l 2x Protein-Ladepuffer (siehe 2.7.1) versetzt. Das Kernsediment wurde durch einmaliges Waschen mit 500 μ l CSK-Puffer von Rückständen der Zytoplasmafraktion befreit. Nach Sedimentation der Zellkerne (5 min, 1300 x g, 4°C) wurde der Überstand vollständig abgenommen und die Kernfraktion durch Auf- und Abpipettieren in 200 μ l 1x Protein-Ladepuffer (siehe 2.7.1) resuspendiert. Zur Solubilisierung der Proteine und Fragmentierung der genomischen DNA wurde der Kernextrakt anschließend dreimal 5 min im Bioruptor (Diagenode) beschallt (Energieeinstellung: H (hoch), 30 s an/30 s aus), zentrifugiert (5 min, 16000 x g, 22°C) und 150 μ l des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sowohl die Zytoplasmafraktion als auch die Kernfraktion wurden letztlich bei 95°C für 5 min erhitzt. Der Nachweis der Proteinverteilung in den beiden Fraktionen erfolgte schließlich mittels Western Blot-Analyse (siehe 2.7.3).

2.7.3 SDS-PAGE und Western Blot-Analyse

Zur Auftrennung von Gesamtzellextrakten bzw. Zytoplasma- und Kernfraktionen (siehe 2.7.1 und 2.7.2) wurde eine SDS-PAGE nach Laemmli (1970) mit 10 bis 15%-igem Trenngel (30-50% [v/v] Acrylamid-Lösung (30% [w/v] Acrylamid-/Bisacrylamidlösung, Mix 37,5:1, AppliChem, A1672.1000), 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% [w/v] SDS, 0,1% [w/v] Ammoniumperoxodisulfat, 2,64 mM TEMED) und 5%-igem Sammelgel (17% [v/v] Acrylamid-Lösung, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% [w/v] SDS, 0,1% [w/v] Ammoniumperoxodisulfat, 6,6 mM TEMED) durchgeführt (Gelapparatur: Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, 165-3301). Von jeder Probe wurden zwischen 10 µl und 15 µl geladen und 10 µl eines Protein-Größenstandards (Prestained Protein Marker, Broad Range von New England Biolabs, P7708) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 bis 25 mA in Tris-Glycin-Puffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 1% [w/v] SDS) bis die Lauffront am unteren Gelrand angelangt war. Das Trenngel wurde ebenso wie die Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll, Optitran BA-S83) für 5 min in Towbin-Puffer (13 mM Tris, 100 mM Glycin, 20% [w/v] Methanol) äquilibriert, bevor der Transfer im Submers-Blot-Verfahren (Blot-Apparatur: Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, 170-3930) für 1 h bei 300 mA nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Nach zweiminütiger Ponceau-Färbung (1% [w/v] Ponceau S, 5% [v/v] Essigsäure) wurde die Membran für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur in 5% [w/v] Milchpulver in PBS blockiert, mit PBS/0,1% Tween (PBS mit 0,1% [v/v] Tween 20) gewaschen und über Nacht bei 4°C mit einer Verdünnung des Primärantikörpers (siehe 2.1) in PBS inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran dreimal für 10 min mit PBS/0,1% Tween gewaschen, für 1 h bei Raumtemperatur mit einer Verdünnung des Sekundärantikörpers (siehe 2.1) in 3% [w/v] Milchpulver in PBS inkubiert, dreimal für 10 min mit PBS/0,1% Tween und einmal kurz mit reinem PBS gewaschen. Der Nachweis des Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörpers erfolgte nach Herstellerangaben mit einem Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal West Pico, Pierce, 34080 bzw. SuperSignal West Femto, Pierce, 34096). Die Detektion des Signals erfolgte durch Auflegen und Entwickeln eines Röntgenfilms (CL-XPosure Film 18 x 24 cm, Thermo Scientific, 34089, Entwickler-Lösung: GBX developer/replenisher, Sigma, P7042, Fixierer-Lösung: GBX fixer/replenisher, Sigma, P7167).

2.7.4 (Immun-)Fluoreszenzmikroskopie

TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen wurden auf sterile Deckgläschen (Roth, H 874) in 6-wells ausgesät. Nach Doxycyclin-Behandlung erfolgte die Fixierung des Zellmaterials zum

gewünschten Zeitpunkt nach zwei verschiedenen Protokollen: Paraformaldehyd (PFA)-Fixierung und Methanol-Fixierung. Für beide Methoden wurde zunächst das Deckgläschen mit einer Pinzette aufgenommen, nacheinander in drei Bechergläser mit PBS/0,05% Tween (PBS mit 0,05% [v/v] Tween 20) getaucht und in einem mit PBS/0,05% Tween gefüllten 6-well abgelegt. Für die PFA-Fixierung wurde die Probe 15 min bei Raumtemperatur mit 2% [w/v] PFA in PBS inkubiert, dreimal für 5 min mit PBS/0,05% Tween gewaschen, anschließend für 15 min bei Raumtemperatur mit 0,1% [v/v] Triton-X 100 in PBS inkubiert und dreimal für 5 min mit PBS/0,05% Tween gewaschen. Für die Methanol-Fixierung wurde die Probe für 15 min bei -20°C mit vorgekühltem MeOH inkubiert und anschließend zweimal kurz mit PBS/0,05% Tween gewaschen. Nach einstündiger Blockierung (PBS/0,05% Tween mit 2% [w/v] BSA, Albumin Fraktion V, AppliChem, A1391) wurden die Präparate zweimal kurz mit PBS/0,05% Tween gewaschen und dann für 1 h mit einer Verdünnung des Primärantikörpergemisches (siehe 2.1) in Blockierungslösung inkubiert. Dazu wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach oben auf ein Stück Parafilm gelegt, mit 100 µl Antikörperlösung benetzt und in eine geschlossene Dose mit feuchtem Whatman-Papier gestellt. Die weiteren Waschschrte (dreimal 5 min, PBS/0,05% Tween) erfolgten wieder im 6-well. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut auf ein Stück Parafilm gelegt und für 1 h mit 100 µl einer Verdünnung des Sekundärantikörpergemisches (siehe 2.1) und einer 1:10000-Verdünnung von 4,6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI, Roche, 10236276001) in Blockierungslösung inkubiert, dreimal für je 5 min mit PBS/0,05% Tween sowie einmal kurz mit reinem PBS im 6-well gewaschen und mit der Zellseite nach unten auf 20 µl SlowFade Gold antifade reagent (Invitrogen, S36936) bzw. ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, P36930), die sich auf einem gereinigten Objektträger befanden, gelegt. Durch sanftes Überstreichen der unter einem Zellstofftuch liegenden Probe wurde überschüssiges Reagenz entfernt, bevor der Rand des Deckgläschens mit Nagellack versiegelt wurde. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mit Hilfe des institutseigenen Fluoreszenzmikroskops (DMRX, Leica, Objektiv HCX PL APO, 63x/1,40, 0,60 OIL, ∞/0,17/E) mit digitalem Bildverarbeitungssystem (Image Pro 2.6) ausgewertet.

2.7.5 Colorimetrischer Sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Mengenbestimmung der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 im Kulturüberstand von wachstumsarretierten TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen erfolgte mit einem colorimetrischen, nach dem „Sandwich-Prinzip“ funktionierenden ELISA von R&D Systems (DCX900, DIP100, DCX110) nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin

behandelt (siehe 2.8.1), dann einmal mit PBS gewaschen und für weitere 24 h in einem halben Kulturvolumen DMEM mit 0,1% [w/v] BSA (siehe 2.7.4), inkubiert. Der an eine Mikrotiterplatte adsorbierte spezifische Antikörper wurde mit dem zu untersuchenden Kulturüberstand inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen mit dem im Kit bereitgestellten Waschpuffer gewaschen und mit einer Verdünnung des zweiten, HRP-gekoppelten spezifischen Antikörpers befüllt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde in einer enzymatischen Reaktion mit Hilfe der Antikörper-gekoppelten HRP das farblose Substrat Tetramethylbenzidin oxidiert. Die auftretende Farbreaktion wurde durch Zugabe der im Kit beigegefügt Schwefelsäure gestoppt und konnte in einem ELISA-Reader (Modell 680, BioRad) bei 450 nm quantifiziert werden. Die Absorption ist dabei direkt proportional zur Menge des Epitops und somit des nachzuweisenden Moleküls. Durch gleichzeitige Messung der Absorption bekannter Antigenmengen und einer daraus erstellten Standardkurve konnte die absolute Antigenkonzentration ermittelt werden.

2.7.6 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Wachstumsarretierte TetR- und TetR-IE1-Zellen in einer 15 cm-Kulturschale wurden zum gewünschten Zeitpunkt nach Doxycyclin/IFN-Behandlung mit 1% Formaldehyd (Sigma, F8775) für exakt 15 min im Zellkulturbrutschrank fixiert. Nach Zugabe von Glycin (Endkonzentration: 125 mM) und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Schale auf Eis platziert, der Überstand abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit je 20 ml eiskaltem serumfreiem DMEM gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber (siehe 2.7.1) in 3 ml eiskaltes DMEM gekratzt, die Zellsuspension in ein 15 ml-Reaktionsgefäß auf Eis überführt und jede Schale noch dreimal mit je 3 ml eiskaltem DMEM nachgespült, Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 2000 x g, 4°C) sedimentiert. Nach dem Abgießen des Überstandes und erneuter Zentrifugation (1 min, 2000 x g, 4°C) wurde der restliche Überstand mit einer Pipette vollständig entfernt, das fixierte Zellmaterial rasch in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen (20 min in Eiswasser) wurde das Pellet in 1 ml eiskaltem FastChIP-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 333 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% [v/v] Triton-X 100, 0,5% [v/v] Igepal CA-630) durch 30-maliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Dem Puffer wurden vor Gebrauch je 1% [v/v] Protease Inhibitor Cocktail Set III, Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2 (siehe 2.7.1) und 0,5 mM DTT frisch zugesetzt. Anschließend wurde das Chromatin sedimentiert (1 min, 12000 x g, 4°C), mit 1 ml FastChIP-Puffer gewaschen und erneut in 1 ml FastChIP-Puffer resuspendiert. Zur Fragmentierung des

Chromatins wurden die Proben dreimal für 5 min im Eiswasserbad des Bioruptors (Diagenode) beschallt (Energieeinstellung: H (hoch), 30 s an/30 s aus). Nach dem Überführen der Probe in ein 2 ml-Reaktionsgefäß wurde durch Zentrifugation (10 min, 16100 x g, 4°C) unlösliches Material sedimentiert und 900 µl Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um den DNA-Gehalt der Proben zu ermitteln und gegebenenfalls durch Verdünnung in FastChIP-Puffer anzugleichen, wurde die Absorption der Proben nach 1:50 Verdünnung mit Wasser bei einer Wellenlänge von 260 nm spektrophotometrisch bestimmt. Daraufhin wurden 50 µl der Probe zur Bestimmung der Menge an eingesetzter Gesamt-DNA abgenommen, mit einem dreifachen Volumen Ethanol (Merck, 1.08543.0250) versetzt und die DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde die präzipitierte DNA sedimentiert (30 min, 16000 x g, 4°C), mit 1 ml 70% [v/v] EtOH gewaschen, unter sterilen Bedingungen getrocknet und zusammen mit den immunpräzipitierten Proben wie unten beschrieben gereinigt. In die Immunpräzipitation (IP) wurden 800 µl der Probe eingesetzt. Zur Entfernung von unspezifisch an Protein A-Agarose bindendem Material wurde die Probe mit 75 µl Protein A-Agarose/salmon sperm DNA (Millipore, 16-157) versetzt und für 30 min bei 4°C drehend inkubiert. Nach Zentrifugation (1 min, 100 x g, 4°C) und dreiminütiger Inkubation auf Eis zum vollständigen Absetzen der Agarose wurde der Überstand in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µg des gewünschten Antikörpers (siehe 2.1) über Nacht bei 4°C rotiert. Ausgefallenes Material wurde am nächsten Tag durch Zentrifugation (10 min, 16000 x g, 4°C) entfernt und 700 µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Sedimentation der Antikörper-Protein-DNA-Komplexe wurden die Ansätze nach Zugabe von 60 µl Protein A-Agarose/salmon sperm DNA für eine weitere Stunde bei 4°C drehend inkubiert. Nach Zentrifugation (1 min, 100 x g, 4°C) und dreiminütiger Inkubation der Proben auf Eis, wurde der Überstand mit einer feinen Kanüle (BD Biolance, 22G, 300900) entfernt und das Pellet fünfmal mit 1 ml FastChIP-Puffer (+ 0,5 mM DTT) gewaschen. Anschließend wurden sowohl die Gesamt-DNA-Proben (siehe oben) als auch die IP-Proben mit 100 µl einer 10%igen [w/v] Chelex 100 (Bio-Rad, 142-1253) Suspension versetzt, kurz gevortext und zur Elution der DNA 15 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit 20 µg Proteinase K (Roche, 03115887001) und 20 µg DNase-freier RNase (Roche, 11119915001) versetzt und 30 min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation bei 100°C für 15 min wiederholt und die Chelex-Matrix sedimentiert (1 min, 12000 x g, 4°C). Der von Protein, RNA und Ionen gereinigte DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt. Die Chelex-Fraktion wurde zur Optimierung der Ausbeute mit weiteren 100 µl sterilem Wasser gemischt,

zentrifugiert und der Überstand mit dem ersten vereinigt. Der Anteil coimmunpräzipitierter DNA an eingesetzter Gesamt-DNA wurde mittels q-PCR ermittelt (siehe 2.6.4).

2.8 Zellkulturverfahren

2.8.1 Kultivierung humaner Zellen

Alle Säugerzellen wurden in DMEM (siehe 2.7.1) mit 10% fötalem Kälberserum, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (PAN Biotech, P06-07100) kultiviert (Vollmedium). Fötales Kälberserum wurde von den Firmen PAN Biotech, Lonza Bio Whittaker und Invitrogen bezogen. Die Inkubation erfolgte in einem befeuchteten HERAcell 240 Inkubator (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Standard-Kulturvolumina waren 25 ml in 15 cm-Schalen (Falcon, 35 3025), 10 ml in 10 cm-Schalen (Falcon, 35 3003), 2 ml in 6-wells (Falcon 35 3046), 1 ml in 12-wells (Falcon, 35 3043), 300 µl in 48-wells (Falcon, 35 3230) und 100 µl in 96-wells (Falcon, 35 3072). Die relativ langsam wachsenden humanen Fibroblasten MRC-5 wurden ein bis zwei Mal pro Woche im Verhältnis 1:3 subkultiviert (Ausubel et al., 1987). Die transformierten, schnell wachsenden Zelllinien H1299 und Phoenix wurden dagegen nach jeweils drei bis vier Tagen im Verhältnis 1:10 auf neue Kulturschalen verteilt. Um die Zellen im Zellzyklus zu arretieren erhielten die MRC-5-Zellen drei Tage nach Aussaat noch einmal frisches Kulturmedium, in dem sie dann aber für weitere sieben Tage verblieben und so durch Kontaktinhibition und Verbrauch der Wachstumsfaktoren im Medium in die G₀-Phase des Zellzyklus eintraten. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten TetR-exprimierenden Zellen wurden bis zum Beginn eines Experiments unter Zugabe von G418 (100 µg/ml, Calbiochem, 345810) zum Kulturmedium selektioniert. TetR-IE1-Zellen, die zusätzlich die cDNA für IE1 unter Kontrolle des TetO enthalten, wurden in Gegenwart von G418 (100 µg/ml) und Puromycin (0,5 µg/ml, Sigma, P8833) kultiviert (siehe 2.8.7 und 3.3.1). Die Induktion der IE1-Expression durch Doxycyclin erfolgte in der Regel 72 h vor Beginn eines Experiments. Hierfür wurde das Kulturmedium der Zellen alle 24 h mit je 0,33 µg/ml Doxycyclin versetzt. Bei einer Induktionsdauer von 48 h wurde zweimal im 24 h-Abstand 0,5 µg/ml Doxycyclin zugegeben und bei einer Induktionsdauer von nur 24 h und weniger erfolgte eine einmalige Gabe von 1 µg/ml Doxycyclin.

Zur Aktivierung der Jak-STAT-Signalkaskade, wurden die Zellen mit rekombinanten humanem IFN-α (1000 U/ml), IFN-γ, TNF-α oder IL-6 (jeweils 10 ng/ml) behandelt (R&D Systems, 285-IF-100, 210-TA-050, 11200-2, 206-IL-010).

2.8.2 Annealing und Transfektion von siRNAs

Zur Inhibition der hCMV-Replikation und zur Untersuchung der Rolle einzelner Transkriptionsfaktoren bei der IE1-abhängigen Induktion humaner Gene wurde die RNAi-Technologie angewandt, die im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden konnte. Die transiente Herunterregulierung zellulärer aber auch viraler Proteine erfolgte mittels Transfektion (Lipofektion) von siRNAs. Die meisten der von der Firma IBA erhaltenen siRNAs wurden als Einzelstrang-RNAs geliefert. Um einen funktionellen siRNA-Duplex zu erhalten, mussten die zueinander komplementären Einzelstrang-RNAs zunächst hybridisiert werden. Dazu wurde folgendes Gemisch hergestellt: 15 µl 5x Annealing-Puffer (Dharmacon, B-002000-UB-100), 30 µl sense-Strang (100 pmol/µl), 30 µl antisense-Strang (100 pmol/µl). Der Annealing-Ansatz wurde im iCycler (BioRad) für eine Minute bei 90°C und für 60 Minuten bei 30°C inkubiert, anschließend auf 4°C abgekühlt, aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert. Die Endkonzentration der siRNA betrug 40 pmol/µl. Am Vortag der siRNA-Transfektion wurden ca. 2×10^5 MRC-5-Zellen pro ml in Vollmedium ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und das entsprechende Volumen Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen, 31985-047) zugegeben (siehe Tabelle 2.7). Anschließend wurde der Transfektionsansatz hergestellt, der sich wie folgt zusammensetzte: Für eine Transfektion im 12-well Format (siehe Tabelle 2.7 für weitere Kulturgefäßgrößen) wurden 36 pmol siRNA in 100 µl Opti-MEM-Medium verdünnt (Teilansatz A) und 2 µl des siRNA-Transfektionsreagenz Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen, 13778-150) zu 98 µl Opti-MEM-Medium gegeben (Teilansatz B) und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Teilansatz A wurde daraufhin zu Teilansatz B gegeben, der nunmehr vollständige Transfektionsansatz sanft gemischt, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben. Nach 4 bis 6 h wurde das Opti-MEM-Medium durch Vollmedium ersetzt.

Tabelle 2.7 Mengenangaben für siRNA-Transfektionen in unterschiedlichen Kulturgefäßen

Kulturgefäß	Volumen der Zellsuspension	Volumen des siRNA/RNAiMAX Verdünnungsmediums	siRNA-Menge/Konzentration		RNAiMAX-Volumen
			pmol	nM	
96-well	100 µl	2 x 10 µl	3,6	30	0,2 µl
48-well	200 µl	2 x 25 µl	7,5	30	0,4 µl
12-well	1 ml	2 x 100 µl	36	30	2 µl
6-well	2,5 ml	2 x 250 µl	90	30	5 µl

2.8.3 TNLuc-Virusrekonstitution und hCMV-Infektion

Um das TNLuc-Reportervirus zu erzeugen wurden MRC-5-Zellen durch Elektroporation mit dem in dieser Arbeit generiertem pTNLuc-BACmid (siehe 2.6.3) transfiziert. Hierfür wurden 5×10^6 MRC-5-Zellen in 250 μ l Vollmedium mit 3 μ g pTNLuc-BACmid-DNA und 1 μ g pCGN-pp71 (kodiert für das hCMV-Tegumentprotein pp71 und verstärkt die Infektiosität viraler DNA, siehe Tabelle 2.6) in einer Elektroporationsküvette (BioRad, 1652088) gemischt. Die Zellsuspension wurde sofort bei 250 V, 1050 μ F mit dem EasyjecT Optima Elektroporator (Peqlab) elektroporiert. Im Anschluss wurden die MRC-5-Zellen auf eine 10 cm-Schale mit vorgewärmtem Kulturmedium gegeben, welches 24 h nach Transfektion (p.t.) erneuert wurde. Nach 3 bis 4 Tagen konnten erfolgreich transfizierte und infizierte Zellen anhand ihrer EGFP-Expression identifiziert werden. Die infizierten MRC-5-Zellen in der 10 cm-Schale wurden 1:3 subkultiviert und nach vollständiger Infektion aller Zellen, wurden die Viren serumfrei und zelltrümmerfrei geerntet (Winterling, 2009) und bei -80°C gelagert.

Für eine Infektion von MRC-5-Zellen mit hCMV wurde zunächst die benötigte Menge an Virusstock bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zur Vereinzelung der Virionen im Becherresonator des Branson-Sonifier 450 beschallt (output control: 8, duty cycle: 80%, 10 Pulse). Nach zweistündiger Infektion wurde das Inokulum abgesaugt und durch frisches Vollmedium ersetzt. Typische Infektionsvolumina waren 5 ml für 10 cm-Schalen, 1 ml für 6-wells, 500 μ l für 12-wells und 120 μ l für 48-wells. Um den Einfluss einzelner siRNAs auf die hCMV-Replikation zu untersuchen wurden siRNA-transfizierte Zellen 4 h p.t. mit dem Reportervirus TNLuc (siehe 2.6.3) unter niedrigen MOI-Bedingungen infiziert.

2.8.4 Bestimmung des Titers von hCMV-haltigen Kulturüberständen

Für die Titerbestimmung von Virusstocks durch den Plaque-Test wurden zwei Aliquots bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und danach zur Vereinzelung der Virionen im Becherresonator des Branson Sonifier 450 beschallt (output control: 8, duty cycle: 80%, 10 Pulse). Die Aliquots wurden logarithmisch in acht Stufen von 10^{-1} bis 10^{-8} mit Medium verdünnt. Anschließend wurden je 500 μ l der Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-8} zur Infektion von wachstumsarretierten MRC-5-Zellen in 6-well Platten eingesetzt und für 2 h inkubiert. Nach dem Absaugen des Inokulums wurde der Zellrasen mit 3 ml Methocel-Lösung (1% [w/v] Methocel (Sigma, M0262) in DMEM mit 1% [v/v] fötalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin) überschichtet, um so die Ausbreitung der Viren über das Medium zu unterbinden. Nach zehntägiger Inkubation im Zellkulturbrutschrank wurde die Methocel-

Lösung abgesaugt und jedes well dreimal mit je 5 ml PBS gewaschen und danach für 10 min mit 2 ml Färbelösung (70% [v/v] MeOH, 0,5% [w/v] Methylenblau) inkubiert. Nach dem Abgießen der Färbelösung wurde die Platte vorsichtig mit entionisiertem Wasser gespült und getrocknet. Durch Auszählen der Plaques lässt sich der Titer der Virus-haltigen Proben mit Hilfe folgender Formel bestimmen: Anzahl der ausgezählten Plaques x Virsverdünnung x 2 = plaque forming units (PFU)/ml

Zur Ermittlung der 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) einer hCMV-positiven Probe wurden zwei 96-well-Platten mit 100 µl Zellsuspension (2×10^4 Zellen) pro well beschickt und für 24 h inkubiert. Die zu bestimmende Virus-haltige Probe wurde in Duplikaten logarithmisch von 10^{-1} bis 10^{-8} verdünnt. Mit jeder dieser Verdünnungen wurden durch Zugabe von 100 µl die Zellen einer Reihe (zwölf Vertiefungen) der 96-well-Platte infiziert. Nach sieben Tagen wurde die Anzahl der wells mit virusinfizierten Zellen anhand der EGFP-Expression der verwendeten hCMV-Stämme fluoreszenzmikroskopisch ermittelt und daraus die TCID₅₀ nach der Formel von Kaerber berechnet (Kaerber, 1931; Mahy & Kangro, 1996).

Um vergleichbare Infektionsbedingungen von TN*dl*IE1 und TNwt bzw. TN*rev*IE1 (siehe 2.5.3) zu erreichen, wurden gleiche Mengen an infektiösen Partikeln eingesetzt. Die Bestimmung des Gehalts an infektiösen Partikeln in den einzelnen Präparationen, erfolgte durch Ermittlung intrazellulärer Virusgenome nach Infektion von MRC-5-Zellen (siehe 2.8.3). Hierfür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen der Virusstocks infiziert und die Adsorption der Partikel nach 2 h durch eine einminütige Inkubation mit Natrium-Citrat-Puffer (40 mM Na-Citrat pH 3,0, 10 mM KCl, 135 mM NaCl) gefolgt von zwei Waschschritten mit Kulturmedium gestoppt. Nach weiteren 8 h erfolgte die Aufreinigung von Gesamt-DNA mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 69506) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde unter Einsatz von 5 µl DNA einer 1:10 Verdünnung die relative Menge an viraler DNA mittels q-PCR und UL54-spezifischen Primern bestimmt (siehe Tabelle 2.3 und 2.6.4). Durch Kenntnis des Wildtypvirus-Titers kann somit der Titer der TN*dl*IE1-Mutante berechnet werden.

2.8.5 Bestimmung der Luciferaseaktivität TN*Luc*-infizierter Zellen

Um den Einfluss einzelner siRNAs auf die hCMV-Replikation zu untersuchen, wurden siRNA-transfizierte MRC-5-Zellen in 12-wells mit dem TN*Luc*-Reportervirus infiziert. Als Maß für die Akkumulation viraler early Genprodukte, wurde die Aktivität der viruskodierten Luciferase in den infizierten Zellen bestimmt. Der durchgeführte Test beruht auf der Oxidation von beetle-Luciferin unter Verbrauch von ATP, Mg²⁺ und O₂ durch das Enzym

Luciferase, wobei Licht der Wellenlänge 560 nm emittiert wird. Die Menge des emittierten Lichts ist proportional zur Menge der Luciferase. Sollte die Luciferaseaktivität bereits zwei Tage nach Infektion bestimmt werden, wurden die in Triplikaten infizierten Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und mit 300 μ l passivem Lysepuffer (Promega, E1941A) versetzt. Zur Bestimmung der Virusreplikation ab drei Tage post infection (p.i.) wurde das Medium der in Duplikaten infizierten Zellen geerntet. Mit 120 μ l des Kulturüberstands erfolgte erneut eine Infektion in Duplikaten von frischen konfluenten MRC-5-Zellen in 48-wells. Nach 24 h wurden die neu infizierten Zellen einmal mit 200 μ l PBS gewaschen und mit 120 μ l passivem Lysepuffer (Promega, E1941A) versetzt. Zur effizienten Zellyse wurden die Platten mindestens 1 h bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die lysierten Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation pelletiert (1 min, $16100 \times g$, 21°C). Zwanzig μ l des Überstandes wurden in ein 5 ml-Reaktionsröhrchen (Falcon, 35 2052) gegeben und mit 100 μ l des Luciferase-Assay-Reagenz (Promega, E1483) versetzt. Schließlich wurde in einem Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold Technologies) das emittierte Licht 2 s nach Reagenzzugabe für eine Dauer von 10 s gemessen.

2.8.6 Cytotoxizitätstest

Zur Untersuchung des toxischen Einflusses von siRNAs auf MRC-5-Zellen kam der CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, G3580) zum Einsatz. Die Methode beruht auf dem colorimetrischen Nachweis eines Formazan-Produktes, das durch Reduktion aus der Tetrazolium-Komponente des Substrats entsteht. Als Reduktionsmittel dienen vermutlich NADH und NADPH, deren Konzentration in stoffwechselaktiven Zellen deutlich höher ist als in Geschädigten.

Für den Test wurden subkonfluente MRC-5-Zellen in 96-wells mit den entsprechenden siRNAs transfiziert (siehe 2.8.2) und nach zwei bzw. fünf Tagen auf deren toxischen Einfluss untersucht. Für die Messung wurden die einzelnen Vertiefungen mit je 20 μ l des Kit-Reagenz versehen und für etwa 30 min im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurde mehrfach die Absorption bei 490 nm im ELISA-Reader (Modell 680, BioRad) gemessen. Der Datensatz mit den höchsten OD-Werten, die noch unterhalb von eins lagen, wurde zur Auswertung herangezogen. Die Untersuchung wurde für jede siRNA in Quadruplikaten durchgeführt.

2.8.7 Herstellung transgener MRC-5-Zellen mit Hilfe rekombinanter Retroviren

Zur Erzeugung transgener MRC-5-Zellen wurden einfache Retroviren (abgeleitet vom Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV)) oder komplexe Retroviren (Lentiviren) verwendet (Adam & Miller, 1988; Coffin, 1992). Die Herstellung der TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen erfolgte mittels rekombinanter Lentiviren (siehe 3.3.1). Es werden drei Komponenten zur Produktion von lentiviralen Partikeln benötigt: ein lentiviraler Vektor, welcher die Sequenz des Transgens beinhaltet, ein Verpackungsvektor, der unter anderem für die lentiviralen Proteine Gag-Pol kodiert (Gag steht für gruppenspezifisches Antigen und beinhaltet unter anderem die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine; Pol steht für Polymerase und ist ein Multienzymvorläufer aus Protease, reverser Transkriptase und Integrase) und ein Hüllvektor, der beispielsweise die Expression des Hüllproteins G des Vesikulären Stomatitis-Virus vermittelt. Die Herstellung von TetR-IE1-Zellen, die rekombinantes STAT1 stabil exprimieren, erfolgte mit Hilfe MoMLV-abgeleiteter rekombinanter Retroviren (siehe 3.3.9). Zur Produktion der Viruspartikel wird die Verpackungszelllinie Phoenix benötigt (siehe 2.5.2), welche die Gene gag-pol und env (env = Gen für retrovirales Hüllprotein) stabil integriert hat (Miller & Morrison, 1999). Das Transgen wird durch einen retroviralen Vektor zur Verfügung gestellt.

Zur Erzeugung rekombinanter Retroviren wurden $1,5 \times 10^6$ H1299-Zellen bzw. 5×10^6 Phoenix-Zellen auf 10 cm-Kulturschalen ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Für eine bessere Haftung der Phoenix-Zellen am Plattenboden, wurden Kulturschalen verwendet, die mit rat tail collagen I beschichtet waren (BD Biosciences, 354236) (Knoblach, 2006). Am Folgetag wurden die H1299-Zellen mit 10 µg des lentiviralen Plasmids #689 bzw. des in dieser Arbeit hergestellten Plasmids #696 (siehe 2.6.2) zusammen mit 2,5 µg des Hüllvektors #691 und 7,5 µg des Verpackungsplasmids #693 mittels Ca_2PO_4 -Präzipitation (Graham & van der Eb, 1973) transfiziert (siehe Tabelle 2.6). Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurden 25 µM Chloroquin (Sigma, C6628), das lysosomale DNAsen durch Neutralisierung des Vesikel-pH inhibiert, tropfenweise zugegeben. Das Plasmid #689 (pLKOneo.CMV.EGFPnlsTetR) enthält die komplette MIEP/Enhancer-Region, welche stromaufwärts zu einer EGFP-kodierenden Sequenz liegt, die an ein nukleäres Lokalisations-signal (nls) und die TetR-Sequenz geknüpft ist (Everett et al., 2009).

In die Phoenix-Zellen wurde lediglich 17 µg des retroviralen Vektors #791, #792, #793 bzw. #794 (siehe Tabelle 2.6) eingebracht. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und durch Frisches ersetzt. Vierzig und 60 h p.t. wurden die Zellkulturüberstände geerntet, welche nunmehr die rekombinanten Retroviren enthielten. Diese vermittelten entweder die

Expression des TetRnlsEGFP-Fusionsproteins, die Expression von IE1 unter der Kontrolle des Tetracyclin/Doxycyclin-induzierbaren Promotors oder die Expression von rekombinantem STAT1. Nach Zentrifugation (5 min, 500 x g, 4°C) und Filtration (0,45-µm Filter, Roth, P667.1) konnten die retrovirushaltigen Zellkulturüberstände in die Transduktion eingesetzt werden.

In einer 10 cm- bzw. 15 cm-Zellkulturschale wurden dazu drei Tage vor Transduktion MRC-5-Zellen ausgesät und unter Standardbedingungen inkubiert. Für die Transduktion wurde das Kulturmedium der Zellen durch 5 ml bzw. 15 ml retrovirushaltigen Zellkulturüberstand ersetzt. Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz wurde Polybren (8 µg/ml [w/v], Sigma, H9268) zugegeben, wobei die Lösung jedes Mal frisch hergestellt wurde. Es wird angenommen, dass das Polykation Polybren eine Neutralisierung der elektrostatischen Ladungen von Viruspartikel und Zellmembran hervorruft, dadurch die Anheftung der Viruspartikel an die Zelle verstärkt und ihre Aufnahme in die Zelle erleichtert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde das Inokulum durch Vollmedium ersetzt. Die Transduktion wurde nach 24 h wiederholt.

2.8.8 Fluoreszenz-basiertes Sortieren von Zellen

Zur maximalen Unterdrückung der IE1-Expression in nicht induzierten TetR-IE1-Zellen erfolgte eine Anreicherung von Zellen, die besonders große Mengen des TetRnlsEGFP-Fusionsproteins exprimieren. Hierfür wurden 4×10^7 TetR-IE1-Zellen in 4 ml PBS mit 2% [v/v] fötalem Kälberserum resuspendiert und zur Vereinzelnung der Zellen in ein 5 ml FACS-Röhrchen auf Eis gefiltert (Zell-Filter, Miltenyi Biotec, MACS 120-002-220). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Petra Hoffmann wurden die Zellen mit starker TetRnlsEGFP-Expression auf der Basis ihrer hohen Fluoreszenzintensität im FACSCanto II (Becton, Dickinson) selektiert. Die sortierten Zellen wurden anschließend in Vollmedium weiterkultiviert.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung antiviraler siRNAs

Wie in der Einleitung dargelegt, sind die präventiven und therapeutischen Mittel gegen hCMV-Erkrankungen auf wenige niedermolekulare Wirkstoffe beschränkt, die zudem signifikante toxische Nebenwirkungen aufweisen und teilweise nur limitiert bioverfügbar sind. Ein weiteres zentrales Problem sind Kreuz-Resistenzbildungen aufgrund von Mutationen der viralen DNA-Polymerase. Deshalb besteht ein dringender Bedarf an neuen antiviralen Strategien gegen hCMV. In jüngster Vergangenheit wurde die RNAi-Technologie vermehrt als ein vielversprechender innovativer Ansatz zur Behandlung von Virusinfektionen angesehen. Mit Hilfe der hochselektiven, äußerst wirksamen und vergleichsweise einfach herzustellenden siRNAs kann ein sehr breites Spektrum an Genprodukten für potentielle Therapieoptionen erfasst werden. Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines effizienten Screening-Verfahrens zur Identifizierung und Evaluierung hCMV-gerichteter antiviraler siRNAs.

3.1.1 Herstellung und Charakterisierung eines Luciferase/EGFP-Reportervirus

Für einen Screening-Ansatz ist es enorm wichtig ein effizientes Reportersystem zur Verfügung zu haben, welches zuverlässig, robust, schnell und kostengünstig ist. Die Möglichkeiten zur Virustiterbestimmung wie beispielsweise der Plaque-Test, TCID₅₀ (siehe 2.8.4) oder der Fluoreszenz-Fokus-Assay (FFA) (Yang et al., 1998) sind zwar sehr zuverlässig und robust, aber auch aufwendig und langwierig (Plaque-Test > 10 Tage, TCID₅₀ > 7 Tage) oder teuer (FFA) und eignen sich somit kaum zum Screening antiviraler Effekte. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Reportervirus hergestellt werden, welches das firefly-Luciferase-Reportergen trägt. Durch einfache Messung der Luciferasemenge könnten somit Rückschlüsse auf die Virusreplikation gezogen werden.

Die Konstruktion des Reportervirus erfolgte mit Hilfe gerichteter Mutagenese-Strategien. Das gesamte hCMV-Genom liegt dabei als BACmid in *E. coli* vor und kann mittels homologer Rekombination verändert werden. Eine Besonderheit des verwendeten pTNwt-BACmids ist die bereits im BACmid enthaltene EGFP-Kassette, mit deren Hilfe nach Virusrekonstitution die virale Replikation im Fluoreszenzmikroskop anhand grün-fluoreszierender infizierter Zellen beobachtet werden kann. Mittels homologer Rekombination wurde das Luciferase-Reportergen anstelle des für die hCMV-Replikation in Zellkultur nicht benötigten UL21.5-Gens (Yu et al., 2003) in das pTNwt-BACmid eingebracht (siehe 2.6.3). Das UL21.5-

Genprodukt fällt in die Kategorie der E-Gene und wird daher bereits vor dem Einsetzen der viralen Replikation (ca. 24 h p.i.) exprimiert (Boriskin & Butcher, 2001). Somit sollte das integrierte Luciferasegen mit einer ähnlichen Kinetik exprimiert werden und schon früh nach Infektion nachweisbar sein. Um das hCMV-BACmid nur minimal invasiv zu verändern, wurde der nach Selektion nicht mehr benötigte, von FRT-Sequenzen flankierte, Kan-Resistenzmarker durch Expression der Fip-Rekombinase eliminiert; eine Methode, die auch als „back flipping“ bezeichnet wird (siehe 2.6.3 und Abb. 3.1).

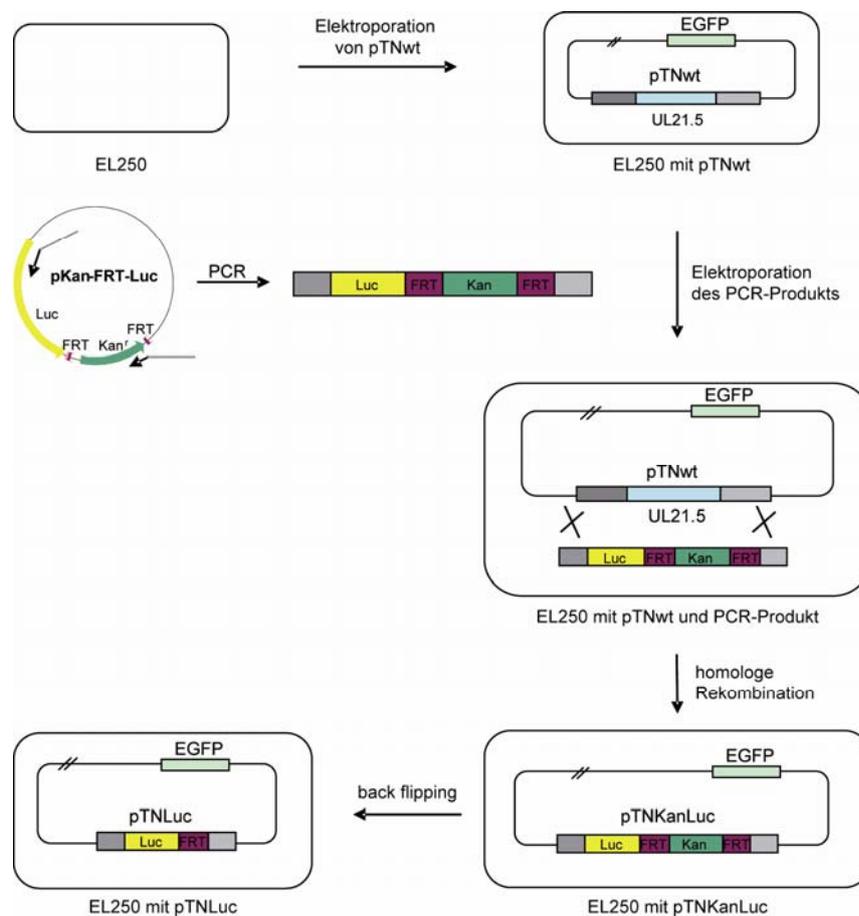


Abb. 3.1 Schematische Darstellung zur Herstellung des pTNLuc-BACmids. Zur Amplifizierung des Luciferase-Reportergens (Luc, gelber Kasten) und des von FRT-Sequenzen (violette Kästen) flankierten Kan-Selektionsmarkergens (Kan, grüner Kasten) wurden Primer verwendet, deren 3'-Enden ca. 50 Bp Homologien zur viralen Zielsequenz aufweisen. Das amplifizierte lineare DNA-Fragment mit den homologen Enden wurde in den E. coli Stamm EL250, welcher das pTNwt-BACmid (kodiert unter anderem auch für eine EGFP-Expressionskassette, hellgrün) sowie alle nötigen Rekombinationsenzyme enthält, elektroporiert. Durch homologe Rekombination wurde das Luciferasegen zusammen mit dem Selektionsmarker Kan in das hCMV-BACmid eingeführt. Durch Expression der Fip-Rekombinase wurde der Selektionsmarker schließlich über die FRT-Sequenzen eliminiert (back flipping).

Durch Transfektion von MRC-5-Zellen mit dem hergestellten pTNLuc-BACmid konnten rekombinante Viruspartikel des dualen Reportervirus TNLuc rekonstituiert werden (siehe 2.8.3).

Um das Replikationsverhalten des rekombinanten Reportervirus genau zu quantifizieren, erfolgte die Überprüfung der Replikationseigenschaften dreier verschiedener Klone mittels einer Multischritt-Wachstumskinetik. Dazu wurden primäre Fibroblasten mit einer MOI von 0,1 PFU/Zelle infiziert und der Virustiter von drei unabhängig generierten TNLuc-Virusklonen bzw. von TNwt alle zwei Tage p.i. aus dem Zellkulturüberstand mit Hilfe der TCID₅₀-Methode bestimmt (siehe 2.8.4). Wie in Abbildung 3.2 A zu sehen ist, zeigten die drei Reportervirusklone TNLuc eine dem Wildtypvirus vergleichbare typische Replikationskinetik mit einer exponentiellen Wachstumsphase (2-6 Tage p.i.), die in eine Plateauphase mündet (ab 6 Tage p.i.). Daraus lässt sich schließen, dass keine Beeinträchtigung der viralen Replikation aufgrund des erfolgten Mutageneseprozesses oder des integrierten Luciferasegens bzw. der UL21.5-Deletion besteht. Weiterhin sollte die Funktionalität des neu generierten TNLuc-Reportervirus überprüft und gleichzeitig der Zusammenhang zwischen Luciferasemenge und infektiösen Viruspartikeln ermittelt werden. Dafür wurden MRC-5-Zellen in 1:5 Verdünnungsschritten mit TNLuc in Triplikaten infiziert. 24 h p.i. erfolgte die Bestimmung der Luciferasemenge durch Messung der relativen Lichteinheiten (RLU) mittels eines kommerziellen Tests (siehe 2.8.5).

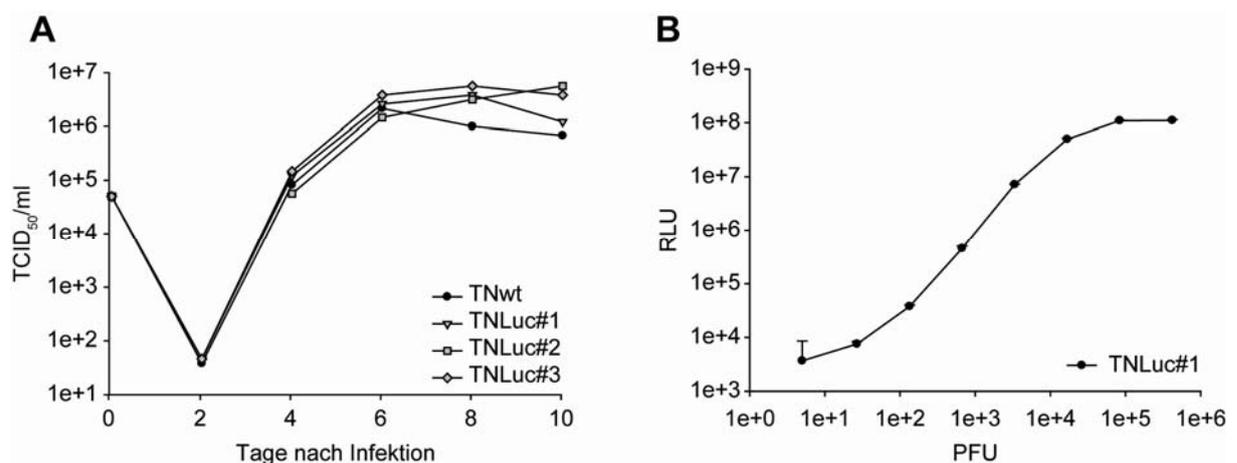


Abb. 3.2 Charakterisierung des TNLuc-Reportervirus. (A) Zur Untersuchung der Replikation des TNLuc-Reportervirus im Vergleich zum Wildtypvirus wurden MRC-5-Zellen mit TNwt bzw. mit drei verschiedenen Klonen TNLuc infiziert (MOI = 0,1 PFU/Zelle) und die Menge an Nachkommenviren mittels TCID₅₀ zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion aus den Zellkulturüberständen bestimmt. (B) Zur Ermittlung der Korrelation zwischen PFU und RLU wurden MRC-5-Zellen mit TNLuc Klon#1 in einer 1:5 Verdünnungsreihe in Triplikaten infiziert und 24 h p.i. die relative Luciferasemenge bestimmt.

In Abbildung 3.2 B ist deutlich zu erkennen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen infektiösen Viruspartikeln (PFU) und RLU nach Infektion mit dem TNLuc-Reportervirus im Bereich von ca. 5×10^4 bis ca. 5×10^7 RLU besteht. Des Weiteren können kleinste Mengen an infektiösen Einheiten (< 100 PFU) zuverlässig nachgewiesen werden. Da das Luciferasegenprodukt mit E-Kinetik exprimiert wird, ist ein Nachweis bereits 24 h nach Infektion möglich, was eine enorme Zeitersparnis im Vergleich zu Standard-Virustiterbestimmungen ermöglicht. Somit kann das in dieser Arbeit hergestellte TNLuc-Reportervirus für das Screening-Verfahren zur Ermittlung antiviraler Effekte verwendet werden. Für weitere Analysen wurde darauf geachtet, dass die Messwerte im linearen Bereich zwischen 5×10^4 und ca. 5×10^7 RLU lagen.

3.1.2 Bestimmung geeigneter Zielgene und siRNA-Sequenzen

Um möglichst wirksame und spezifische antivirale siRNAs zu identifizieren, ist die Wahl geeigneter Zielgene sehr wichtig. Zur Erreichung einer hohen Spezifität ist es sinnvoll siRNAs einzusetzen, die gegen virale und nicht gleichzeitig gegen zelluläre Genprodukte gerichtet sind, da der Knockdown keinen Einfluss auf die Funktionalität der Zelle haben sollte. Als weiteres Kriterium sollten die viralen Zielgenprodukte für eine produktive Virusreplikation in Zellkultur essentiell oder zumindest bedingt notwendig sein. Diese Zielgene sind damit zum einen vermutlich auch für die lytische Replikation im Organismus wichtig und zum anderen ist deren assoziierter Phänotyp in Zellkultur einfach zu bestimmen. Außerdem wurden Vertreter aller drei kinetischer Klassen gewählt, um eine Inhibition während verschiedener Replikationszyklus-Phasen zu ermöglichen. Anhand dieser Kriterien wurden insgesamt 16 virale Zielgene und ein nicht-essentielles Kontrollgen ausgewählt (siehe Tabelle 3.1). Die Vorhersage der siRNA-Sequenzen wurde von der Firma BioDec und die siRNA-Synthese von der Firma IBA übernommen.

Das von der Firma BioDec im Rahmen des Projektes entwickelte siRNA-Sequenz-Vorhersageprogramm „siReNa“ beruht auf einem sich weiterentwickelnden artifiziellen neuronalen Netzwerk. Mit Hilfe umfangreicher experimentell bestätigter Datensets hochwirksamer siRNA-Sequenzen wurde der zugrunde liegende Algorithmus erlernt und optimiert. Um off-target-Effekte zu minimieren, wurden die möglichen siRNA-Sequenzen einem Spezifitätsfilter unterzogen, welcher die siRNA-Sequenz (sense und antisense-Strang) mit jeder bekannten cDNA-Sequenz des humanen Genoms (ENSEMBL Datenbank) und des hCMV-Genoms vergleicht. Zusätzlich wurde ein miRNA-Filter eingebaut, der die siRNA-Sequenz (sense und antisense-Strang) mit jeder annotierten 3'UTR-Sequenz des humanen

Genoms vergleicht. So wurde mit Hilfe von „siReNa“ für jedes virale Zielgen eine Anzahl an potentiell funktionellen und spezifischen siRNA-Sequenzen bestimmt. Davon wurden mindestens zwei siRNA-Sequenzen aufgrund einer vorhergesagten besonders hohen Knockdown-Effizienz ausgewählt, von der Firma IBA synthetisiert und in weiteren Analysen verwendet.

Tabelle 3.1 Übersicht der viralen Zielgene

hCMV-ORF	Klasse	Protein-Produkt	Bedeutung für die hCMV-Replikation	siRNAs*
UL32	L	pp150 Tegument-Protein	Essentiell	2
UL37 (Exon 1)	IE	Mitochondrialer Apoptose-Inhibitor	Bedingt essentiell	2
UL44	E-L	DNA-Polymerase, akzessorische Einheit	Essentiell	2
UL52	L	DNA-Spaltungs-Verpackungs-Protein	Essentiell	2
UL54	E	DNA-Polymerase, katalytische Einheit	Essentiell	2
UL55	E	Glykoprotein B (gB) der Virushülle	Essentiell	2
UL78	E	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	Nicht essentiell (Kontrolle)	2
UL83	E	pp65 Tegument-Protein	Bedingt essentiell	4
UL89 (Exon 1)	E-L	Terminase-Untereinheit	Essentiell	2
UL89 (Exon 2)	E-L	Terminase-Untereinheit	Essentiell	2
UL97	E-L	Serin/Threonin-Kinase	Bedingt essentiell	2
UL99	L	pp28 Tegument-Protein	Essentiell	2
UL104	E	portal-Verpackungs-Protein	Essentiell	2
UL115	L	Glykoprotein L (gL) der Virushülle	Essentiell	2
UL122 (Exon 5)	IE	IE2 Transaktivator	Essentiell	2
UL123 (Exon 4)	IE	IE1 Transaktivator	Bedingt essentiell	2
UL122/123 (Exon 3)	IE	IE1/IE2 Transaktivatoren	Essentiell	2
TRS1/IRS1	IE	Tegument-Proteine	Essentiell	4
IRS1	IE	Tegument-Protein	Bedingt essentiell	2

*Anzahl der getesteten siRNAs

3.1.3 Untersuchung siRNA-abhängiger Effekte auf die Zellstoffwechselaktivität

Zunächst wurden alle eingesetzten siRNAs bezüglich toxischer Effekte auf MRC-5-Zellen getestet, um einen unspezifischen Einfluss auf die Virusreplikation aufgrund verminderter Zellstoffwechselaktivitäten auszuschließen.

Dies erfolgte zwei bzw. fünf Tage p.t. durch Bestimmung der Stoffwechselaktivität (Messung des Redoxpotentials) von siRNA-transfizierten MRC-5-Zellen mittels eines kommerziellen Tests (siehe 2.8.6). Auch nicht transfizierte bzw. nur mit dem Lipid-Reagenz behandelte Zellen wurden als Kontrollen in die Messung mit einbezogen (siehe Abb. 3.3). Die Auswahl der zwei Zeitpunkte entsprach den Bedingungen zur Bestimmung der siRNA-vermittelten Knockdown- und antiviralen Effekte, die zwei und fünf Tage nach Transfektion/Infektion untersucht werden sollten (siehe 3.1.4 und 3.1.5). Da ein Replikationszyklus von hCMV etwa zwei bis drei Tage dauert, wurden diese beiden Zeitpunkte gewählt, um mögliche Unterschiede in den antiviralen Aktivitäten der siRNAs vor und nach der Freisetzung und Verbreitung von Nachkommenviren ermitteln zu können.

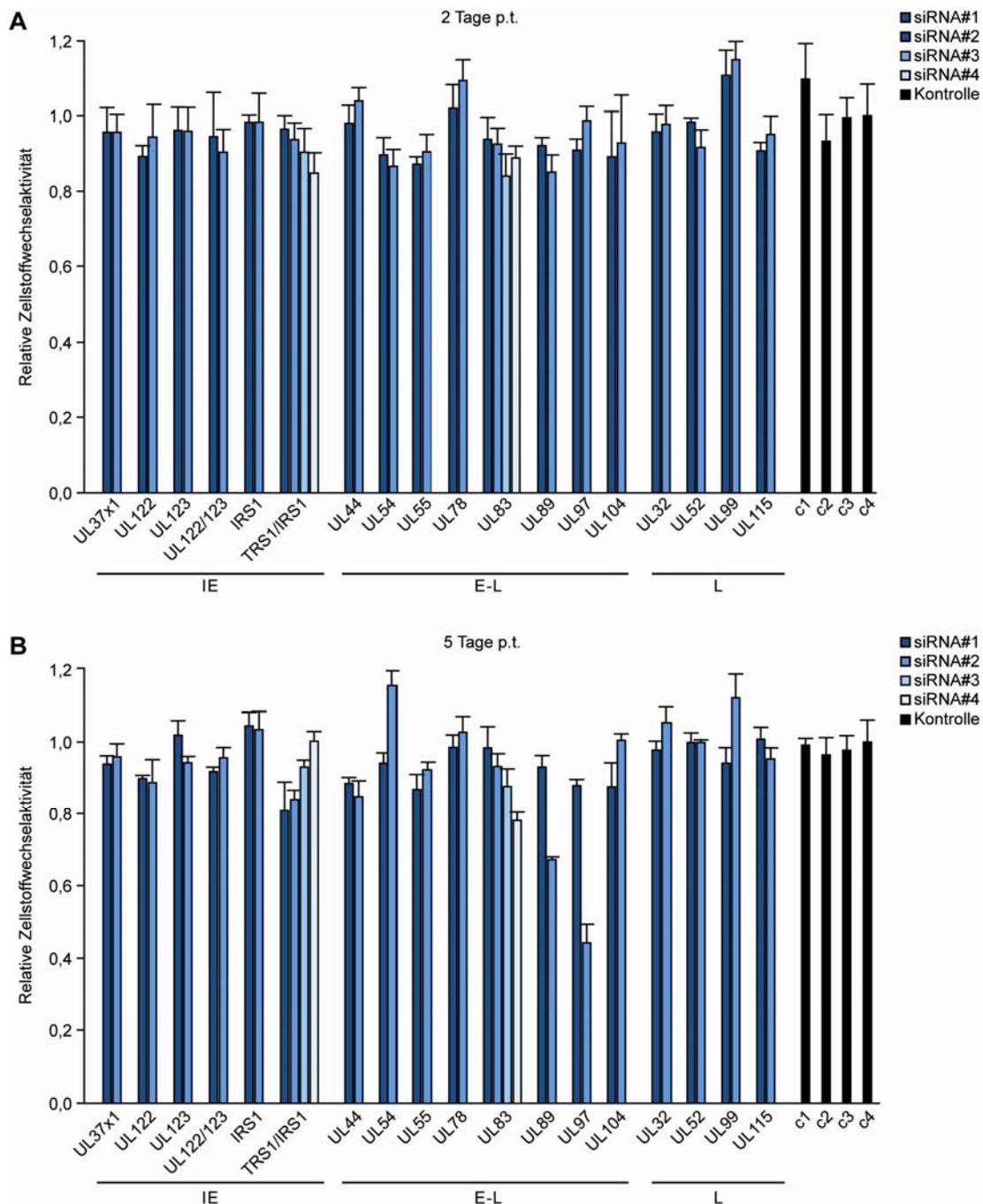


Abb. 3.3 Bestimmung der Zellstoffwechsellaktivität nach siRNA-Transfektion. MRC-5-Zellen wurden mit der jeweiligen siRNA transfiziert, unbehandelt gelassen bzw. nur mit dem Transfektionsreagenz versetzt. Zwei (A) bzw. fünf Tage (B) nach Transfektion wurde die Zellstoffwechsellaktivität mittels eines kommerziellen Tests ermittelt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert mit Standardabweichungen aus vier Ansätzen. Die gemessenen OD-Werte wurden für jede siRNA auf den Messwert der nicht transfizierten Kontrollprobe c4 normiert. Kontrollen: c1 = Transfektionsreagenz, c2 = siKontrolle#1, c3 = siKontrolle#2, c4 = unbehandelte Zellen

Zwei Tage nach siRNA-Transfektion konnte bei keiner der 42 untersuchten siRNAs (40 spezifische siRNAs, 2 Kontroll-siRNAs) eine signifikante Verminderung der Zellstoffwechsellaktivität im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen ermittelt werden. Ebenso übten die Transfektionen der meisten getesteten siRNAs fünf Tage p.t. keinen negativen Einfluss

auf die Zellstoffwechselaktivität aus. Ausnahmen für diesen Zeitpunkt waren die siRNAs UL89#2 und UL97#2, die signifikante toxische Nebeneffekte von ca. 30% bzw. 50% im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen aufwiesen. Die UL97#2 siRNA, die den stärksten toxischen Effekt zeigte, wurde deshalb in den nachfolgenden Analysen nicht verwendet.

Aufgrund dieser Daten sowie der mikroskopischen Analyse der Zellmorphologie (Daten nicht gezeigt) kann ein unspezifischer negativer Einfluss der meisten getesteten siRNAs auf die Zellstoffwechselaktivität innerhalb des gewählten Analyse-Zeitraums weitgehend ausgeschlossen werden. Demzufolge konnten die siRNAs in weitere Versuche eingesetzt werden.

3.1.4 Untersuchung der siRNA-vermittelten Knockdown-Effizienzen

Für einen Teil der siRNAs wurden die Knockdown-Effizienzen auf mRNA-Ebene bestimmt sowie auch auf der biologisch relevanten Proteinebene überprüft, sofern Antikörper gegen die korrespondierenden viralen Zielproteine vorhanden waren. Dies sollte zum einen zur Validierung des siRNA-Vorhersageprogramms „siReNa“ der Firma BioDec beitragen. Zum anderen bieten die Knockdown-Daten die Möglichkeit, eine Korrelation der siRNA-vermittelten antiviralen Effekte (siehe 3.1.5) mit dem spezifischen Knockdown der mRNA bzw. des Proteins herzustellen.

Hierfür wurden siRNA-transfizierte MRC-5-Zellen unter niedrigen MOI-Bedingungen mit TNwt infiziert. Zwei bzw. fünf Tage p.i. wurde entweder die mRNA-Menge der Zielgene in An- und Abwesenheit spezifischer siRNAs mittels q-RT-PCR bestimmt (siehe 2.6.4) oder die Zielproteinmenge mit spezifischen Antikörpern gegen IE1, IE2, ppUL44, pp28, pTRS1 oder pp65 im Western Blot-Verfahren detektiert (siehe 2.7.3). GAPDH diente dabei als Ladekontrolle. Zwei Tage nach siRNA-Transfektion bewegten sich die Knockdown-Effizienzen auf mRNA-Ebene von 0% (UL78#2, TRS1/IRS1#1, #2) bis ca. 80% (UL122#1, UL123#1, UL123#2, UL122/123#1) (siehe Abb. 3.4 A). Ähnliche Knockdown-Effizienzen der siRNAs konnten fünf Tage nach Infektion beobachtet werden, mit Ausnahme der TRS1/IRS1-spezifischen siRNAs, die fünf Tage p.i. höhere Knockdown-Effizienzen von ca. 40% aufwiesen. Die Western Blot-Analysen bestätigten, dass fünf der sechs getesteten UL122- und/oder UL123-spezifischen siRNAs sowohl zwei als auch fünf Tage p.i. einen stark negativen Einfluss auf die Akkumulation der korrespondierenden viralen Proteine ausübten (mehr als 90% Rückgang der Proteinmenge). Kleinere aber doch signifikante Effekte wurden für wenigstens eine von zwei siRNAs gegen UL44, UL83, UL99 und TRS1/IRS1 ermittelt (siehe Abb. 3.5 A und B).

Die Bestimmung der Knockdown-Effizienzen der getesteten siRNAs zeigt, dass die meisten der eingesetzten siRNAs eine Herunterregulierung der Zieltranskript- bzw. Zielproteinmenge vermitteln können, die allerdings unterschiedlich stark ausfällt. Dieses Ergebnis gibt einen ersten Hinweis auf die Qualität des Programms „siReNa“, welches offenbar relativ zuverlässig funktionelle siRNA-Sequenzen vorhersagt.

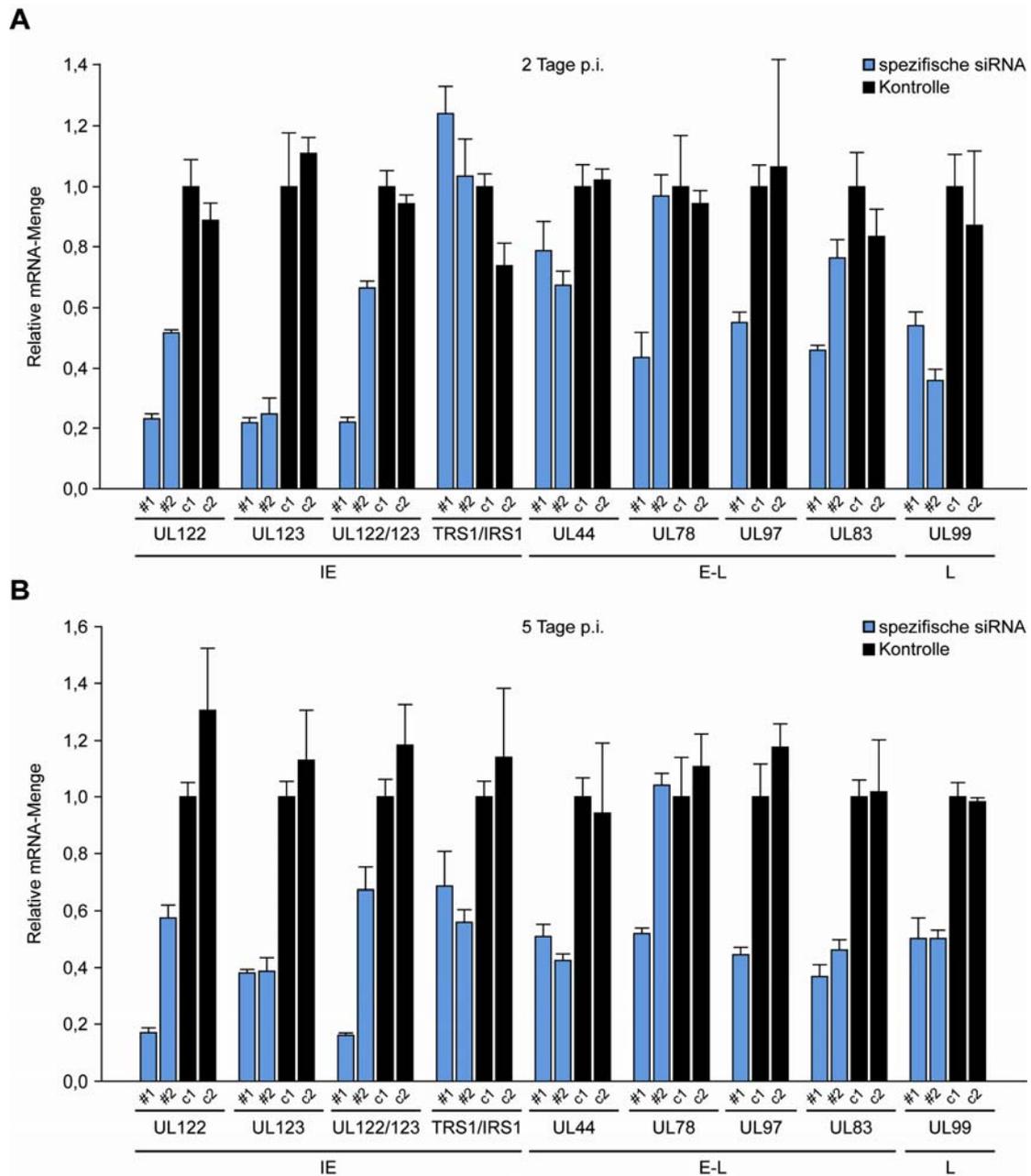


Abb. 3.4 Effekte ausgewählter siRNAs auf die Ziel-mRNA-Menge. MRC-5-Zellen wurden mit der jeweiligen siRNA transfiziert bzw. unbehandelt gelassen und 4 h p.t. mit TNwt infiziert (MOI = 0,03 PFU/Zelle). Zwei (A) bzw. fünf Tage (B) p.i. wurde Gesamt-RNA isoliert. Mittels q-RT-PCR mit den jeweils spezifischen Primern, die in Duplikaten (technische Replikate) durchgeführt wurde, wurde die relative mRNA-Menge aus zwei unabhängigen Ansätzen (biologische Replikate) bestimmt. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichungen normiert auf Tubulin und im Vergleich zu unbehandelten Zellen. #1, #2 = spezifische siRNA, c1 = unbehandelte Zellen, c2 = siKontrolle#2

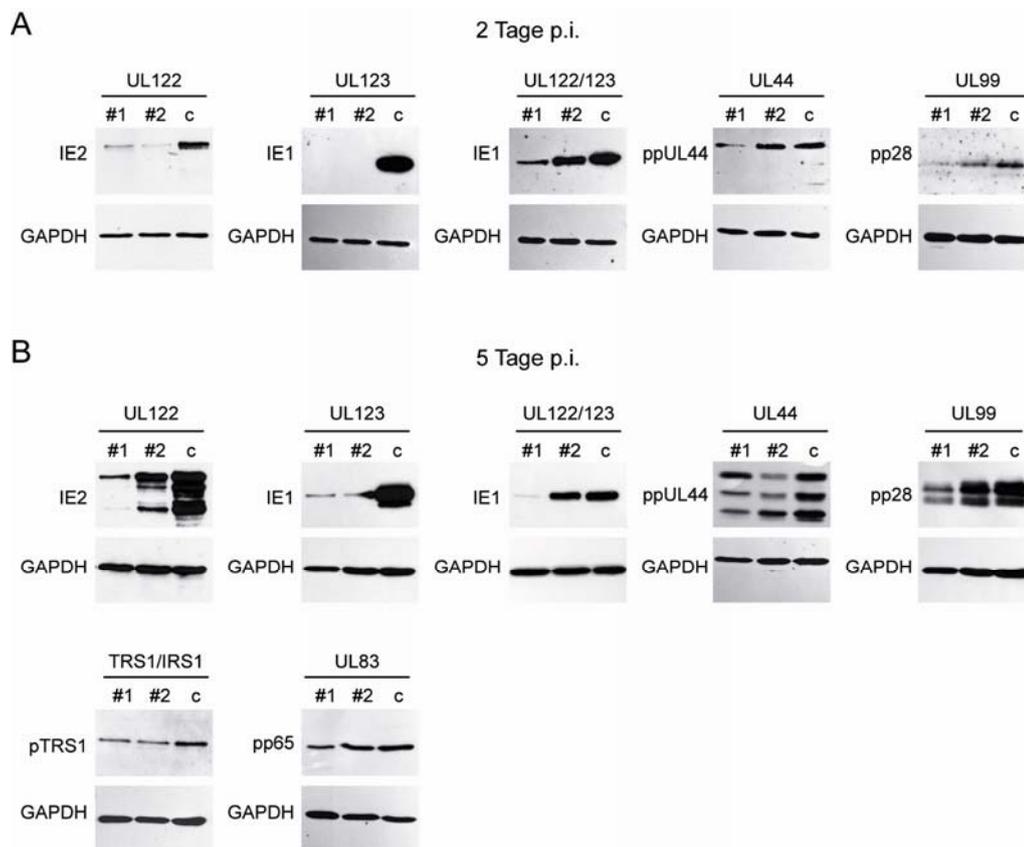


Abb. 3.5 Effekte ausgewählter siRNAs auf die Zielproteinmenge. MRC-5-Zellen wurden mit der jeweiligen siRNA transfiziert, 4 h p.t. mit TNwt infiziert (MOI = 0,03 PFU/Zelle, Ausnahme: UL122 Tag zwei, MOI = 0,1 PFU/Zelle), nach zwei (A) bzw. fünf Tagen (B) p.i. zu Gesamtzellextrakten verarbeitet und im Western Blot-Verfahren mit den jeweils angegebenen Antikörpern analysiert. pTRS1 und pp65 konnten unter den gewählten Bedingungen erst nach fünf Tagen nachgewiesen werden. #1, #2 = spezifische siRNAs, c = siKontrolle#2

3.1.5 Bestimmung von siRNA-vermittelten antiviralen Effekten

Um siRNA-vermittelte antivirale Effekte auf die hCMV-Replikation zu untersuchen, wurde das in dieser Arbeit hergestellte duale Reportervirus TNLuc verwendet. Hierfür wurden siRNA-transfizierte MRC-5-Zellen unter niedrigen MOI-Bedingungen mit TNLuc infiziert und die Luciferasemenge durch Messung der RLU mittels eines kommerziellen Tests zwei und fünf Tage p.i. bestimmt. Nach zwei Tagen wurde die Luciferasemenge direkt in den infizierten Zellen gemessen. Fünf Tage p.i. hingegen wurde der virushaltige Zellkulturüberstand abgenommen, um mit diesem konfluente MRC-5-Zellen erneut zu infizieren. Nach weiteren 24 h erfolgte schließlich die Messung der Luciferasemenge in den frisch infizierten Zellen (siehe 2.8.3 und 2.8.5).

Viele der getesteten siRNAs zeigten sowohl zwei als auch fünf Tage p.i. im Vergleich zu Kontrolltransfektionen nur moderate inhibitorische Effekte auf die hCMV-Replikation (siehe Abb. 3.6 A und B). Dennoch konnte ein kleiner Teil der siRNAs die Virusreplikation sehr effizient unterdrücken.

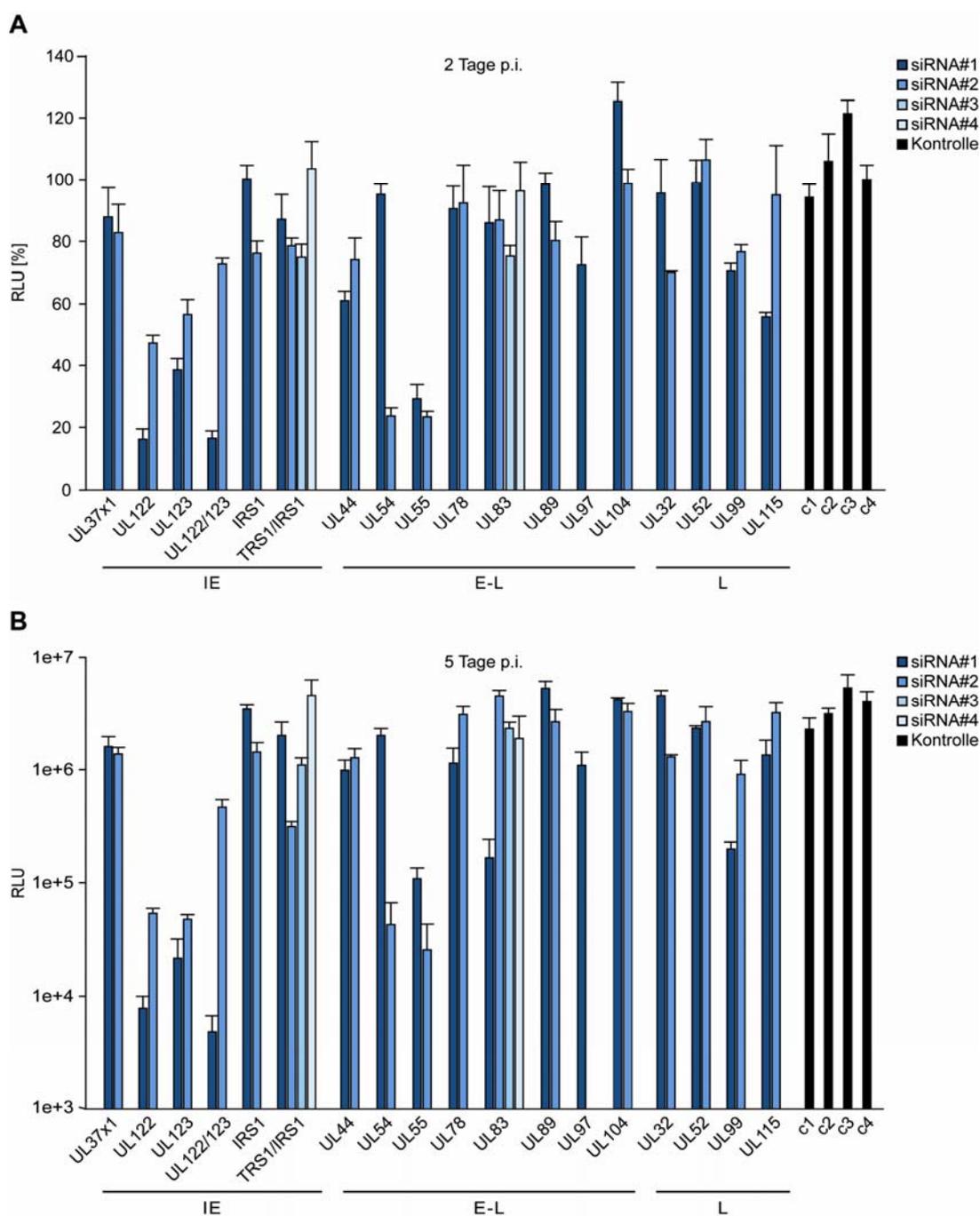


Abb. 3.6 Antivirale Effekte der siRNAs. MRC-5-Zellen wurden mit den jeweiligen siRNAs transfiziert, unbehandelt gelassen bzw. nur mit dem Transfektionsreagenz versetzt und 4 h p.t. mit dem TNLuc-Reportervirus infiziert (MOI = 0,03 PFU/Zelle). Nach zwei (A) bzw. fünf Tagen (B) p.i. wurde die relative Luciferasemenge bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei biologischen (A) bzw. zwei biologischen und zwei technischen Replikaten (B). Die Mittelwerte in (A) sind jeweils auf den Mittelwert unbehandelter Zellen normiert. Kontrollen: c1 = Transfektionsreagenz, c2 = siKontrolle#1, c3 = siKontrolle#2, c4 = unbehandelte Zellen

Die siRNAs mit den stärksten antiviralen Effekten waren gegen die MIE-Proteine IE1 und/oder IE2 gerichtet (UL122/UL123) und konnten das Viruswachstum nach zwei Tagen um mehr als 80% und nach fünf Tagen um mehr als 99,9% (fast 1000-fach) vermindern (siehe Tabelle 3.2 und Abb. 3.6 A und B). Die Ergebnisse korrelieren mit den betreffenden

Knockdown-Effizienzen (siehe Abb. 3.4 und 3.5). Eine siRNA, die gegen die virale DNA-Polymerase (UL54) gerichtet ist und zwei weitere siRNAs, die gegen das Hüllprotein gB (UL55) gerichtet sind, zeigten sowohl zwei als auch fünf Tage p.i. beachtliche antivirale Aktivitäten (ca. 70% - 99%) in Relation zu den Kontrollen. Des Weiteren korrelieren die eher moderaten Knockdown-Effizienzen der UL44-, UL99-, TRS1/IRS1- und UL83-Genprodukte (siehe Abb. 3.4 und 3.5) mit den dazugehörigen antiviralen Effekten die zwischen weniger als zweifach bis zu ungefähr 20-fach (95%) lagen (siehe Tabelle 3.2). Die siRNA-vermittelten antiviralen Effekte wurden zusätzlich anhand der EGFP-Expression des dualen Reportervirus TNLuc mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert (Daten nicht gezeigt) und bestätigten die Luciferasemessdaten.

Mit Hilfe des dualen TNLuc-Reportervirus konnte also ein Screening-Verfahren zur schnellen und zuverlässigen Bestimmung antiviraler Effekte etabliert werden, was zur Identifizierung von acht vielversprechenden siRNAs (UL122#1, UL122#2, UL123#1, UL123#2, UL122/123#1, UL54#2, UL55#1 und UL55#2) mit großem antiviralem Potential führte. Der Vergleich der Knockdown-Effizienzen mit den antiviralen Effekten der siRNAs sowie die Cytotoxizitätsdaten (siehe Abb. 3.3) lassen eine hohe Spezifität der siRNA-vermittelten antiviralen Aktivitäten vermuten.

Tabelle 3.2 Übersicht der viralen Zielgene und antiviralen Effekte der korrespondierenden siRNAs

hCMV ORF	Klasse	Protein-Produkt	siRNAs*	Antivirale Aktivität#
UL32	L	pp150 Tegument-Protein	2	67.9%
UL37 (Exon 1)	IE	Mitochondrialer Apoptose-Inhibitor	2	66.1%
UL44	E-L	DNA-Polymerase, akzessorische Einheit	2	75.6%
UL52	L	DNA-Spaltungs-Verpackungs-Protein	2	42.4%
UL54	E	DNA-Polymerase, katalytische Einheit	2	98.9%
UL55	E	Glykoprotein B (gB) der Virushülle	2	99.4%
UL78	E	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	2	71.8%
UL83	E	pp65 Tegument-Protein	4	95.1%
UL89	E-L	Terminase-Untereinheit	2	34.4%
UL97	E-L	Terminase-Untereinheit	2	73.0%
UL99	L	Serin/Threonin-Kinase	2	95.9%
UL104	E	pp28 Tegument-Protein	2	19.4%
UL115	L	portal-Verpackungs-Protein	2	66.7%
UL122 (Exon 5)	IE	Glykoprotein L (gL) der Virushülle	2	99.9%
UL123 (Exon 4)	IE	IE2 Transaktivator	2	99.8%
UL122/123 (Exon 3)	IE	IE1 Transaktivator	2	99.5%
TRS1/IRS1	IE	IE1/IE2 Transaktivatoren	4	92.2%
IRS1	IE	Tegument-Proteine	2	64.7%

* Anzahl der getesteten siRNAs, # maximale antivirale Aktivität, die mit einer der untersuchten siRNAs erreicht wurde.

3.2 Optimierung IE1- und IE2-spezifischer siRNAs im Hinblick auf eine therapeutische Nutzung

Unter den insgesamt 40 getesteten siRNAs zeigten diejenigen, welche gegen IE1 (UL123) und/oder IE2 (UL122) gerichtet sind, die stärksten antiviralen Effekte (siehe Tabelle 3.2). Außerdem bieten diese viralen Genprodukte neue alternative Angriffsstellen für die hCMV-Therapie. Im Folgenden wurden deshalb IE1- und IE2-spezifische siRNAs im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Nutzung optimiert.

3.2.1 IE1- und IE2-spezifische siRNAs mit konservierten Zielsequenzen

Um die IE1/IE2-spezifischen siRNAs in Richtung einer Verwendung im Patienten zu optimieren, ist es entscheidend evolutionär konservierte Zielsequenzen auszuwählen. Diese sollten innerhalb aller oder zumindest der meisten hCMV-Stämme, die in der humanen Population vorkommen, vertreten sein. Aufgrund der hohen Sequenzspezifität des RNAi-Mechanismus kann nur so eine breite Anwendung gewährleistet werden. Deshalb wurde ein Mehrfach-Sequenz-Alignment des MIE-Transkripts aller zwölf annotierten hCMV-Stämme mit Hilfe des Programms ClustalW vorgenommen (siehe Abb. 3.7 A). Basierend auf diesem Sequenz-Alignment wurden zunächst die bereits getesteten siRNAs auf konservierte Zielsequenzen untersucht. Die Zielsequenz der siRNA UL122#1 ist in allen zwölf Stämmen konserviert, während die Zielsequenzen der siRNAs UL123#1 und U122/123#1 in immerhin elf von zwölf hCMV-Stämmen identisch sind. Diese antiviral sehr effektiven siRNAs wurden deshalb auch in die nachfolgenden Analysen mit einbezogen.

Zusätzlich wurden mit dem Programm „siReNa“ weitere IE1- und IE2-spezifische siRNA-Sequenzen bestimmt, deren Zielsequenzen in allen zwölf annotierten hCMV-Stämmen konserviert sind. Aus den vorhergesagten Sequenzen wurden zehn siRNAs aufgrund einer durch „siReNa“ berechneten hohen Knockdown-Effizienz ausgewählt, synthetisiert und auf antivirale Eigenschaften getestet.

Dafür wurden siRNA-transfizierte MRC-5-Zellen unter niedrigen MOI-Bedingungen mit TNLuc infiziert. Da in der vorhergehenden Analyse (siehe Abb. 3.6) zwischen den zwei gewählten Zeitpunkten keine nennenswerten Unterschiede aufgetreten waren, erfolgte die Bestimmung antiviraler Aktivitäten in den weiteren Analysen nur zu einem Zeitpunkt. Nach sechs Tagen p.i. wurde die Quantifizierung der Virusreplikation durch Bestimmung der Luciferasemenge (siehe 2.8.5) ermittelt. Die meisten der neuen siRNAs zeigten im Vergleich zu Kontrolltransfektionen nur moderate Effekte auf die Virusreplikation, dennoch konnten zwei weitere siRNAs (UL122#8 und UL123#4) mit konservierten Zielsequenzen und

bemerkenswerten antiviralen Aktivitäten zwischen 100- und über 1000-fach ($> 99,9\%$) identifiziert werden (siehe Abb. 3.7 B).

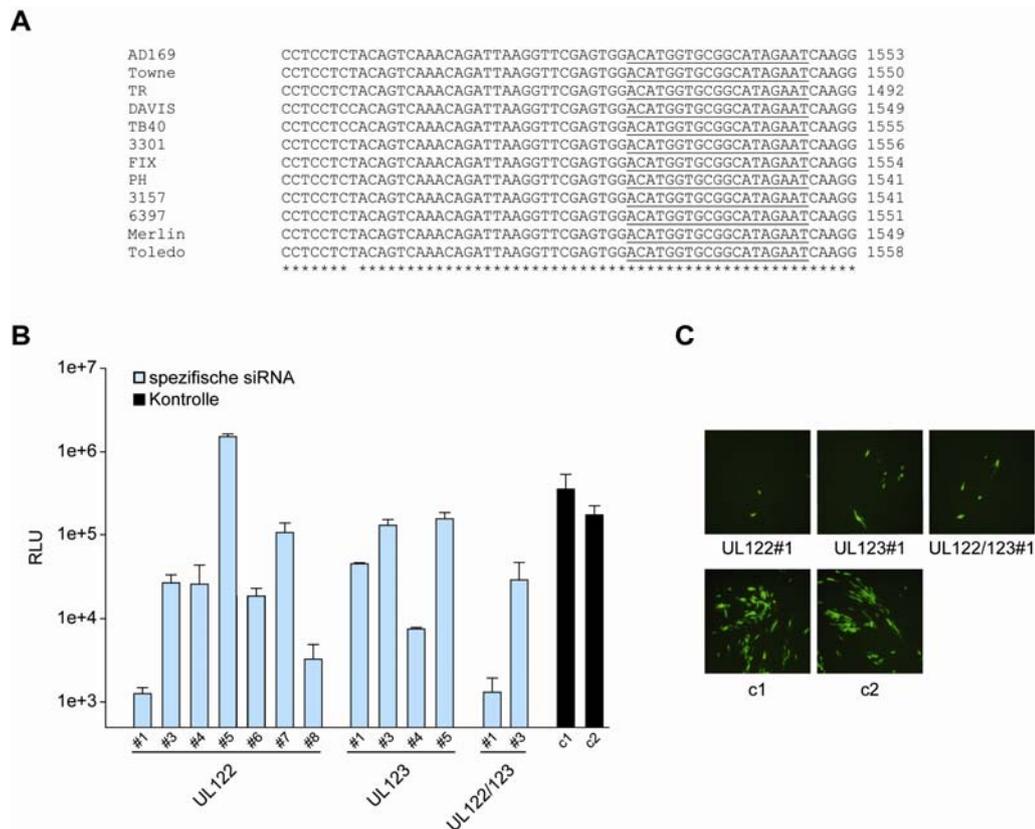


Abb. 3.7 Antivirale Effekte von siRNAs mit konservierten Zielsequenzen, die gegen die MIE-Genprodukte IE1, IE2 bzw. IE1/IE2 gerichtet sind. (A) Beispiel einer vorhergesagten IE2-Zielsequenz (unterstrichen), die in zwölf hCMV-Stämmen konserviert ist. Sterne repräsentieren identische Nukleotide. (B) MRC-5-Zellen wurden mit den jeweiligen siRNAs transfiziert bzw. unbehandelt belassen, 4 h p.t. mit dem TNLuc-Reportervirus infiziert (MOI = 0,03 PFU/Zelle). Sechs Tage p.i. erfolgte die Bestimmung der Luciferasemenge. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten. (C) MRC-5-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert bzw. unbehandelt belassen und 4 h p.t. mit dem klinisch relevanten und Ganciclovir- und Cidofovir-resistenten hCMV-Isolat TRwt infiziert (MOI = 0,1 PFU/Zelle). Die Zellen wurden sieben Tage p.i. im inversen Fluoreszenzmikroskop photographiert, wobei die Bilder einen jeweils repräsentativen 25-fach vergrößerten Ausschnitt des Zellrasens zeigen. #1 – #8 = spezifische siRNAs, c1 = siKontrolle#2, c2 = unbehandelte Zellen

Bisher wurden die siRNA-vermittelten antiviralen Effekte mit Hilfe des dualen TNLuc-Reportervirus bestimmt, welches aus dem laboradaptierten hCMV-TN-Stamm hervorgegangen ist. Im Hinblick auf eine therapeutische Nutzung der siRNAs ist es wichtig, den antiviralen Effekt auch an klinisch relevanten primären hCMV-Isolaten zu bestätigen. Zudem wäre es erstrebenswert, wenn die siRNAs auch gegen bisher nicht therapierbare hCMV-Stämme, die bereits Resistenzen gegen Wirkstoffe wie z.B. Ganciclovir tragen, zum Einsatz kommen könnten. Aus diesen Gründen erfolgte die Bestimmung antiviraler Effekte für einen Teil der IE1- und IE2-spezifischen siRNAs (mit konservierten Zielsequenzen) mit dem klinisch relevanten und multiresistenten Stamm TRwt, der aufgrund von Mutationen der

viralen DNA-Polymerase (UL54) und der viralen Serin/Threonin-Kinase (UL97) Resistenzen gegenüber Ganciclovir und Cidofovir aufweist (Alain et al., 1997). Des Weiteren trägt das aus einem BACmid rekonstituierte TR-Virus eine EGFP-Expressionskassette, was die Analyse der viralen Replikation mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht.

Nach Transfektion von MRC-5-Zellen mit IE1/IE2-spezifischen- bzw. Kontroll-siRNAs wurden die Zellen unter niedrigen MOI-Bedingungen mit dem hCMV-TR-Isolat infiziert und das Replikationsverhalten in Form von Fluoreszenzaufnahmen sieben Tage p.i. dokumentiert (siehe Abb. 3.7 C). Wie man anhand der Aufnahmen sehen kann, ist das Viruswachstum in Zellen mit IE1- und IE2-spezifischen siRNAs wie erwartet im Vergleich zu Kontrollzellen sehr stark attenuiert. Die hohe Effizienz, mit der die Replikation auch klinischer und arzneimittelresistenter hCMV-Isolate unterdrückt werden kann, unterstreicht das therapeutische Potential IE1/IE2-spezifischer siRNAs.

3.2.2 Wirkungsdauer der IE2-spezifischen siRNA UL122#1

Zur weiteren Entwicklung IE1/IE2-spezifischer siRNAs in Richtung therapeutischer Nutzung wurde in einer Langzeitanalyse die Wirkungsdauer der hocheffizienten IE2-spezifischen siRNA UL122#1 mit konservierter Zielsequenz bestimmt. Hierfür sollte die Quantifizierung der Virusreplikation durch Bestimmung infektiöser Nachkommenviren mittels klassischer Titrationsmethodik ermittelt werden. Dies ermöglichte auch den Vergleich mit bereits vorhandenen Luciferasedaten des TNLuc-Reportervirus.

Die Replikation des hCMV-Towne-Stamms wurde in MRC-5-Zellen analysiert, die entweder mit einer Kontroll-siRNA oder mit der IE2-spezifischen siRNA UL122#1 transfiziert wurden. Die Produktion infektiöser Nachkommenviren wurde für insgesamt 18 Tage mittels TCID₅₀ bestimmt (siehe 2.8.4).

Wie erwartet war das Viruswachstum in Zellen, die mit der IE2-spezifischen siRNA transfiziert wurden im Vergleich zu den Kontrollzellen stark reduziert und verzögert. Es ist beachtlich, dass sechs Tage p.i. der IE2-spezifische Knockdown die Produktion von Nachkommenviren extrem effizient um fast fünf log-Stufen verringerte. Die Nachkommenvirenproduktion setzte dennoch sieben Tage p.i. ein und auch die maximalen Virustiter waren in Zellen mit oder ohne IE2-spezifischer siRNA vergleichbar. Dieses Ergebnis zeigt die sehr effiziente aber auch transiente Natur der siRNA-vermittelten RNAi. Des Weiteren sind die UL122#1-vermittelten antiviralen Effekte, die mit Hilfe des TNLuc-Reportervirus durch Messung der Luciferasemenge bestimmt wurden (siehe Abb. 3.6 und 3.7), in ihrer Stärke vergleichbar mit denen nach klassischer Virustiterbestimmung (siehe Abb. 3.8). Diese

Beobachtung bestätigt die Zuverlässigkeit des in dieser Arbeit etablierten Screening-Verfahrens für anti-hCMV Effekte.

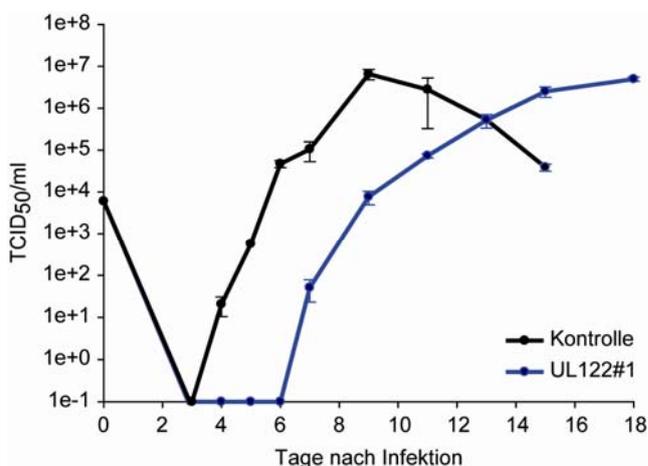


Abb. 3.8 Langzeitanalyse des Einflusses der IE2-spezifischen siRNA UL122#1 auf die Produktion infektiöser hCMV-Partikel. MRC-5-Zellen wurden mit der siRNA UL122#1 bzw. der siKontrolle#2 transfiziert und 4 h p.t. mit TNwt (MOI = 0,03 PFU/Zelle) infiziert. Die Produktion infektiöser Partikel in den Zellkulturüberständen wurde insgesamt über 18 Tage mittels TCID₅₀ zu den angegebenen Zeitpunkten ermittelt. Das dargestellte Diagramm zeigt Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten.

3.2.3 Chemisch-modifizierte IE1- und IE2-spezifische siRNAs

Die bisher getesteten siRNAs waren chemisch unmodifiziert. Während unmodifizierte siRNAs die natürlichen Effektor-Moleküle der RNAi sind, ist die experimentelle oder therapeutische Nutzung unmodifizierter siRNAs im Organismus mit einigen Problemen behaftet (siehe 1.2). Mit Hilfe chemischer Modifikationen, die positiven Einfluss auf Stabilität, Spezifität, Wirksamkeit oder zelluläre Aufnahme der siRNAs nehmen, können diese Probleme angegangen werden. Für 2'-O-Methyl-Gruppen wurde gezeigt, dass diese die Stabilität der siRNA erhöhen. Bei einem Einbau in die Seed-Region des antisense-Strangs können 2'-O-Methyl-Gruppen zudem mögliche off-target-Effekte verringern (Kurreck, 2009; Watts et al., 2008). Der positive Einfluss einer Cholesterin-Modifikation auf die zelluläre Aufnahme der siRNA wurde schon vielfach experimentell bestätigt (Schroeder et al., 2010; Tiemann & Rossi, 2009). Dabei besteht die Möglichkeit eine Cholesterin-Modifikation an einem der beiden Enden des sense-Strangs einzuführen.

Um den Einfluss chemischer Modifikationen auf die antiviralen Effizienzen hCMV-gerichteter siRNAs exemplarisch zu testen, wurden zwei 2'-O-Methyl-Gruppen in die Seed-Region des antisense-Strangs und gesondert davon eine 5'-Cholesterin-Einheit in den sense-Strang der IE1/IE2-spezifischen siRNAs mit den größten antiviralen Aktivitäten und hochkonservierten Zielsequenzen (UL123#4, UL122#1 und UL122/123#1) eingebracht (siehe Abb. 3.9 A). Die siRNA-Synthese erfolgte wieder durch die Firma IBA. Die modifizierten siRNAs sollten mit den zugehörigen unmodifizierten siRNAs bezüglich inhibitorischer Effekte auf die hCMV-Replikation verglichen werden. Dafür wurden siRNA-transfizierte

MRC-5-Zellen unter niedrigen MOI-Bedingungen mit dem TNLuc-Reportervirus infiziert. Acht Tage p.i. erfolgte die Bestimmung der Luciferasemenge (siehe Abb. 3.9 B und Tabelle 3.3) bzw. die Dokumentation des viralen Replikationsverhaltens in Form von Fluoreszenzaufnahmen (siehe Abb. 3.9 C).

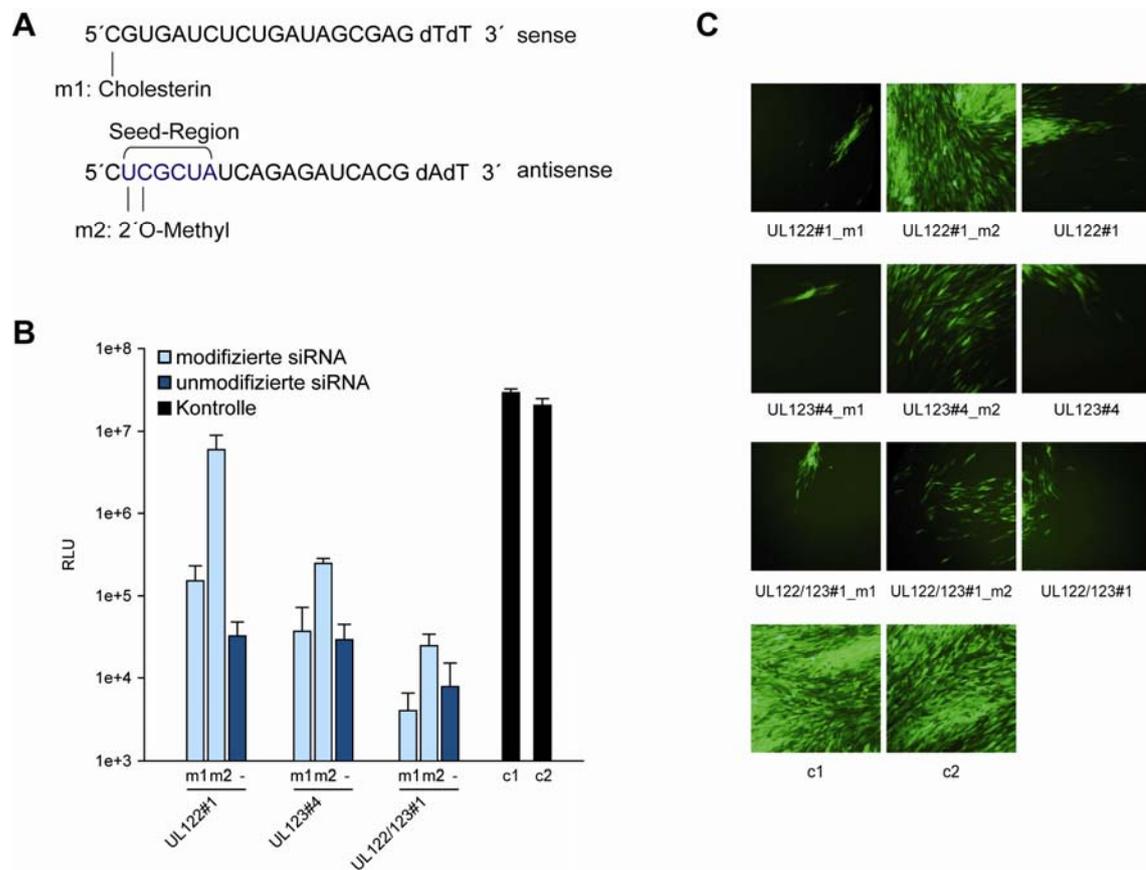


Abb. 3.9 Antivirale Effekte chemisch-modifizierter siRNAs, welche gegen die MIE-Genprodukte IE1, IE2 bzw. IE1/IE2 gerichtet sind. (A) Überblick der chemischen Modifikationen, welche in die IE1/IE2-spezifischen siRNAs eingeführt wurden. (B, C) MRC-5-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs in Duplikaten transfiziert und 4 h p.t. mit TNLuc infiziert (MOI = 0,01 PFU/Zelle). Acht Tage p.i. erfolgte die Bestimmung der Luciferasemenge (A) bzw. die Fluoreszenzanalyse (B), wobei die Bilder einen jeweils repräsentativen, 25-fach vergrößerten Ausschnitt des Zellrasens zeigen. m1 = Cholesterin-Modifikation, m2 = 2'O-Methyl-Modifikation, c1 = unbehandelte Zellen, c2 = siKontrolle#2

Die Ergebnisse zeigen, dass die 2'O-Methyl-Gruppen die antiviralen Aktivitäten aller drei getesteten siRNAs im Vergleich zur nicht modifizierten Form merklich verringerten, während eine Cholesterin-Modifikation keinen nennenswerten Einfluss zeigte (siehe Abb. 3.9 B und C). Chemische Modifikationen in virostatische siRNAs einzubringen ist also generell möglich, um das Profil für Anwendungen im Organismus zu verbessern. Es scheint jedoch nötig, jede Modifikation oder auch verschiedene Kombinationen von Modifikationen zunächst in Zellkultur zu testen, um sicherzugehen, dass die Knockdown-Effizienzen der korrespondierenden siRNAs nicht negativ beeinflusst werden.

Tabelle 3.3 Zusammenfassende Übersicht zu den Aktivitäten aller in dieser Arbeit untersuchten hCMV-spezifischen siRNAs

Klasse	siRNA	2 Tage nach Transfektion / Infektion				5 Tage nach Transfektion / Infektion				Nr *
		Zell-Vitalität %	Knockdown %		Antivirale Aktivität %	Zell-Vitalität %	Knockdown %		Antivirale Aktivität %	
			mRNA	Protein			mRNA	Protein		
IE	siUL37x1#1	96 +/- 6	n/b	n/b	12 +/- 9	94 +/- 2	n/b	n/b	60.4 +/- 8.8	82
	siUL37x#2	96 +/- 5	n/b	n/b	17 +/- 9	96 +/- 4	n/b	n/b	66.1 +/- 4.8	83
	siUL122#1	89 +/- 3	77 +/- 2	70	84 +/- 3	90 +/- 1	83 +/- 2	59*	99.8 +/- 0.1	14
	siUL122#2	94 +/- 9	48 +/- 1	92	53 +/- 3	89 +/- 6	43 +/- 5	23*	98.7 +/- 0.1	15
	siUL122#3	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	84.4 +/- 3.8†	134
	siUL122#4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	84.9 +/- 10.2†	135
	siUL122#5	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	+/- 0‡	136
	siUL122#6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	89.2 +/- 2.6†	137
	siUL122#7	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	38.4 +/- 18.5†	138
	siUL122#8	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	98.1 +/- 0.9†	155
	siUL122#1_m1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	99.3 +/- 0.4‡	156
	siUL122#1_m2	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	71.2 +/- 14.9‡	139
	siUL123#1	96 +/- 6	79 +/- 2	97	61 +/- 4	102 +/- 4	66 +/- 1	86	99.5 +/- 0.3	16
	siUL123#2	96 +/- 6	75 +/- 5	99	43 +/- 5	94 +/- 2	66 +/- 4	63	98.8 +/- 0.1	17
	siUL123#3	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	24.8 +/- 12.8†	131
	siUL123#4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	99.8 +/- 0.2‡	132
	siUL123#5	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	10.6 +/- 17.1†	153
	siUL123#4_m1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	99.8 +/- 0.2‡	154
	siUL123#4_m2	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	98.8 +/- 0.2‡	133
	siUL122/123#1	94 +/- 12	78 +/- 2	63	83 +/- 2	92 +/- 1	84 +/- 0	97	99.9 +/- 0.1	70
siUL122/123#2	90 +/- 6	34 +/- 2	23	27 +/- 4	96 +/- 3	33 +/- 8	22	88.4 +/- 1.9	71	
siUL122/123#3	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	83.2 +/- 10.4†	157	
siUL122/123#1_m1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	99.9 +/- 0.1‡	158	
siUL122/123#1_m2	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	99.9 +/- 0.1‡	130	
siIRS1#1	98 +/- 2	n/b	n/b	+/- 0	104 +/- 4	n/b	n/b	14.7 +/- 7.4	86	
siIRS1#2	98 +/- 8	n/b	n/b	24 +/- 4	103 +/- 5	n/b	n/b	64.7 +/- 7.7	87	
siTRS1/IRS1#1	96 +/- 4	+/- 0	u/N	13 +/- 8	81 +/- 8	32 +/- 12	60	50.5 +/- 15.7	64	
siTRS1/IRS1#2	94 +/- 4	+/- 0	u/N	21 +/- 3	84 +/- 3	44 +/- 5	50	92.2 +/- 0.8	65	
siTRS1/IRS1#3	90 +/- 6	n/b	n/b	25 +/- 4	93 +/- 2	n/b	n/b	72.8 +/- 10.1	88	
siTRS1/IRS1#4	85 +/- 5	n/b	n/b	+/- 0	100 +/- 3	n/b	n/b	+/- 0	89	
E-L	siUL44#1	98 +/- 5	21 +/- 10	56	39 +/- 3	82 +/- 1	49 +/- 4	31	75.6 +/- 5.6	18
	siUL44#2	104 +/- 4	33 +/- 5	51	26 +/- 7	85 +/- 5	58 +/- 2	44	68.5 +/- 6.4	19
	siUL54#1	90 +/- 5	n/b	n/b	5 +/- 3	94 +/- 3	n/b	n/b	50.4 +/- 7.5	97
	siUL54#2	87 +/- 4	n/b	n/b	76 +/- 3	116 +/- 5	n/b	n/b	98.9 +/- 0.6	99
	siUL55#1	87 +/- 2	n/b	n/b	71 +/- 5	87 +/- 4	n/b	n/b	97.3 +/- 0.7	94
	siUL55#2	90 +/- 5	n/b	n/b	77 +/- 2	92 +/- 2	n/b	n/b	99.4 +/- 0.4	95
	siUL78#1	102 +/- 6	56 +/- 8	n/b	9 +/- 7	99 +/- 3	53 +/- 2	n/b	71.8 +/- 10.1	20
	siUL78#2	109 +/- 6	+/- 0	n/b	7 +/- 12	103 +/- 4	+/- 0	n/b	23.7 +/- 13.3	21
	siUL83#1	94 +/- 6	54 +/- 2	u/N	14 +/- 11	98 +/- 6	63 +/- 4	42	95.1 +/- 0.8	74
	siUL83#2	92 +/- 4	24 +/- 6	u/N	13 +/- 9	93 +/- 4	54 +/- 4	8	77.5 +/- 7.3	75
	siUL83#3	84 +/- 6	n/b	n/b	25 +/- 3	88 +/- 5	n/b	n/b	42.7 +/- 7.5	92
	siUL83#4	89 +/- 3	n/b	n/b	4 +/- 9	78 +/- 2	n/b	n/b	53.4 +/- 26.9	93
	siUL89#1	92 +/- 2	n/b	n/b	+/- 0	93 +/- 3	n/b	n/b	+/- 0	78
	siUL89#2	85 +/- 5	n/b	n/b	20 +/- 6	67 +/- 1	n/b	n/b	34.4 +/- 18.6	79
	siUL97#1	91 +/- 3	50 +/- 3	n/b	28 +/- 9	88 +/- 2	55 +/- 3	n/b	73.0 +/- 8.2	66
	siUL97#2	99 +/- 4	n/b	n/b	28 +/- 4	44 +/- 5	n/b	n/b	n/b	67
	siUL104#1	89 +/- 12	n/b	n/b	+/- 0	88 +/- 7	n/b	n/b	+/- 0	90
	siUL104#2	93 +/- 13	n/b	n/b	+/- 0	100 +/- 2	n/b	n/b	19.4 +/- 14.6	97
	siUL32#1	96 +/- 5	n/b	n/b	4 +/- 11	98 +/- 3	n/b	n/b	+/- 0	80
	siUL32#2	98 +/- 5	n/b	n/b	30 +/- 1	105 +/- 4	n/b	n/b	67.9 +/- 1.3	81
siUL52#1	98 +/- 1	n/b	n/b	+/- 0	100 +/- 3	n/b	n/b	42.4 +/- 3.0	84	
siUL52#2	92 +/- 5	n/b	n/b	+/- 0	100 +/- 1	n/b	n/b	34.4 +/- 23.6	85	
siUL99#1	111 +/- 7	46 +/- 5	70	30 +/- 2	94 +/- 4	50 +/- 7	55	95.9 +/- 1.9	22	
siUL99#2	120 +/- 5	64 +/- 4	23	23 +/- 2	112 +/- 9	50 +/- 3	8	77.5 +/- 7.3	23	
siUL115#1	91 +/- 2	n/b	n/b	44 +/- 1	101 +/- 3	n/b	n/b	66.7 +/- 11.7	96	
siUL115#2	95 +/- 5	n/b	n/b	5 +/- 16	95 +/- 3	n/b	n/b	20.9 +/- 17.9	97	
siKontrolle#1	91 +/- 4	+/- 0	0	+/- 0	96 +/- 5	+/- 0	0	23.0 +/- 9.3	1	
siKontrolle#2	113 +/- 6	+/- 0	0	+/- 0	90 +/- 6	+/- 0	0	+/- 0	10	
unbehandelt	100 +/- 8	+/- 0	0	+/- 0	100 +/- 7	+/- 0	0	+/- 0	-	

+/- Standardabweichung, † antivirale Aktivität wurde sechs Tage p.i. gemessen, ‡ antivirale Aktivität wurde neun Tage p.i. gemessen, n/b = nicht bestimmt, u/N = unter der Nachweisgrenze, * Nummer in der siRNA-Datenbank der Arbeitsgruppe

3.3 Mechanismen der IE1-abhängigen Aktivierung zellulärer Gene

Um eine Arzneimittelentwicklung zu rechtfertigen ist es nicht ausreichend nur geeignete Angriffsstellen zu identifizieren, sondern es ist im gleichen Maße wichtig, die Funktionen der Zielmoleküle zu evaluieren. Vor allem sollten die Wechselwirkungen mit anderen Genen und Proteinen verstärkt untersucht werden. Wie schon in der Einleitung erwähnt, sind die Funktionen von IE2 als wichtigstem Aktivator der lytischen Infektion sehr gut analysiert und klar definiert. Die Rolle des IE1-Proteins hingegen, besonders dessen Einfluss auf zelluläre Gene, ist weniger gut untersucht. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Regulation des humanen Transkriptoms durch das virale Protein näher zu charakterisieren.

3.3.1 Herstellung und Charakterisierung einer Zelllinie mit induzierbarer IE1-Expression

Um Überlagerungen IE1-vermittelter Effekte mit sekundären Effekten einer Virusinfektion zu vermeiden, sollte der Einfluss von IE1 auf die Zelle außerhalb des komplexen Virussystems untersucht werden. Zur Vermeidung von Schwierigkeiten, die mit transienten Transfektionen assoziiert sind (z.B. variable Transfektionseffizienzen oder nicht physiologisch hohe Proteinmengen), wären Zellen, die stabil physiologische Mengen an funktionellem IE1 exprimieren sehr nützlich. Außerdem sollte das Expressionssystem induzierbar sein, um eine Adaptation der Zellen an eine Langzeitexpression von IE1 zu vermeiden. Einige Arbeiten deuteten sogar darauf hin, dass die kontinuierliche Expression von IE1 mit genomischer Integrität und normaler Zellproliferation unvereinbar ist (Castillo et al., 2005; Cobbs et al., 2008; Shen et al., 1997).

Aus diesen Gründen sollte die induzierbare Expression von IE1 in einem Tetracyclin-abhängigen System (Tet-On) etabliert werden. Die Grundlage für das Expressionssystem waren hCMV-permissive primäre Fibroblasten (MRC-5-Zellen), in denen IE1-defiziente Virusmutanten unter niedrigen MOI-Bedingungen starke Wachstumsdefekte im Vergleich zum effizient replizierenden Wildtypvirus aufweisen (Krauss et al., 2009; Paulus et al., 2006). Zur Erzeugung von MRC-5-Zellen, die induzierbar IE1 exprimieren, wurden diese zunächst mit rekombinanten Lentiviren transduziert, welche die Expression eines TetR_{nls}EGFP-Fusionsproteins vermitteln. Die resultierenden TetR-Zellen sind G418-resistent und konnten somit selektioniert werden. Anschließend wurden die TetR-Zellen mit rekombinanten Lentiviren transduziert, welche die Expression von IE1 unter der Kontrolle eines Tetracyclin/Doxycyclin-induzierbaren Promotors vermitteln. Diese TetR-IE1-Zellen wurden schließlich mittels G418 und Puromycin selektioniert (siehe 2.8.1 und 2.8.7). Die IE1-

Expression in den Zellen wird durch das TetRnlsEGFP-Protein reguliert. Zum Zellkulturmedium zugesetztes Doxycyclin bindet an den TetR und bewirkt durch eine Konformationsänderung die Ablösung des Repressors vom Promotor des IE1-Gens. Somit kann die Expression von IE1 kontrolliert und synchron induziert werden. Zur maximalen Unterdrückung der IE1-Expression in nicht induzierten TetR-IE1-Zellen erfolgte mittels Fluoreszenz-basierter Zellsortierung, eine Anreicherung von Zellen die möglichst große Mengen des TetRnlsEGFP-Fusionsproteins aufweisen (siehe 2.8.8 und Abb. 3.10).

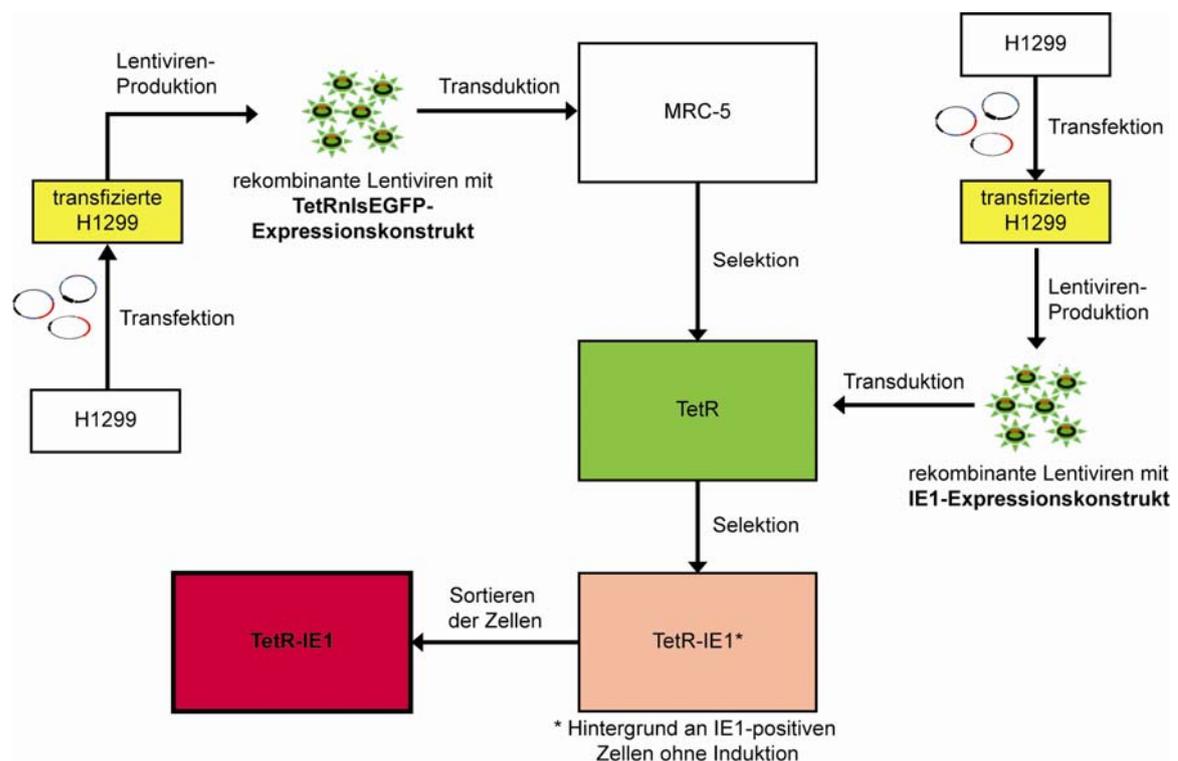


Abb. 3.10 Schematische Darstellung zur Herstellung von TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen. Zur Produktion von rekombinanten Lentiviren wurden H1299-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden (siehe 2.8.7) transfiziert. Anschließend wurden MRC-5-Zellen zunächst mit rekombinanten Lentiviren transduziert, welche die Expression des TetRnlsEGFP-Fusionsproteins vermitteln um TetR-Zellen zu generieren. Nach Selektion wurden diese Zellen mit rekombinanten Lentiviren transduziert, welche die Expression von IE1 unter der Kontrolle eines Tetracyclin/Doxycyclin-induzierbaren Promotors vermitteln. In den daraus resultierenden TetR-IE1-Zellen wurde schließlich durch EGFP-basierte Zellsortierung der im nicht induzierten Zustand aufgrund niedriger TetRnlsEGFP-Konzentrationen vorhandene IE1-Hintergrund reduziert.

Diese Zellen wurden im Folgenden hinsichtlich Expression und Funktionalität des IE1-Proteins charakterisiert. Für Abb. 3.11 A wurden TetR-IE1-Zellen insgesamt 24 h oder 72 h mit Doxycyclin induziert bzw. unbehandelt belassen und die IE1-Expression auf Einzelzellenebene mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse überprüft (siehe 2.7.4 und 2.8.1). Ohne Induktion war der Großteil der Zellen (67%) IE1-negativ. Nur ein kleiner Teil der Zellen zeigte eine schwache, gepunktete IE1-spezifische Färbung des Zellkerns. Dies deutet auf eine stabile Assoziation mit PML-Körpern hin, die aufgrund der niedrigen IE1-Menge nicht

aufgelöst werden können. Zum 24 h- und 72 h-Zeitpunkt nach Doxycyclin-Behandlung war in nur etwa 3% der Zellen keine IE1-Expression detektierbar. In mindestens 96% der Zellen waren dagegen hohe IE1-Expressionslevel nachweisbar, was sich durch die starke IE1-typische diffuse Färbung des Zellkerns äußerte. Die beobachteten temporären und räumlichen Muster der subnukleären Lokalisation von IE1 in TetR-IE1-Zellen ähneln denen, die während einer produktiven hCMV-Infektion in Fibroblasten detektiert werden. Nach einer initialen Kolokalisierung zwischen IE1 und PML-Körpern, folgt eine Auflösung der PML-Körperstruktur und die charakteristische diffuse nukleäre Verteilung des viralen Proteins (Ahn & Hayward, 1997; Koriotoh et al., 1996; Nevels et al., 2004).

Darüber hinaus sollten die Gleichgewichtsmengen von IE1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion im Vergleich zum Infektionsverlauf hCMV-infizierter (MOI = 1 PFU/Zelle) TetR-Zellen untersucht werden. Diese Analysen erfolgten mittels Western Blot-Technik aus Gesamtzelllysaten (siehe 2.7.1 und 2.7.3). Der Nachweis von GAPDH diente dabei als Ladekontrolle. Im Vergleich zu hCMV-infizierten TetR-Zellen exprimierten die induzierten TetR-IE1-Zellen das IE1-Protein mit einer ähnlichen Kinetik. Die IE1-Mengen in den TetR-IE1-Zellen, die von 24 h bis 72 h nach Induktion detektiert wurden, waren vergleichbar mit den Proteinmengen die 24 h p.i. in infizierten TetR-Zellen akkumulierten (siehe Abb. 3.11 B). Zur Untersuchung der Funktionalität des IE1-Proteins in den TetR-IE1-Zellen, wurde die Virusreplikation in einer Multistrittanalyse nach Infektion mit einer IE1-Deletionsmutante (TNdIE1) oder der dazugehörigen „Revertante“ (TNrvIE1) in Doxycyclin-behandelten TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen beobachtet. Hierfür wurden die Zellen unter niedrigen MOI-Bedingungen infiziert (MOI = 0,01 PFU/Zelle). Die Quantifizierung der Virusreplikation erfolgte alle drei Tage p.i. durch Ermittlung der viralen DNA-Menge aus dem Zellkulturüberstand (siehe 2.8.4). Wie in Abb. 3.11 C deutlich zu erkennen ist, ist die Replikation von TNdIE1 im Vergleich zu TNrvIE1, wie erwartet in TetR-Zellen stark attenuiert. Im Gegensatz dazu können induzierte TetR-IE1-Zellen, durch das Bereitstellen des IE1-Proteins in trans, die vollständige Komplementation der IE1-Deletionsmutante bewerkstelligen.

Die Expression von vollkommen funktionellem IE1-Protein kann also in den hergestellten TetR-IE1-Zellen synchron induziert werden und zwar zu Mengen, die mit denen während der frühen Phase einer hCMV-Infektion vergleichbar sind. Demzufolge stellen die TetR-IE1-Zellen ein ideales Modellsystem dar, um aktives IE1 unter physiologisch relevanten Bedingungen, jedoch außerhalb der komplexen Situation einer hCMV-Infektion zu untersuchen.

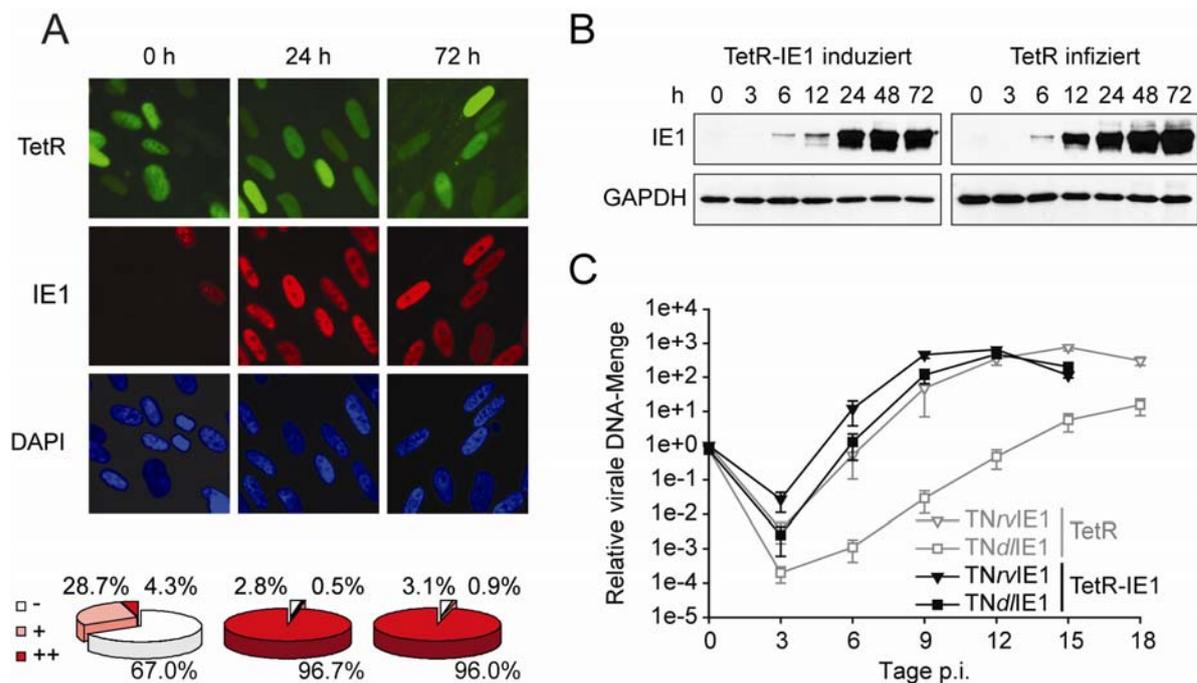


Abb. 3.11 Charakterisierung der TetR- und TetR-IE1-Zellen. (A) Wachstumsarretierte TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen wurden für 24 h bzw. 72 h mit Doxycyclin behandelt oder unbehandelt belassen. Nach PFA-Fixierung und Anfärben von IE1 (rot) bzw. der DNA (blau), wurden die Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf IE1-Expression hin untersucht. Das TetRnlsEGFP-Fusionsprotein wurde direkt durch die EGFP-vermittelte Autofluoreszenz (grün) dargestellt. Insgesamt wurden ungefähr 500 zufällig ausgewählte Kerne nach folgendem System ausgezählt: -, keine erkennbare IE1-Färbung; +, schwache, gepunktete IE1-Färbung; ++, starke, diffuse IE1-Färbung. (B) Mit Doxycyclin behandelte, wachstumsarretierte TetR-IE1-Zellen bzw. infizierte TetR-Zellen (MOI = 1 PFU/Zelle) wurden im Western Blot-Verfahren mit IE1- bzw. GAPDH-spezifischen Antikörpern analysiert. (C) Analyse zur Virusreplikation der IE1-Deletionsmutante (TNdIE1) und der dazugehörigen „Revertante“ (TNrvIE1) auf Doxycyclin-behandelten TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen (MOI = 0,01 PFU/Zelle). Im Abstand von drei Tagen wurde aus den Zellkulturüberständen infizierter Zellen DNA isoliert und die relative virale DNA-Menge mittels q-PCR mit hCMV-spezifischen Primern nachgewiesen. Im Diagramm sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Infektions-Experimenten dargestellt.

3.3.2 Transkriptomanalyse IE1-induzierbarer Zellen

Dass IE1 die Transkription sowohl viraler als auch zellulärer Promotoren aktivieren kann, gilt bereits als anerkanntes Wissen (Everett, 1984; Paulus et al., 2010). In den meisten Arbeiten wurde die IE1-vermittelte Regulation von Wirtsgenen nur mittels transienter Transfektion und Promotor-Reporter-Versuchen analysiert. Die Untersuchung der Regulation endogener zellulärer Transkripte erfolgte bisher allerdings nur sporadisch für einzelne Gene. Zur umfassenden Untersuchung des Einflusses von IE1 auf das humane Transkriptom, wurde eine systematische Genexpressionsanalyse mit Hilfe des TetR-/TetR-IE1-Modellsystems und GeneChip Human Gene 1.0 ST Mikroarrays (Affymetrix) durchgeführt. Die Mikroarrays erfassen insgesamt 28869 humane Gene, entsprechend mehr als 99% der Sequenzen, die gegenwärtig in der RefSeq-Datenbank (NCBI) hinterlegt sind. Wachstumsarretierte TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen wurden für 24 h oder 72 h mit Doxycyclin behandelt bzw. unbehandelt

belassen (siehe 2.8.1). Anschließend erfolgte die Isolierung von Gesamt-RNA. Die weitere cDNA-Synthese, cRNA-Biotinylierung sowie die Mikroarray-Hybridisierungen wurde am KFB (Universität Regensburg) durchgeführt (siehe 2.6.5). Zur statistischen Absicherung der Daten wurde jede der beschriebenen Proben in biologischen Triplikaten untersucht, so dass insgesamt 18 Mikroarrays hybridisiert wurden.

Die Expressionsprofile von induzierten im Vergleich zu nicht induzierten TetR-IE1-Zellen (IE1+/IE1-) und induzierten TetR-IE1- im Vergleich zu induzierten TetR-Zellen (IE1+/TetR+) wurden jeweils 24 h und 72 h nach Induktion unter stringenten Analyse-Kriterien miteinander verglichen. Nur Transkripte, die mit einem Konfidenzintervall von größer 99,9% mindestens zweifach reguliert vorlagen wurden als signifikant bewertet. Des Weiteren wurden nur Gene berücksichtigt, die sowohl im Vergleich IE1+/IE1- als auch im Vergleich IE1+/TetR+ differentiell reguliert waren, um unspezifische Doxycyclin- oder Zelllinien-abhängige Effekte auszuschließen.

Unter diesen stringenten Analyse-kriterien war die große Mehrheit der auf den Mikroarrays repräsentierten Gene (99,9%) in ihrer Expressionsstärke nicht signifikant durch IE1 beeinflusst. Nur eine kleine Anzahl von insgesamt 38 humanen Genen lag 24 h bzw. 72 h nach Induktion differentiell reguliert vor. Im Vergleich von uninduzierten TetR-IE1- mit uninduzierten TetR-Zellen (IE1-/TetR-) konnte keine signifikante IE1-abhängige Transkriptionsregulation beobachtet werden.

Tabelle 3.4 Gene mit reduzierter mRNA-Menge nach IE1-Induktion

Gen-Symbol	Maximale Veränderung der mRNA-Menge			
	24 h nach Induktion		72 h nach Induktion	
	IE1+/TetR+	IE1+/IE1-	IE1+/TetR+	IE1+/IE1-
SOCS3	2.8	2.1	3.0	2.5
CHL1	2.8	1.5	5.5	2.9
RASL11A	2.1	1.6	2.4	2.2
TMOD1	1.9	1.5	3.3	2.6
SLC4A4	1.7	1.2	3.0	2.1
TNXB	1.6	1.2	2.7	2.0
CHI3L1	1.1	1.2	2.5	2.4
C4A	1.4	1.2	2.4	2.2
PDE1A	1.3	1.3	2.3	2.3
SCN3A	1.2	1.6	2.2	2.8
CXCL12	1.2	1.2	2.2	2.2
PTGFR	1.7	1.6	2.1	2.1
HRSP12	1.3	1.3	2.0	2.0

Hellblaue Schattierung: differentielle Regulation bereits 24 h nach Induktion, dunkelblaue Schattierung: differentielle Regulation erst 72 h nach Induktion, Zahlenwerte: x-fache Herunterregulierung der mRNA-Menge im Vergleich zu induzierten TetR-IE1-Zellen mit induzierten TetR-Zellen (IE1+/TetR+) bzw. im Vergleich zu induzierten mit nicht induzierten TetR-IE1-Zellen (IE1+/IE1-)

Unter den 38 regulierten humanen Genen waren 13 Gene 2,0- bis 5,5-fach herunterreguliert (siehe Tabelle 3.4) und 25 Gene 2,0- bis 41,9-fach hochreguliert (siehe Tabelle 3.5). Diese Arbeit konzentriert sich im Folgenden auf die durch IE1 hochregulierten Gene. Nur fünf dieser Gene lagen 24 h nach IE1-Induktion differentiell reguliert vor. Für die restlichen 20 konnte eine IE1-abhängige Veränderung der Expressionsstärke erst 72 h nach Induktion ermittelt werden.

Tabelle 3.5 Gene mit erhöhter mRNA-Menge nach IE1-Induktion

Gen-Symbol	Maximale Veränderung der mRNA-Menge			
	24 h nach Induktion		72 h nach Induktion	
	IE1+/TetR+	IE1+/IE1-	IE1+/TetR+	IE1+/IE1-
TNFSF18	9.0	2.6	12.6	4.8
TNFSF4	6.2	2.1	6.5	2.5
CXCL10	3.5	2.4	41.9	24.6
ANKRD1	3.3	2.3	10.1	8.3
EDN1	2.4	1.9	3.3	3.6
IDO1	1.6	1.1	28.7	20.2
GBP4	1.7	1.2	17.3	13.5
CXCL11	1.4	1.1	13.3	10.5
GBP5	1.1	1.0	7.5	7.0
IFI44L	1.3	1.1	4.6	4.4
CXCL9	1.3	1.0	4.5	4.2
CD274	1.2	1.5	3.9	4.5
HLA-DRA	1.2	1.1	3.4	3.5
GBP1	1.5	1.2	3.1	2.7
IFIT2	1.4	1.0	2.9	2.0
CCL11	1.7	1.2	2.8	2.2
HES1	1.7	1.3	2.6	2.2
SERTAD4	1.4	1.1	2.6	2.0
GBP2	-1.1	-1.1	2.5	3.9
CTSS	1.0	1.0	2.5	2.2
HBG1	1.2	1.0	2.4	2.1
IRF1	1.2	1.3	2.3	2.5
TAP1	1.2	1.1	2.3	2.1
CCDC3	1.1	1.1	2.3	2.1
IFIT3	-1.1	1.9	2.1	2.1

Hellblaue Schattierung: differentielle Regulation bereits 24 h nach Induktion, dunkelblaue Schattierung: differentielle Regulation erst 72 h nach Induktion, Zahlenwerte: x-fache Hochregulierung der mRNA-Menge im Vergleich zu induzierten TetR-IE1-Zellen mit induzierten TetR-Zellen (IE1+/TetR+) bzw. im Vergleich zu induzierten mit nicht induzierten TetR-IE1-Zellen (IE1+/IE1-)

Interessanterweise sind die Genprodukte der 25 IE1-abhängig aktivierten Transkripte nahezu alle an angeborenen oder erworbenen Immunprozessen einschließlich Entzündungsreaktionen beteiligt. Insgesamt kodieren sieben der 25 Gene für bekannte Chemokine oder andere Zytokine, wie beispielsweise C-X-C Motiv-Liganden (CXCL9, CXCL10 und CXCL11), Endothelin 1 (EDN1) und die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Superfamilienmitglieder 4 (TNFSF4) und 18 (TNFSF18). Überraschenderweise sind die meisten IE1-induzierten Gene

eher mit stimulatorischen als mit inhibitorischen Einflüssen auf Immunfunktionen und/oder Entzündungsprozesse assoziiert (siehe 4.2).

Zur Bestätigung der Mikroarraydaten wurde für elf ausgewählte IE1-abhängig aktivierte Gene die Expressionsstärke vor und nach IE1-Induktion mittels q-RT-PCR bestimmt (siehe 2.6.4). Die Induktionsstärke dieser Gene ist repräsentativ für die gesamte Bandbreite der in der Mikroarrayanalyse gemessenen Werte. Hierfür wurden wachstumsarretierte TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen für 0 h bis 72 h mit Doxycyclin induziert. Der kinetische Verlauf der Expressionsstärke, der exemplarisch anhand der mRNA-Mengen von CXCL9, CXCL10, dem Guanylat-Bindeprotein 4 (GBP4) und dem Transporter 1 (TAP1) nach IE1-Induktion bestimmt wurde, spiegelt die Ergebnisse der Mikroarrayanalyse wider (siehe Tabelle 3.5 und Abb. 3.12 A). Die IE1-abhängige Aktivierung aller vier Gene war 72 h nach Induktion deutlich nachweisbar und konnte, weniger ausgeprägt aber dennoch signifikant, bereits 48 h nach Induktion detektiert werden. Zwischen 6 h und 24 h wurden nur geringe bzw. keine Effekte auf die mRNA-Mengen der Indikatorgene ermittelt. Die ähnliche Induktionskinetik lässt somit auf einen gemeinsamen Regulationsmechanismus schließen. Eine weitere Auswertung der Mikroarraydaten unter weniger stringenten Bedingungen (Daten nicht gezeigt), geben Hinweise auf eine IE1-abhängige Hochregulierung von IL-6. Wie in der Einleitung schon erwähnt, führt dieses Zytokin zur Aktivierung einer STAT3-abhängigen Signalkaskade und ist an proinflammatorischen Prozessen der Zelle beteiligt. Dieses Zytokin könnte somit an der Vermittlung der IE1-Antwort beteiligt sein und wurde deshalb ebenfalls in die q-RT-PCR-Analyse miteinbezogen. Die Kinetik von IL-6 nach IE1-Induktion ist in etwa vergleichbar mit den Expressionsmustern der anderen Indikatorgene (z.B. CXCL9 und CXCL10). Allerdings konnte eine verstärkte Aktivierung in den TetR-IE1-Zellen (im Vergleich zu TetR-Zellen) bereits ohne Induktion beobachtet werden. Die Tubulin-Expression, die nicht durch IE1 beeinflusst ist, diente hier als Negativkontrolle (siehe Abb. 3.12 A).

Die IE1-abhängige Aktivierung der Gene TNFSF18, TNFSF4, C-C Motiv-Ligand 11 (CCL11), hairy and enhancer of split 1 (HES1), SERTA domain containing 4 (SERTAD4) und coiled-coil domain containing 3 (CCDC3) wurde 72 h nach Induktion mittels q-RT-PCR bestätigt (siehe Abb. 3.12 B). Insgesamt zeigten die PCR-Daten typischerweise gleiche bzw. größere Effekte im Vergleich zu den Mikroarraydaten (Abb. 3.12 A und B). Die maximale Induktionsstärke der CXCL10-mRNA-Menge liegt beispielsweise in der Mikroarrayanalyse bei 24,6-fach und nach Messung durch die q-RT-PCR bei 68,0-fach.

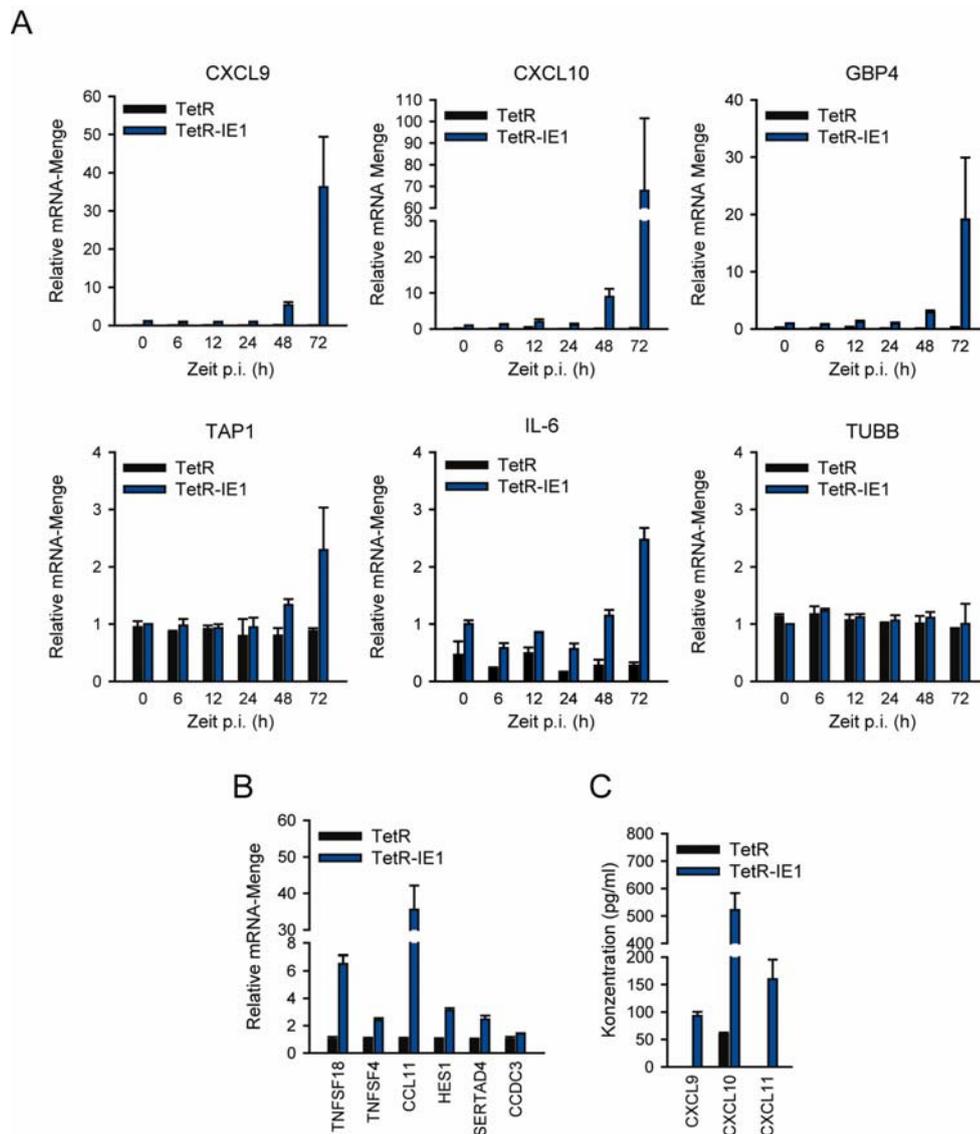


Abb. 3.12 Bestätigung der IE1-induzierten Gen-Expression. (A-B) Wachstumsarretierte TetR- und TetR-IE1-Zellen wurden, wie angegeben, 0 h bis 72 h (A) bzw. 72 h (B) mit Doxycyclin behandelt. Die relative mRNA-Menge IE1-induzierter Gene wurde durch q-RT-PCR mit spezifischen Primern bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten im Vergleich zu unbehandelten TetR-IE1-Zellen (A) bzw. TetR-Zellen (B). (C) Im Zellkulturüberstand von wachstumsarretierten und Doxycyclin-induzierten TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen wurde mittels Sandwich-ELISA die Proteinmenge von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils vier biologischen und zwei technischen Replikaten.

Die IE1-abhängige Induktion der Transkriptmenge sollte eine gesteigerte Proteinproduktion zur Folge haben. Um dies zu bestätigen, wurde exemplarisch mittels Sandwich-ELISA die Akkumulation der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 im Überstand induzierter TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen überprüft (siehe 2.7.5). Die Chemokine CXCL9 und CXCL11 konnten ausschließlich im Überstand induzierter TetR-IE1-Zellen vorgefunden werden. Die CXCL10-Proteinmengen waren im Überstand induzierter TetR-IE1-Zellen im Vergleich zu TetR-Zellen drastisch erhöht (siehe Abb. 3.11 C). Dies zeigt, dass sich zumindest im Fall der

drei IE1-abhängig regulierten Gene CXCL9, CXCL10 und CXCL11 die transkriptionelle Aktivierung auch auf eine verstärkte Proteinsynthese bzw. Zytokinsekretion auswirkt.

Insgesamt konnte die IE1-abhängige Aktivierung aller getesteten Gene durch zwei bzw. drei verschiedene experimentelle Ansätze bestätigt werden. Dies deutet sehr stark darauf hin, dass im Wesentlichen alle Gene, die innerhalb des experimentellen Rahmens und der gewählten Analyse Kriterien per Transkriptomanalyse identifiziert wurden, durch das virale IE1-Protein differentiell reguliert werden.

3.3.3 IE1 vermittelt eine IFN- γ -ähnliche Antwort

Literaturrecherchen erbrachten erste Hinweise darauf, dass eine große Anzahl der IE1-aktivierten humanen Gene, die durch die Mikroarrayanalyse identifiziert worden waren, typische ISGs sind. Zur systematischen Kategorisierung der Gene hinsichtlich ihrer IFN-

Tabelle 3.6 q-RT-PCR-Analyse zur IFN-Induzierbarkeit von IE1-abhängig aktivierten Genen

Gen-Symbol	Behandlung	Mittelwert des Cp-Werts \pm Standardabweichung*
TUBB	-	18.50 \pm 0.03
	IFN- α	18.53 \pm 0.04
	IFN- γ	18.74 \pm 0.05
TNFSF18	-	25.94 \pm 0.24
	IFN- α	25.15 \pm 0.11
	IFN- γ	25.48 \pm 0.19
TNFSF4	-	23.36 \pm 0.15
	IFN- α	22.96 \pm 0.06
	IFN- γ	23.99 \pm 0.10
SERTAD4	-	28.74 \pm 0.04
	IFN- α	28.81 \pm 0.09
	IFN- γ	28.43 \pm 0.08
HES1	-	29.88 \pm 0.15
	IFN- α	29.51 \pm 0.05
	IFN- γ	28.97 \pm 0.13
CCDC3	-	26.94 \pm 0.32
	IFN- α	26.80 \pm 0.17
	IFN- γ	27.83 \pm 0.17
HBG1	-	> 36.00
	IFN- α	> 36.00
	IFN- γ	> 36.00
CCL11	-	31.08 \pm 0.15
	IFN- α	31.00 \pm 0.18
	IFN- γ	30.06 \pm 0.11

hellgraue Schattierung: nicht reguliert durch IFN, dunkelgraue Schattierung: reguliert durch IFN, *Es wurden zwei biologische und zwei technische Replikate analysiert

Induzierbarkeit wurde die Interferome-Datenbank (www.interferome.org) verwendet. Diese Datenbank basiert auf den Transkriptomdaten von 23 Veröffentlichungen zur IFN-abhängigen Regulation humaner Gene. Davon wurden alle 23 Studien mit Typ I IFN durchgeführt und in sieben Studien wurde zusätzlich der Einfluss von Typ II IFN auf das Transkriptom humaner Zellen untersucht. Insgesamt sind in der Interferome-Datenbank ca. 2000 durch IFN-regulierbare Gene hinterlegt. Für einen Teil der IE1-abhängig regulierten Gene wurde die IFN-Induzierbarkeit auch experimentell durch q-RT-PCR-Analysen 24 h nach Behandlung von TetR-Zellen mit IFN- α bzw. IFN- γ bestimmt (siehe Tabelle 3.6). So konnten insgesamt 20 (80%) der 25 IE1-aktivierten Transkripte als ISGs identifiziert werden. Zusätzlich wurden die Gene auch hinsichtlich ihrer Chromosomen-

Lokalisation untersucht. Interessanterweise häufen sich die IE1-abhängig regulierten ISGs in bestimmten chromosomalen Regionen (siehe Tabelle 3.7), was (neben der ähnlichen Induktionskinetik) ein weiteres Indiz, für eine Koregulation ist.

Tabelle 3.7 IFN-Induzierbarkeit von IE1-abhängig aktivierten Genen

Gen		IFN-induzierbar		
Symbol	Chromosomen-Lokus	Ja/Nein	Typ	Referenz
IFI44L	1p31.1	Ja	I, II	Interferome
GBP1	1p22.2	Ja	I, II	Interferome
GBP2	1p22.2	Ja	I, II	Interferome
GBP4	1p22.2	Ja	II	Interferome, Abb. 3.13
GBP5	1p22.2	Ja	I, II	Interferome
CTSS	1q21	Ja	I, II	Interferome
TNFSF18	1q23	Nein	-	Tabelle 3.6
TNFSF4	1q25	Nein	-	Tabelle 3.6
SERTAD4	1q32.1-q41	Nein	-	Tabelle 3.6
HES1	3q28-29	Ja	II	Tabelle 3.6
CXCL9	4q21	Ja	I, II	Interferome, Abb. 3.13
CXCL10	4q21	Ja	I, II	Interferome, Abb. 3.13
CXCL11	4q21.2	Ja	I, II	Interferome
IRF1	5q31.1	Ja	II	Interferome, Abb. 3.13
EDN1	6p24.1	Ja	II	Interferome
HLA-DRA	6p21.3	Ja	I, II	Interferome
TAP1	6p21.3	Ja	I, II	Interferome, Abb. 3.13
IDO1	8p12-11	Ja	I, II	Interferome
CD274	9p24	Ja	II	Interferome
CCDC3	10p13	Nein	-	Tabelle 3.6
IFIT2	10q23-q25	Ja	I, II	Interferome
IFIT3	10q24	Ja	I, II	Interferome
ANKRD1	10q23.31	Ja	I, II	Interferome
HBG1	11p15.5	Nein	-	Tabelle 3.6
CCL11	17q21.1-21.2	Ja	II	Tabelle 3.6

Blaue Schattierung: induzierbar durch IFN, graue Schattierung: nicht durch IFN induzierbar

Die meisten der IE1-aktivierten ISGs können grundsätzlich sowohl von Typ I IFN als auch von Typ II IFN reguliert werden. Um zu untersuchen, mit welchem IFN sich die Gene stärker aktivieren lassen, damit eine weitere Unterteilung in Typ I oder Typ II ISGs vorgenommen werden kann, wurden TetR- und TetR-IE1-Zellen mit exogenem IFN- α (Typ I IFN) oder IFN- γ (Typ II IFN) behandelt. Zusätzlich sollte der Einfluss des proinflammatorischen Zytokins IL-6, welches IE1-abhängig hochreguliert wird (siehe oben), auf seine Fähigkeit zur Aktivierung der IE1-regulierten Transkripte untersucht werden. Da einige der Gene laut Literatur auch durch TNF- α stimuliert werden können (Ferreiro et al., 2010; Goldmann et al., 2007; Jang et al., 2004; Kotelnikova et al., 2010; Yarinina & Ivashkiv, 2010), wurde dieses Zytokin ebenfalls in die Analyse einbezogen.

Hierfür wurden Doxycyclin-behandelte TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen 24 h mit IFN- α , IFN- γ , IL-6 oder TNF- α behandelt bzw. unbehandelt belassen (siehe 2.8.1) und die mRNA-Akkumulation von IE1 und ausgewählter IE1-abhängig regulierter ISGs bestimmt.

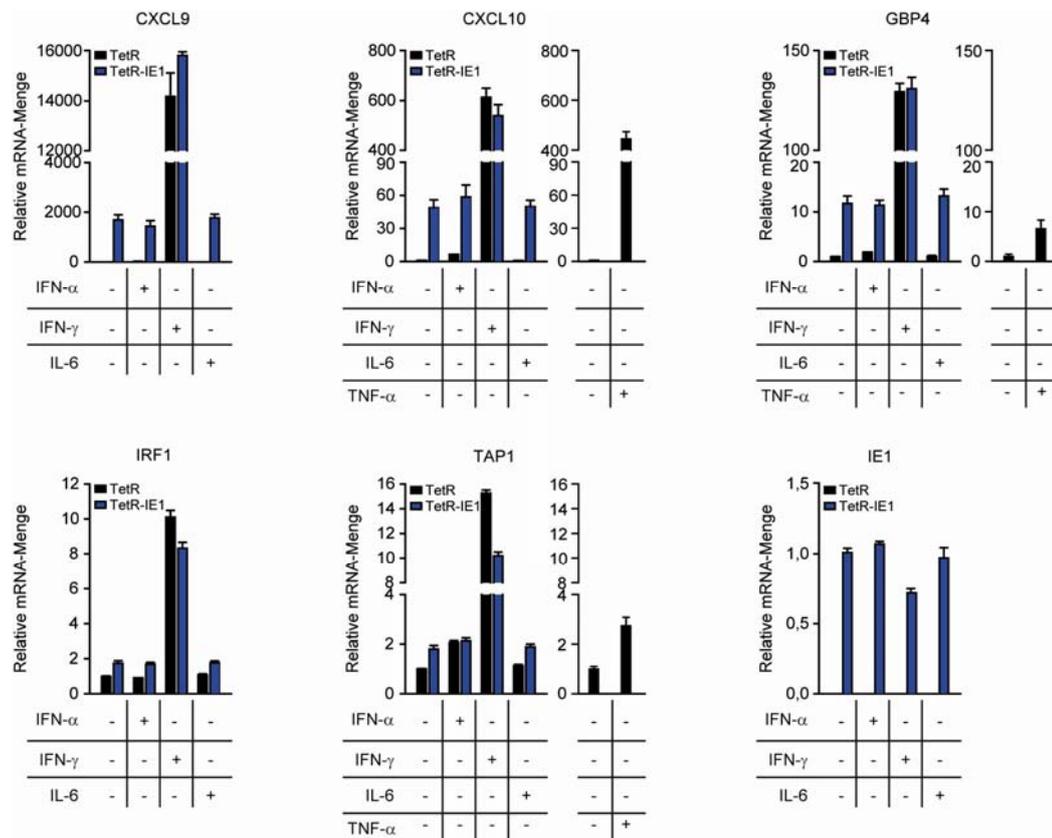


Abb. 3.13 IE1 induziert eine IFN- γ -artige Antwort. Wachstumsarretierte TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin induziert und während der letzten 24 h mit IFN- α , IFN- γ , IL-6 oder TNF- α behandelt bzw. unbehandelt belassen. Die relative mRNA-Menge IE1-induzierter Gene wurde durch q-RT-PCR mit spezifischen Primern bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils zwei biologischen und zwei technischen Replikaten normiert auf Tubulin und im Vergleich zu unbehandelten TetR-Zellen (CXCL9, CXCL10, GBP4, IRF1, TAP1) bzw. TetR-IE1-Zellen (IE1).

Die IE1-Expressionsmenge war, wie erwartet, in allen Analysen induzierter TetR-IE1-Zellen vergleichbar. Die Transkriptmengen der untersuchten Indikatorgene stiegen nach IFN- γ -Behandlung der TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen in unterschiedlichem Ausmaß jeweils stark an. Im Gegensatz dazu war die Induktion derselben Gene nach IFN- α -Behandlung deutlich schwächer (CXCL9, CXCL10, GBP4 und TAP1) oder nicht nachzuweisen (Interferon regulierter Faktor 1 (IRF1)). Obwohl auch in diesem Experiment die mRNA-Mengen aller untersuchten Gene IE1-abhängig deutlich anstiegen, konnten unter den gegebenen Bedingungen keine signifikanten synergistischen oder additiven Effekte zwischen IE1-Expression und IFN-Behandlung beobachtet werden. IL-6 hatte weder in den TetR- noch in

den TetR-IE1-Zellen einen erkennbaren Einfluss auf die mRNA-Mengen der ausgewählten Gene und spielt deshalb vermutlich bei der IE1-abhängigen Antwort zumindest in MRC-5-Zellen keine Rolle. Dies kann auch auf ein mögliches Fehlen des spezifischen IL-6-Rezeptors, welcher nur auf bestimmten Zelltypen (wie z. B. Hepatozyten, Monozyten und inaktiven T- und B-Zellen) exprimiert wird, zurückzuführen sein (Kishimoto et al., 1992; Müllberg et al., 1993; Taga & Kishimoto, 1995). Der Anstieg der Transkriptmenge von CXCL10 ist nach TNF- α -Behandlung der TetR-Zellen vergleichbar mit dem Expressionsanstieg nach IFN- γ -Behandlung. Allerdings sind die mRNA-Mengen von GBP4 und TAP1 weniger stark durch die TNF- α -Induktion betroffen (siehe Abb. 3.13).

Zusammenfassend scheint die Expression von IE1 selektiv eine kleine Anzahl an ISGs zu aktivieren, die normalerweise vor allem durch IFN- γ reguliert werden.

3.3.4 Zweiphasiger Mechanismus der IE1-abhängigen Genregulation mit Beteiligung löslicher Faktoren

In den folgenden Abschnitten sollte der zugrundeliegende Mechanismus der IFN- γ -artigen IE1-Antwort geklärt werden. Auffällig an der IE1-vermittelten ISG-Aktivierung ist die verzögerte Kinetik mit der die Expression der Gene induziert wird. Das IE1-Protein, welches bereits 24 h nach Doxycyclin-Behandlung in großen Mengen in den TetR-IE1-Zellen vorzufinden ist (siehe Abb. 3.11), vermittelt erst 72 h nach Induktion eine deutlich nachweisbare Hochregulierung der Transkripte (siehe Tabelle 3.5 und Abb. 3.12 A). Diese Beobachtung könnte durch eine mehrphasige Antwort erklärt werden. Es wäre vorstellbar, dass IE1 initial einen oder mehrere Faktoren beeinflusst, die dann in den folgenden Schritten die Induktion der ISGs bewirken. Naheliegende Vertreter, die diese Antwort vermitteln könnten, wären IFN oder aber auch andere (proinflammatorische) Zytokine. Diese sollten, sofern sie tatsächlich involviert sind, ins Zellkulturmedium induzierter TetR-IE1-Zellen sekretiert werden. Um einen möglichen Einfluss von löslichen Faktoren bei der IE1-Antwort zu untersuchen, wurden TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen für 72 h mit Doxycyclin behandelt. Während des 72-stündigen Induktionszeitraums wurde im Abstand von jeweils 12 h das Zellkulturmedium ausgetauscht, um eine Akkumulation löslicher Faktoren zu vermeiden. Mittels q-RT-PCR wurde dann die Expression ausgewählter IE1-aktivierbarer Gene mit bzw. ohne Doxycyclin-Behandlung und mit bzw. ohne Wechseln des Zellkulturmediums bestimmt. Wie in Abb. 3.14 zu sehen ist, bewirkte der Austausch des Zellkulturmediums eine drastische Reduktion der Expression aller untersuchten IE1-abhängig regulierten Gene im Vergleich zu normal induzierten TetR-IE1-Zellen. Die relativen mRNA-Mengen waren in diesem Fall in

etwa mit denen von TetR-IE1-Zellen ohne Induktion vergleichbar. Die Stärke der IE1-Expression nach Doxycyclin-Behandlung war durch den Medienwechsel dagegen nicht negativ betroffen. Diese Daten weisen sehr stark auf einen mindestens zweiphasigen Mechanismus der IE1-vermittelten Antwort mit einer Beteiligung von einem oder mehreren löslichen Faktoren hin.

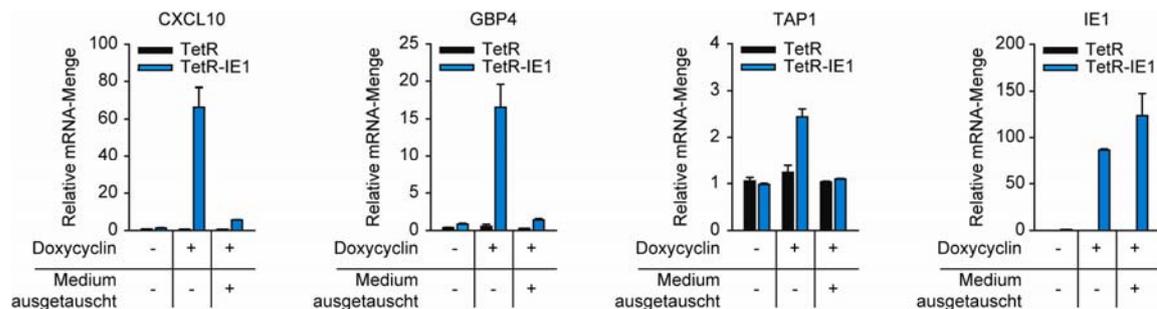


Abb. 3.14 IE1-vermittelte ISG-Induktion ist abhängig von einem oder mehreren löslichen Faktoren. Wachstumsarretierte TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen wurden für insgesamt 72 h mit Doxycyclin induziert bzw. unbehandelt belassen. Zusätzlich wurde während der Doxycyclin-Induktion im Abstand von jeweils 12 h bei einem Teil der Zellen das Zellkulturmedium durch frisches Medium ersetzt. Die relative mRNA-Menge der angegebenen Gene wurde durch q-RT-PCR mit spezifischen Primern bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten normiert auf Tubulin und im Vergleich zu unbehandelten TetR-IE1-Zellen.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob allein das Sekretom induzierter TetR-IE1-Zellen für die ISG-Aktivierung ausreicht. In einem Pilotexperiment wurden die Zellkulturüberstände von TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen 24 h und 72 h nach Doxycyclin-Behandlung auf normale MRC-5-Zellen transferiert, unterschiedlich lange (3 h, 12 h, 24 h, 72 h) dort belassen und die Expression eines IE1-abhängig regulierten Gens (CXCL10) mittels q-RT-PCR analysiert. Als Positivkontrolle wurde die CXCL10-Menge in induzierten TetR-IE1-Zellen gemessen (siehe Abb. 3.15 B). Es konnte kein Einfluss des Zellkulturmediums induzierter TetR- oder induzierter TetR-IE1-Zellen auf die Expression von CXCL10 in MRC-5-Zellen detektiert werden (siehe Abb. 3.15 A). Um diese Beobachtung mit Hilfe eines weiteren experimentellen Ansatzes zu verifizieren, wurden Transwell-Gefäße verwendet, in denen die obere Kultivierungskammer von der unteren durch eine Membran mit 0,4 μm Porengröße getrennt ist. Durch diese Membran können lösliche Moleküle, jedoch keine Zellen diffundieren, was eine Kokultivierung verschiedener Zelltypen ohne physischen Kontakt ermöglicht. TetR-Zellen wurden in die obere Kammer und TetR-IE1-Zellen in die untere Kammer ausgesät und nach Wachstumsarretierung für insgesamt 72 h mit Doxycyclin behandelt. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich in die untere Kammer IFN- γ gegeben (siehe Abb. 3.15 C und D). Nach Behandlung der Zellen wurde die relative mRNA-Menge von IE1 sowie ausgewählter IE1-abhängig regulierter Gene mittels q-RT-PCR bestimmt.

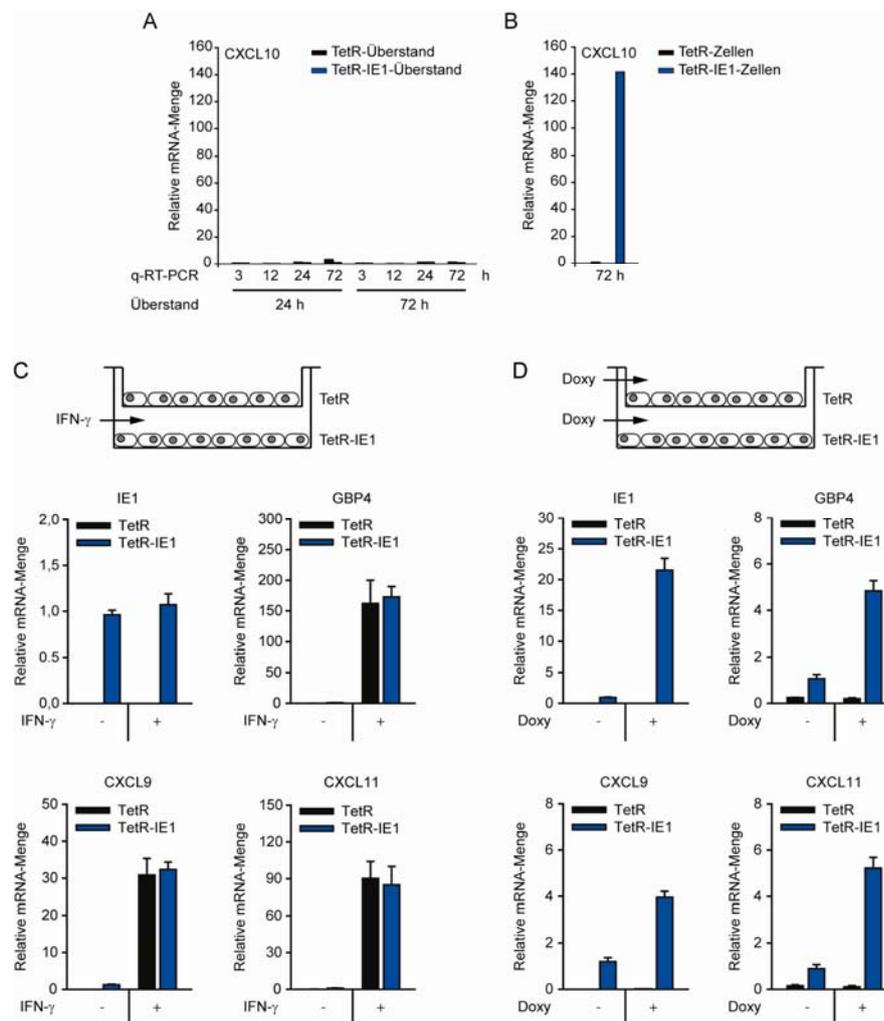


Abb. 3.15 ISG-Induktion ist auf IE1-exprimierende Zellen beschränkt. (A) Überstände von wachstumsarretierten TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen wurden 24 h und 72 h nach Doxycyclin-Behandlung für 3, 12, 24 und 72 h auf wachstumsarretierte MRC-5-Zellen transferiert. (B) Wachstumsarretierte TetR- und TetR-IE1-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin induziert. (A-B) Die relative CXCL10-mRNA-Menge wurde durch q-RT-PCR mit spezifischen Primern zu den angegebenen Zeitpunkten ermittelt, auf Tubulin normiert und im Vergleich zu unbehandelten TetR-Zellen dargestellt. (C-D) Wachstumsarretierte TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen in der oberen bzw. unteren Kammer von Transwell-Zellkulturschalen wurden für 72 h mit Doxycyclin induziert bzw. unbehandelt belassen. (C) Als Positivkontrolle wurden die für 72 h mit Doxycyclin behandelten TetR-IE1-Zellen (unten) zusätzlich für 24 h mit IFN- γ induziert bzw. unbehandelt belassen. (C-D) Die relative mRNA-Menge der angegebenen Gene wurde durch q-RT-PCR mit spezifischen Primern bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten normiert auf Tubulin und im Vergleich zu unbehandelten TetR-IE1-Zellen.

Durch Zugabe von IFN- γ in die untere Kammer des Transwells wurde die Expression von CXCL9, CXCL11 und GBP4 sowohl in TetR-IE1-Zellen als auch in TetR-Zellen im gleichen Maße aktiviert. Diese Beobachtung korreliert zum einen mit vorherigen Experimenten (siehe Abb. 3.13), zum anderen bestätigt sie aber auch die Membrangängigkeit von IFN- γ . Die IFN- γ -Behandlung hatte wie erwartet keinen Einfluss auf die relativen IE1 mRNA-Mengen (siehe Abb. 3.15 C). Nach Doxycyclin-Behandlung konnte, wie schon in vorherigen Experimenten, ein deutlicher Expressionsanstieg von CXCL9, CXCL11 und GBP4 in den TetR-IE1-Zellen im Vergleich zu nicht induzierten Zellen ermittelt werden. Allerdings führte

die Kokultivierung von TetR-Zellen mit induzierten TetR-IE1-Zellen zu keinem Expressionsanstieg der IE1-abhängig regulierten ISGs in den TetR-Zellen. Das Sekretom induzierter TetR-IE1-Zellen hat also offenbar unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Induktion von ISGs in IE1-negativen Zellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass lösliche Faktoren (einer oder mehrere) wohl für die IE1-vermittelte Induktion der ISGs notwendig aber nicht ausreichend sind. Das virale Protein scheint somit für beide Phasen des vermutlich zweiphasigen Mechanismus der Typ II ISG-Induktion essentiell zu sein.

3.3.5 IFN-unabhängige Regulation der IE1-vermittelten ISG-Induktion

Da ein Großteil der IE1-induzierten Gene typische ISGs sind (siehe Tabelle 3.7), ist es naheliegend, dass deren Induktion durch IFN-Signalweiterleitung vermittelt wird. Um dies zu überprüfen wurden zunächst alle humanen IFN-Gene, die auf den Mikroarrays repräsentiert waren, hinsichtlich einer IE1-abhängigen differentiellen Regulierung untersucht.

Tabelle 3.8 Ergebnis der Mikroarrayanalyse für IFN-Gene

Gen-Symbol	Veränderung der mRNA-Menge				
	Ohne Induktion	24 h nach Induktion		72 h nach Induktion	
	IE1-/TetR-	IE1+/TetR+	IE1+/IE1-	IE1+/TetR+	IE1+/IE1-
IFNA1	1.07	-1.02	1.21	-1.29	-1.16
IFNA2	1.10	-1.09	-1.13	1.06	-1.04
IFNA4	-1.06	-1.03	-1.08	1.01	-1.01
IFNA5	1.04	1.09	1.17	-1.01	1.08
IFNA6	1.00	1.13	1.31	1.12	-1.03
IFNA8	1.03	-1.04	-1.01	-1.03	1.00
IFNA10	-1.04	1.04	1.06	-1.05	-1.02
IFNA13	1.03	1.07	1.04	-1.08	-1.05
IFNA14	-1.07	-1.05	1.06	-1.03	-1.17
IFNA16	1.15	-1.22	-1.16	-1.09	1.03
IFNA17	-1.03	-1.05	-1.02	1.01	1.04
IFNA21	1.03	-1.05	-1.15	-1.10	-1.07
IFNB1	1.06	-1.05	1.00	1.14	1.03
IFNE	-1.15	-1.11	-1.32	1.01	1.13
IFNK	1.00	1.00	-1.13	-1.07	-1.10
IFNW1	1.08	-1.07	1.14	-1.25	-1.13
IFNG	-1.04	-1.04	-1.12	1.01	1.03
IL28A	1.09	-1.01	1.13	-1.01	-1.09
IL28B	-1.11	1.12	1.12	1.11	1.28
IL29	1.01	-1.15	-1.06	-1.06	-1.09

Das IFNA7-Gen ist nicht auf den in dieser Studie verwendeten Mikroarrays vertreten. Hellgraue Schattierung: Typ I IFN, mittelgraue Schattierung: Typ II IFN, dunkelgraue Schattierung: Typ III IFN, Zahlenwerte: x-fache Regulierung der mRNA-Menge im Vergleich von nicht induzierten TetR-IE1- und nicht induzierten TetR-Zellen (IE1-/TetR-) bzw. induzierten TetR-IE1-Zellen und induzierten TetR-Zellen (IE1+/TetR+) bzw. induzierten und nicht induzierten TetR-IE1-Zellen (IE1+/IE1-)

Diese zeigten allerdings keine signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung in Gegenwart von IE1 (siehe Tabelle 3.8).

Im Folgenden sollte eine mögliche IE1-abhängige Hochregulierung von IFN- γ über einen detaillierteren Zeitverlauf nach Induktion untersucht werden. Hierfür wurden wachstums-arrretierte TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen von 0 h bis 96 h mit Doxycyclin behandelt und die relative IFN- γ -mRNA-Menge mittels q-RT-PCR untersucht. Als Positivkontrolle dienten PBMCs. Für eine verstärkte IFN- γ -Produktion wurden die isolierten PBMCs für 6 h mit PMA und Ionomycin induziert bzw. unbehandelt belassen (siehe 2.5.2). Den cp-Werten aus Tabelle 3.9 ist zu entnehmen, dass die relative IFN- γ -mRNA-Menge stimulierter und nicht

Tabelle 3.9 q-RT-PCR-Analyse zur IE1-abhängigen Aktivierung von IFN- γ

Behandlung	Cp-Wert		
	TetR	TetR-IE1	PBMCs
0*	32,8	33,9	-
3*	33,3	33,0	-
6*	33,4	32,7	-
9*	32,6	35,4	-
12*	32,9	33,2	-
18*	33,4	34,4	-
24*	33,2	33,1	-
36*	31,4	32,7	-
48*	33,0	32,6	-
72*	34,5	33,2	-
96*	33,4	33,5	-
PMA/Ionomycin	-	-	15,5
-	-	-	26,2

* Doxycyclin-Behandlung (h), PMA = Phorbol 12-Myristat 13-Acetat

stimulierter PBMCs mit dem verwendeten Primerpaar gut nachweisbar war. Die ermittelten Werte lagen im Bereich von 15 (stimulierte PBMCs) und 26 (nicht stimulierte PBMCs). Im Gegensatz dazu war die PCR-Zyklus-Anzahl zur Amplifizierung der IFN- γ -mRNA in TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen größer 32, was auf sehr niedrige IFN- γ -Grundmengen zurückzuführen ist. Diese Beobachtung korreliert auch mit Arbeiten aus anderen Arbeitsgruppen, die zeigten, dass nur wenige Zelltypen, darunter hauptsächlich Immunzellen, IFN- γ produzieren (Schroder et al., 2004). Des Weiteren konnten auch keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der PCR-Zyklen zur Amplifizierung der IFN- γ -mRNA in TetR- und TetR-IE1-Zellen innerhalb der gewählten Analyse-Bedingungen beobachtet werden, was ebenfalls darauf hin deutet, dass die IE1-vermittelte Genregulation unabhängig von IFN- γ ist.

Um ein mögliches Mitwirken von IFN an der IE1-Antwort weiter auszuschließen, wurden durch Zugabe neutralisierender Antikörper gegen IFN- β und IFN- γ in den Zellkulturüberstand induzierter TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen möglicherweise vorhandene sezernierte IFN inaktiviert. Zusätzlich wurde der Einfluss des IE1-abhängig hochregulierten Zytokins IL-6 mit Hilfe eines neutralisierenden Antikörpers untersucht. Die Auswirkung der neutralisierenden Antikörper wurde anhand der mRNA-Akkumulation des Indikatorgens CXCL10 überprüft, welches jedoch jeweils nicht in seiner Expressionsstärke beeinflusst war (Daten nicht gezeigt, siehe Grandel, 2010).

Zusammenfassend gibt es also keinen Hinweis für eine Beteiligung von IFN-Proteinen an der IE1-Antwort. Somit wird die Induktion der IE1-abhängig regulierten Gene vermutlich nicht über die kanonische IFN-Signalweiterleitung vermittelt.

3.3.6 Bedeutung verschiedener Transkriptionsfaktoren für die IE1-abhängige

Genregulation

Um der Aufklärung des Wirkungsmechanismus von IE1 näher zu kommen, wurde im nächsten Abschnitt untersucht, inwieweit zentrale Transkriptionsfaktoren der IFN- und anderer (proinflammatorischer) Zytokin-Signalkaskaden eine Rolle bei der IE1-induzierten IFN- γ -artigen Genregulation spielen. Für die Analyse wurden die IE1-Interaktionspartner und IFN-Signaltransduktionsproteine STAT1, STAT2 und STAT3 sowie PML, das ebenfalls mit IE1 interagiert und in IFN-vermittelte Prozesse involviert ist, ausgewählt. Da einige der IE1-abhängig regulierten ISGs durch TNF- α induzierbar sind (siehe Abb. 3.13), sollte auch der Einfluss des nukleären Faktors κ B (NF κ B) als Mediator dieses Signalwegs untersucht werden. Die Auswertung der Mikroarraydaten zeigten IRF1 IE1-abhängig größer 2-fach hochreguliert (siehe Tabelle 3.5). Als Transkriptionsfaktor, der ebenfalls am IFN-Signalweg beteiligt ist (Kröger et al., 2002; Saha et al., 2010), sollte deshalb auch der Einfluss dieses Proteins analysiert werden.

Um gezielt zu untersuchen, ob IE1 zur Induktion bestimmter ISGs die Anwesenheit der genannten Faktoren benötigt, wurden siRNA-basierte Knockdown-Experimente durchgeführt. Zunächst wurde nach Transfektion von MRC-5-Zellen mit jeweils zwei verschiedenen siRNAs gegen STAT1, STAT2, STAT3 bzw. PML oder drei verschiedenen siRNAs gegen die p65-Untereinheit von NF κ B (virale reticuloendotheliosis oncogene-Homolog A, RelA) bzw. IRF1 der korrespondierende Protein-Knockdown mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Sowohl zwei als auch fünf Tage nach siRNA-Transfektion von MRC-5-Zellen konnte mit jeder spezifischen siRNA eine deutliche Reduktion der STAT-, PML- bzw. RelA-Proteinmengen im Vergleich zu Kontrolltransfektionen bzw. unbehandelten Zellen (mock) erreicht werden (siehe Abb. 3.16 A, und 3.17 A). Eine von drei getesteten siRNAs gegen IRF1 (IRF1#160) konnte keinen effizienten Knockdown vermitteln und wurde deshalb von weiteren Analysen ausgeschlossen. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle.

Der Einfluss der Protein-Depletionen auf die IE1-vermittelte Genregulation wurde zwei Tage nach siRNA-Transfektion von TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen und einer anschließenden 72-stündigen Doxycyclin-Behandlung mittels q-RT-PCR bestimmt. In den meisten induzierten TetR-IE1-Proben war die IE1-Transkriptmenge, wie erwartet, in etwa vergleichbar. Eine

Ausnahme bildete hier die PML-spezifische siRNA #141, die offenbar eine zweifache Erhöhung der IE1-mRNA-Menge bewirkte. Da sich allerdings beide PML-spezifischen siRNAs in den nachfolgenden Analysen wieder ähnlich verhielten, ist diesem Ergebnis nur eine untergeordnete Rolle beizumessen. Der spezifische Knockdown der untersuchten Gene konnte fünf Tage nach siRNA-Transfektion von TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen ebenfalls auf mRNA-Ebene bestätigt werden, sofern die korrespondierenden spezifischen Primer vorhanden waren (STAT1, STAT2, STAT3, PML und IRF1) (siehe Abb. 3.16 B, C, D und Abb. 3.17 B, D). Des Weiteren stiegen auch in diesem Experiment die mRNA-Mengen der untersuchten Gene CXCL10 und GBP4 IE1-abhängig deutlich an (siehe Abb. 3.16 B, C, D und Abb. 3.17 B, C, D).

Ein STAT1-spezifischer Knockdown führte jedoch dazu, dass die CXCL10- und GBP4-Gene gegenüber einer IE1-vermittelten Aktivierung fast komplett resistent waren (siehe Abb. 3.16 B). Im Gegensatz dazu hatte der siRNA-vermittelte Abbau von STAT2 keinen negativen Effekt auf die IE1-abhängige Genregulation (siehe Abb. 3.16 C). In beiden Fällen bewirkte der spezifische Knockdown in den TetR-Zellen keine signifikanten Veränderungen der CXCL10- und GBP4-Transkriptmengen. Dahingegen wirkte sich die Herunterregulierung von STAT3 interessanterweise stark positiv auf die Expression dieser Gene sowohl in induzierten TetR- als auch in TetR-IE1-Zellen aus (siehe Abb. 3.16 D).

Die siRNA-vermittelte Depletion von PML zeigte ebenfalls einen deutlich negativen Einfluss auf die IE1-abhängige Induktion der GBP4- und CXCL10-Transkripte. Im Gegensatz zu STAT1 hatte der PML-Knockdown allerdings auch einen negativen Effekt auf die Grundmengen von GBP4 in den TetR-Zellen wohingegen CXCL10 nicht beeinflusst war. Somit wäre eine Beteiligung von PML an der IE1-abhängigen ISG-Induktion als Kofaktor in Betracht zu ziehen.

Ein spezifischer Knockdown sowohl von RelA als auch von IRF1 reduzierte in unterschiedlichem Ausmaß ebenfalls schon die Grundmengen der IE1-abhängig regulierten ISGs CXCL10 und GBP4 in den TetR-Zellen. Ein IE1-abhängiger Anstieg der relativen mRNA-Mengen war dennoch zu beobachten. Die Maximalwerte blieben jedoch unter denen der CXCL10- bzw. GBP4-Transkriptmengen, die in mit Kontroll-siRNA transfizierten TetR-IE1-Zellen erreicht wurden. Dies ist vermutlich auf die niedrigere Ausgangsmenge der untersuchten Transkripte nach RelA- bzw. IRF1-Knockdown zurückzuführen (siehe Abb. 3.17 C und D).

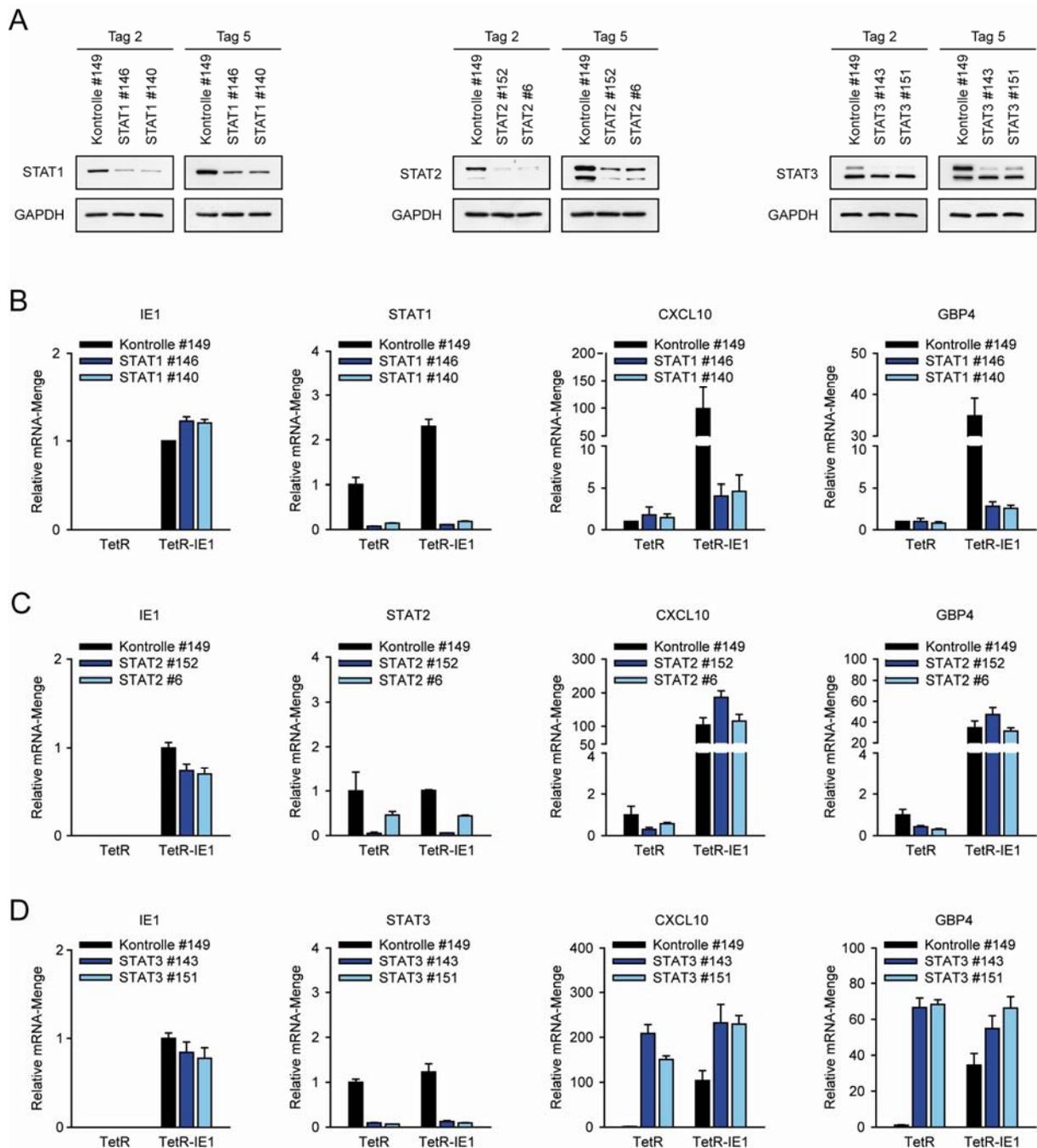


Abb. 3.16 Einfluss von STAT1, STAT2 und STAT3 auf die IE1-vermittelte Genregulation (A) MRC-5-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert, nach zwei und fünf Tagen p.t. zu Gesamtzellextrakten verarbeitet und im Western Blot-Verfahren mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. (B-D) TetR- und TetR-IE1-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs gegen STAT1 (B), STAT2 (C), STAT3 (D) bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert und zwei Tage p.t. mit Doxycyclin für insgesamt 72 h behandelt. Die relative mRNA-Menge der angegebenen Gene wurde durch q-RT-PCR mit spezifischen Primern bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten normiert auf Tubulin und im Vergleich zu TetR-Zellen (CXCL10, GBP4, STAT1, STAT2, STAT3) bzw. TetR-IE1-Zellen (IE1), die mit der Kontroll-siRNA #149 transfiziert wurden.

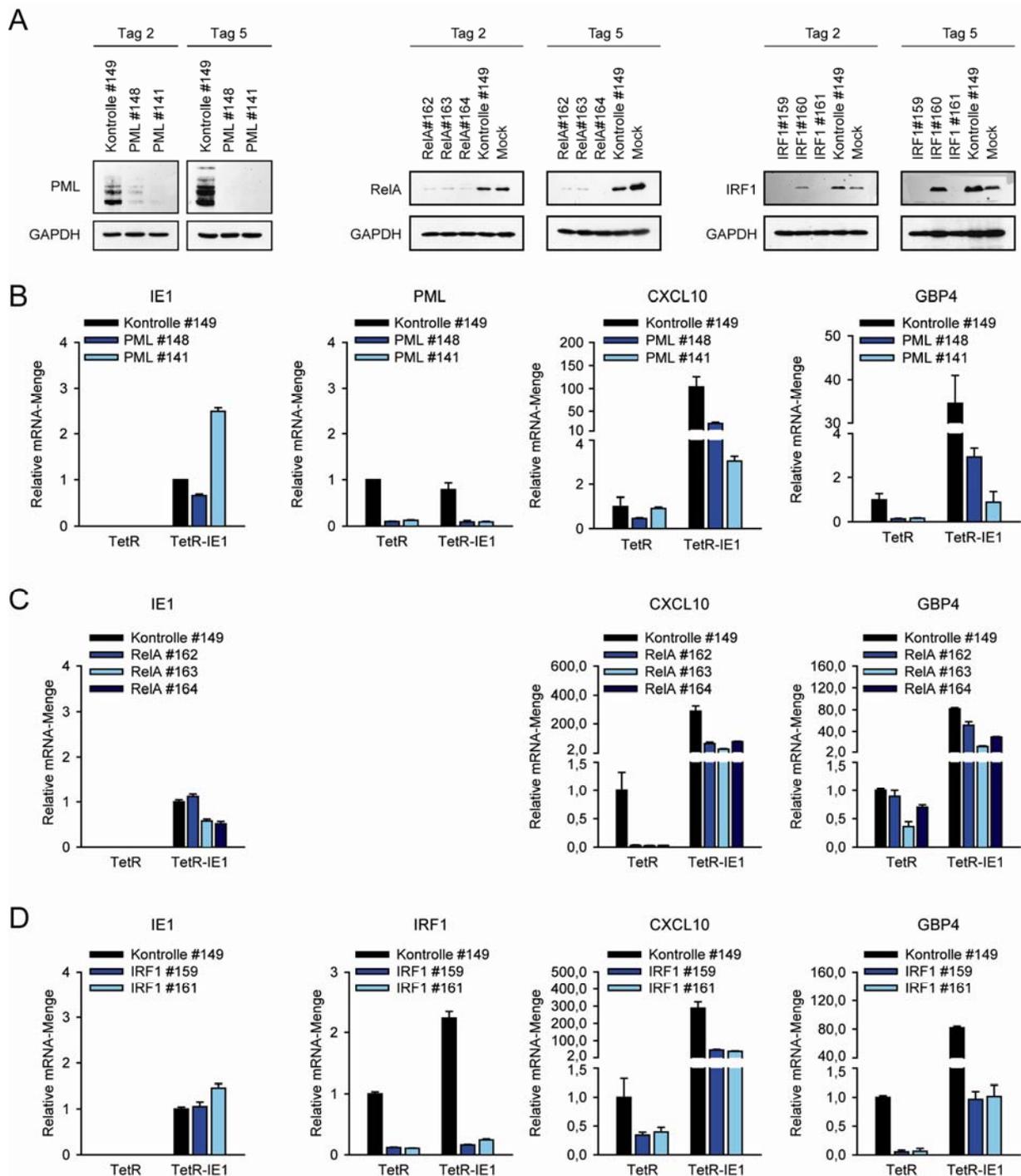


Abb. 3.17 Einfluss von PML, RelA und IRF1 auf die IE1-vermittelte Genregulation (A) MRC-5-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert, nach zwei und fünf Tagen p.t. zu Gesamtzell-extrakten verarbeitet und im Western Blot-Verfahren mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. (B-D) TetR- und TetR-IE1-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs gegen PML (B), RelA (C), IRF1 (D) bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert und zwei Tage p.t. mit Doxycyclin für insgesamt 72 h behandelt. Die relative mRNA-Menge der angegebenen Gene wurde durch q-RT-PCR mit spezifischen Primern bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten normiert auf Tubulin und im Vergleich zu TetR-Zellen (CXCL10, GBP4, IRF1, PML) bzw. TetR-IE1-Zellen (IE1), die mit der Kontroll-siRNA #149 transfiziert wurden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass STAT1 essentielle Funktionen bei der IE1-abhängigen Aktivierung der ISGs übernimmt. Im Gegensatz dazu spielen STAT2 und STAT3 - wenn überhaupt - eine untergeordnete Rolle. Eine Beteiligung vor allem von PML aber auch von NFκB und IRF1 als zusätzliche Kofaktoren der IE1-abhängigen Genregulation ist möglich. Es erscheint sehr wahrscheinlich, dass zumindest einige der IE1-vermittelten Effekte auf das humane Transkriptom mit aktivierter Jak/STAT1-Signalweiterleitung gekoppelt sind.

3.3.7 Bestimmung der subzellulären Lokalisation verschiedener Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von IE1

Die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT2, STAT3 sowie NFκB befinden sich im inaktiven Zustand hauptsächlich im Zytoplasma der Zelle und akkumulieren erst nach Aktivierung durch einen Stimulus im Zellkern, um dort die Expression von Zielgenen zu induzieren. Die Bestimmung der subzellulären Lokalisation dieser Faktoren in Abhängigkeit von IE1 könnte demzufolge weitere Hinweise auf eine Beteiligung der genannten Transkriptionsfaktoren und den zugrundeliegenden Mechanismus der IE1-vermittelten IFN-γ-artigen-Antwort geben. Im Gegensatz zu den STAT-Proteinen und NFκB liegen IRF1 und PML schon im Grundzustand konstitutiv im Zellkern vor (Kröger et al., 2002; Tavalai & Stamminger, 2008; Zhong et al., 2000b) und wurden deshalb in diese Analyse nicht mit einbezogen. Um Informationen über die subzelluläre Lokalisation der Proteine in Abhängigkeit von IE1 zu gewinnen, kamen indirekte Immunfluoreszenz-Analysen (siehe 2.7.4) sowie zelluläre Fraktionierungen mit anschließendem Western Blot-Verfahren (siehe 2.7.2 und 2.7.3) zum Einsatz.

Für die Immunfluoreszenz-Analysen wurden TetR-IE1-Zellen vor (0 h) bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten nach Doxycyclin-Behandlung fixiert. Als Kontrolle wurden TetR-Zellen für eine Stunde mit IFN-α, IFN-γ oder TNF-α induziert bzw. unbehandelt belassen und anschließend fixiert.

In nicht induzierten TetR-IE1-Zellen (0 h) zeigten die untersuchten Proteine eine diffuse zytoplasmatische Verteilung (STAT1, STAT2, NFκB) bzw. eine gleichmäßige und vornehmlich diffuse Lokalisation in Zytoplasma und Zellkern (STAT3), die vergleichbar mit dem Muster in unbehandelten TetR-Zellen waren. Die zytoplasmatische Färbung von STAT1, STAT2 bzw. NFκB veränderte sich nach Behandlung der TetR-Zellen mit IFN-γ (STAT1), IFN-α (STAT2) bzw. TNF-α (NFκB) erwartungsgemäß zugunsten einer diffusen Färbung des Zellkerns (siehe Abb. 3.18 und 3.19). Eine IE1-spezifische Färbung war ohne Doxycyclin-Behandlung nicht nachweisbar bzw. zeigte wie in vorherigen Versuchen (siehe Abb. 3.11) hauptsächlich ein fein gepunktetes nukleäres Verteilungsmuster. Ab 6 h nach Induktion

konnte bereits eine diffuse Färbung des Zellkerns aufgrund ansteigender IE1-Mengen detektiert werden. Wie in Abb. 3.18 A zu sehen ist, konzentrierte sich STAT1 interessanterweise ab ca. 24 h nach Induktion im Zellkern und konnte dort auch in steigenden Mengen bis 72 h nach Induktion nachgewiesen werden. Die Proteine STAT2 und NFκB dagegen änderten ihre subzelluläre Lokalisation in Abhängigkeit von IE1 nicht und zeigten demnach eine ausschließlich zytoplasmatische Verteilung im Verlauf der Induktion (siehe Abb. 3.18 B und 3.19). Überraschenderweise war STAT3 bereits ab 6 h nach Doxycyclin-Behandlung im Zellkern der TetR-IE1-Zellen nachweisbar und konnte im 72-stündigen Induktionsverlauf weiterhin dort detektiert werden (siehe Abb. 3.18 C).

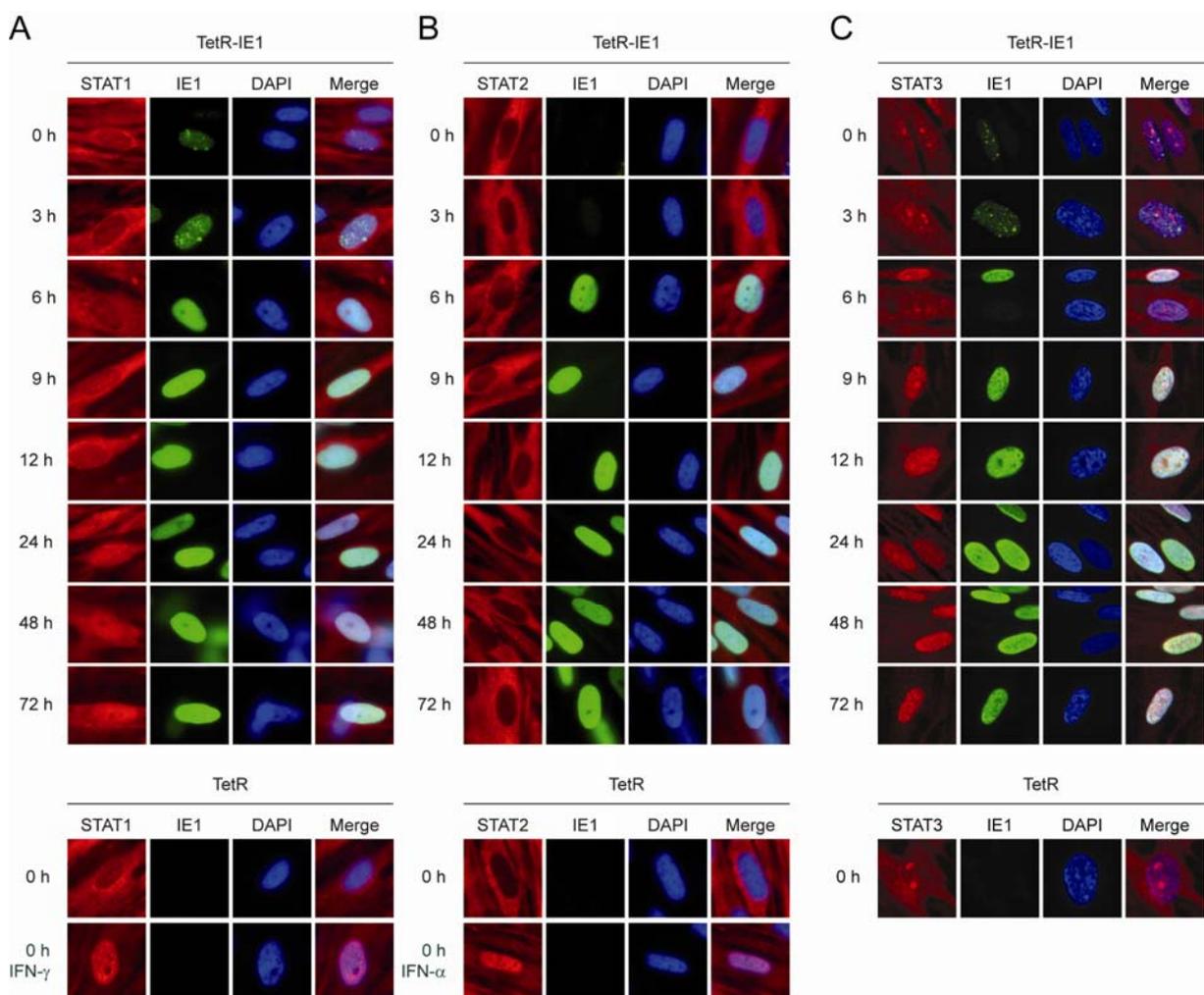


Abb. 3.18 Subzelluläre Lokalisation von STAT1, STAT2 und STAT3 in Abhängigkeit von IE1. TetR-IE1-Zellen wurden, wie angegeben, 0 h bis 72 h mit Doxycyclin behandelt, während TetR-Zellen zusätzlich für 1 h mit IFN- γ oder IFN- α behandelt wurden bzw. unbehandelt belassen blieben. Nach Methanol-Fixierung und Antikörper-vermittelter Färbung von STAT1 (A), STAT2 (B) bzw. STAT3 (C) (jeweils rot) und IE1 (grün), wurden die Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf die subzelluläre Lokalisation der STAT-Proteine hin untersucht. Die DNA wurde jeweils mit DAPI (blau) gefärbt.

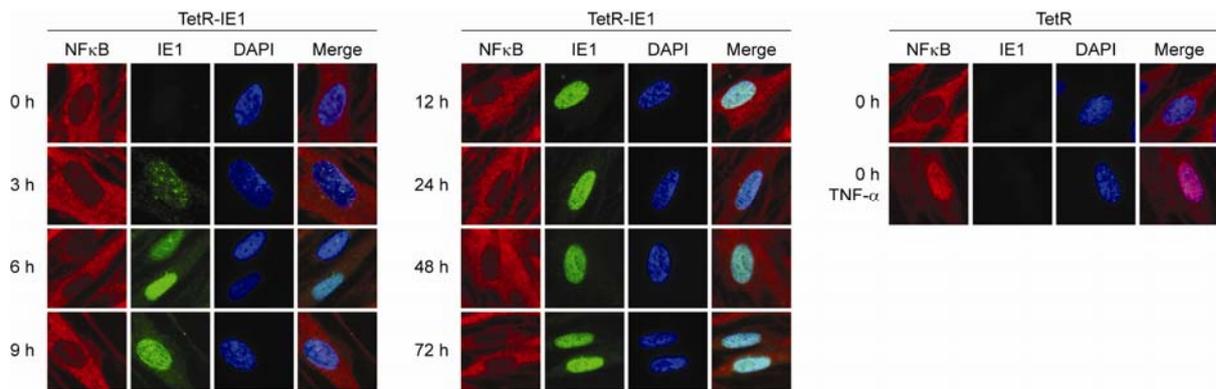


Abb. 3.19 Subzelluläre Lokalisation von NFκB in Abhängigkeit von IE1. TetR-IE1-Zellen wurden, wie angegeben, 0 h bis 72 h mit Doxycyclin behandelt, während TetR-Zellen zusätzlich für 1 h mit TNF-α behandelt wurden bzw. unbehandelt belassen blieben. Nach Methanol-Fixierung und Antikörper-vermittelter Färbung von NFκB (rot) und IE1 (grün), wurden die Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf die subzelluläre Verteilung von NFκB hin untersucht. Die DNA wurde jeweils mit DAPI (blau) gefärbt.

Die Analyse der Gleichgewichtsmengen der entsprechenden Proteine vor (0 h) bzw. nach einer 24- bzw. 72-stündigen Doxycyclin-Behandlung von TetR-IE1-Zellen erfolgte nach zellulärer Fraktionierung in Zytoplasma und Zellkern mittels Western Blot-Technik. Als Positivkontrolle wurden für 72 h induzierte TetR-IE1-Zellen insgesamt 1 h mit IFN-α, IFN-γ bzw. TNF-α inkubiert.

Der Erfolg der Fraktionierungen konnte durch immunologischen Nachweis von GAPDH, das überwiegend im Zytoplasma vorliegt und durch Histon H2A als Marker für die Kernfraktion, bestätigt werden. Ebenso lag das nukleäre IE1-Protein hauptsächlich in den Kernfraktionen vor (siehe Abb. 3.20). Zudem konnte nach Aktivierung durch IFN-α, IFN-γ bzw. TNF-α eine Anreicherung von STAT1 (IFN-α und IFN-γ), STAT2 (IFN-α) bzw. NFκB (TNF-α) in den Kernfraktionen im Vergleich zu unbehandelten (0 h) TetR-IE1-Zellkernen beobachtet werden. Konsistent mit den Daten der Immunfluoreszenz-Analyse, war eine IE1-abhängige Erhöhung der STAT1- und STAT3-Gleichgewichtsmengen im Zellkern bereits 24 h nach Induktion nachweisbar und setzte sich in zunehmendem Maße bis zum 72 h-Zeitpunkt fort. Die STAT2-Proteinmengen im Zellkern dagegen stiegen in Anwesenheit des viralen Proteins kaum an und die Gleichgewichtsmengen von NFκB in den Kernfraktionen waren gänzlich unbeeinflusst durch die IE1-Expression (siehe Abb. 3.20).

Mit Hilfe zweier unterschiedlicher Techniken konnte also gezeigt werden, dass IE1 vor allem die subzelluläre Lokalisation von STAT1 und STAT3 zugunsten einer Kernanreicherung beeinflusst. Somit ist es wahrscheinlich, dass die essentielle Funktion von STAT1 bei der IE1-vermittelten Genregulation in der Transkriptionsaktivierung der Gene liegt. Im Einklang dazu korreliert die STAT1-Kernanreicherung in etwa mit der verzögerten Kinetik der ISG-Induktion, die erst 48 h bis 72 h nach Induktion deutlich nachweisbar ist (siehe Abb. 3.12 A).

Die größtenteils gleichbleibende zytoplasmatische Verteilung von STAT2 und NFκB in Anwesenheit von IE1 verstärkt die Annahme, dass die IE1-abhängige Genregulation weitgehend unabhängig von beiden Proteinen ist. Die interessante Beobachtung, dass STAT3 IE1-abhängig im Zellkern akkumuliert, zusammen mit dem Ergebnis, dass ein STAT3-Knockdown in den Kontroll-TetR-Zellen eine IE1-ähnliche Genregulation bewirkt (siehe Abb. 3.16 D), lassen die Vermutung zu, dass das virale Protein STAT3 im Kern der Zelle sequestriert und so mit dessen Funktionen, beispielsweise als Gegenspieler von STAT1, interferiert.

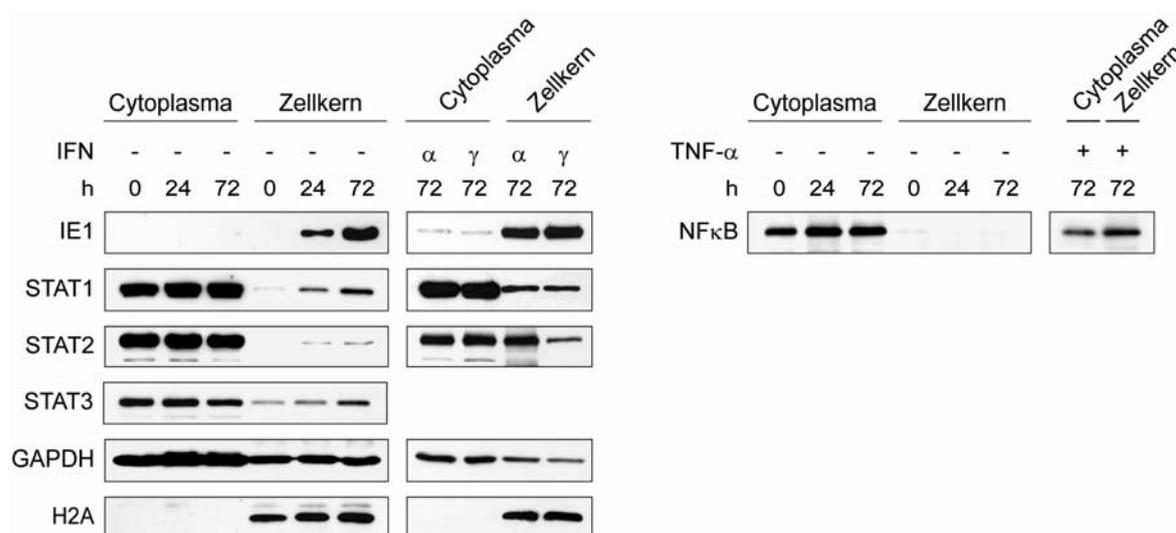


Abb. 3.20 Einfluss von IE1 auf die nukleo-zytoplasmatische Verteilung verschiedener Signaltransduktions-Proteine. Wachstumsarretierte TetR-IE1-Zellen wurden für 24 h und 72 h mit Doxycyclin behandelt bzw. unbehandelt belassen. Als Positivkontrolle wurden die für 72 h mit Doxycyclin behandelten TetR-IE1-Zellen mit IFN- α , IFN- γ bzw. TNF- α induziert. Die TetR-IE1-Zellen wurden zu den drei angegebenen Zeitpunkten geerntet und unmittelbar danach einer zellulären Fraktionierung unterzogen. Die Zytoplasma- bzw. Zellkernextrakte wurden im Western Blot-Verfahren mit geeigneten Antikörpern analysiert.

3.3.8 IE1-abhängige Assoziation von STAT1 mit Typ II ISG-Promotoren

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass das hCMV-IE1-Protein für die Aktivierung der ISGs offenbar STAT1, einen kritischen zellulären Mediator der IFN-Antwort, der IE1-abhängig im Zellkern akkumuliert, benötigt. Um weitere Informationen über den Mechanismus zu erhalten, wurde mit Hilfe der ChIP-Methode (siehe 2.7.6) analysiert, inwiefern die IE1-Expression eine Assoziation des Transkriptionsfaktors STAT1 mit den Promotoren der IE1-abhängig regulierten ISGs bewirkt. Die Untersuchung der STAT2-Assoziation wurde dabei als Kontrollanalyse mitgeführt.

Hierfür wurden wachstumsarretierte TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen für 72 h mit Doxycyclin behandelt. Als Positivkontrollen dienten TetR-Zellen, die für 24 h mit IFN- α oder IFN- γ

induziert worden waren. Die Zellen wurden anschließend mit Formaldehyd fixiert, lysiert und die DNA durch Ultraschall-Behandlung geschoren. Nach Anreicherung von STAT1- bzw. STAT2-assoziierten DNA-Fragmenten mittels STAT1- bzw. STAT2-spezifischer Antikörper erfolgte zunächst die Aufreinigung der DNA, die anschließend mit Hilfe der q-PCR analysiert wurde.

Es wurden insgesamt acht verschiedene zelluläre Genloci untersucht. Dabei handelte es sich um die transkribierten Regionen dreier IE1- bzw. IFN-unabhängig regulierter Kontrollgene (GAPDH, ribosomales Protein L30 (RPL30), Tubulin) sowie um Promotorbereiche von fünf IE1- bzw. IFN-induzierbaren Genen (GBP4, CXCL9, TAP1, IFN- α -induzierbares Protein 54kDa (IFIT2), 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase 1 (OAS1)). Um den Grad der IE1-abhängigen STAT1- bzw. STAT2-Anreicherung an den ausgewählten Loci darzustellen, wurden die ermittelten input ratio-Werte (Prozentsatz der immunpräzipitierten DNA, siehe 2.6.4) des jeweiligen Genlokus der TetR-IE1-Zellen auf die entsprechenden Werte von TetR-Zellen normiert (Grad der Anreicherung durch IE1). Analog dazu wurden die input ratio-Werte von IFN-behandelten TetR-Zellen auf die Werte von unbehandelten TetR-Zellen normiert um den Grad der Anreicherung durch IFN aufzuzeigen.

Schließlich wurde in Streudiagrammen der Anreicherungsgrad von STAT1 (siehe Abb. 3.21 A) bzw. STAT2 (siehe Abb. 3.21 B und C) an Regionen der Kontrollgene (GAPDH, RPL30, Tubulin) dem Anreicherungsgrad an Promotorbereichen der ISGs (GBP4, CXCL9, TAP1, IFIT2, OAS1) in Abhängigkeit von IE1 bzw. IFN gegenübergestellt. Darüber hinaus wurde jeweils der Mittelwert aus den einzelnen Anreicherungsgraden an Nicht-ISGs bzw. an ISGs gebildet und in den Diagrammen als waagrechte Linie dargestellt.

Wie erwartet konnte nach IFN- γ -Behandlung der Zellen im Mittel eine verstärkte Assoziation von STAT1 mit den Promotoren IFN-induzierbarer Gene im Vergleich zu den Loci der Kontrollgene beobachtet werden (siehe Abb. 3.21 A, rechtes Diagramm). Das virale IE1-Protein bewirkte ebenfalls eine Erhöhung der STAT1-Okkupanz an den ISG-Promotoren, wengleich der Anreicherungsgrad verglichen mit dem in IFN- γ -behandelten Zellen im Durchschnitt etwas geringer ausfiel (siehe Abb. 3.21 A, linkes Diagramm). Dagegen war für STAT2 keine IE1-abhängige Assoziation mit den Loci der ISGs zu erkennen (siehe 3.21 B, linkes Diagramm). IFN- γ , welches hauptsächlich die Aktivierung von STAT1 induziert, konnte wie erwartet ebenfalls keine Erhöhung der STAT2-Okkupanz an den meisten untersuchten Genregionen vermitteln (siehe Abb. 3.21 B, rechtes Diagramm). Eine Ausnahme bildete hier der TAP1-Promotorbereich, an den STAT2 teilweise assoziiert vorgefunden wurde. Möglicherweise ist dies auf eine IFN- γ -abhängige Aktivierung von STAT1/STAT2-

Heterodimeren zurückzuführen. Diese Komplexe sind zwar nach IFN- γ -Stimulation wenig abundant, können sich aber dennoch ausbilden und demzufolge auch mit ISG-Promotoren assoziieren (Bromberg & Darnell, 2000; Kalvakolanu, 2003; Wesoly et al., 2007). Nach Behandlung der Zellen mit IFN- α , das vor allem zur Ausbildung von STAT1/STAT2-Heterodimeren führt, konnte allerdings eine wesentlich stärkere Erhöhung der Okkupanz von STAT2 an den Promotorbereich von TAP1 nachgewiesen werden. Im Einklang damit, lag STAT2 nach IFN- α -Behandlung auch assoziiert mit Promotoren weiterer typischer STAT2-regulierter Gene (IFIT2, OAS1) vor (siehe Abb. 3.21 C).

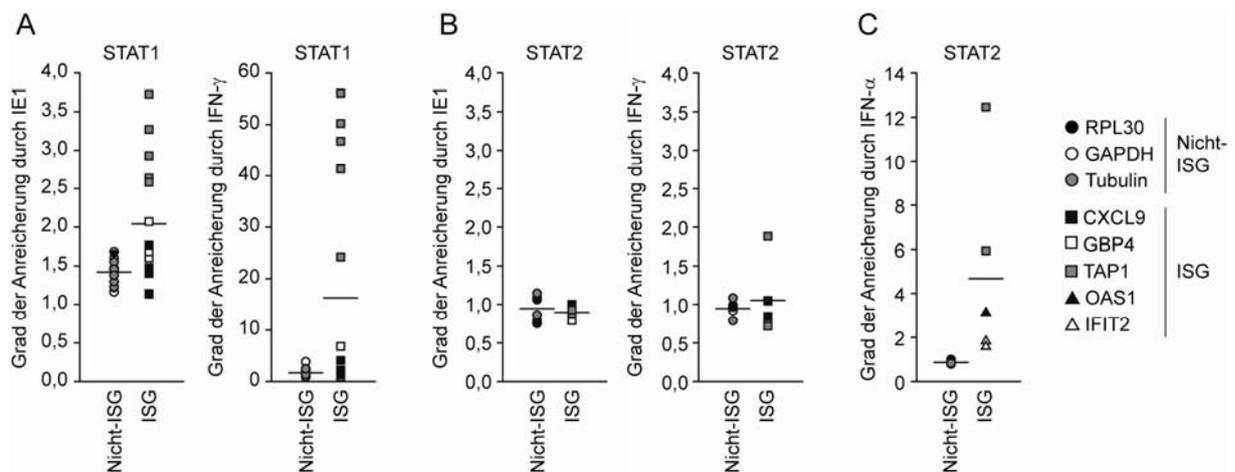


Abb. 3.21 IE1 erhöht die STAT1-Besetzung an ISG-Promotoren. Wachstumsarretierte TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin induziert. Als Positivkontrolle wurden TetR-Zellen für 24 h mit IFN- α oder IFN- γ behandelt bzw. unbehandelt belassen. Mittels ChIP wurden ausgewählte zelluläre Loci auf die STAT1- (A) bzw. STAT2-Besetzung (B-C) hin untersucht. Repräsentativ für IE1- bzw. IFN-unabhängig regulierte Gene sind GAPDH, RPL30 sowie Tubulin (Nicht-ISG); GBP4, CXCL9, TAP1, OAS1 und IFIT2 repräsentieren IE1- bzw. IFN-regulierbare Gene (ISG). Die einzelnen Symbole (Punkt, Quadrat, Dreieck) stellen Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten dar. Zur Ermittlung des Einzelwerts wurden die input ratios Doxycyclin-induzierter TetR-IE1-Zellen bzw. von IFN- γ und IFN- α behandelten TetR-Zellen auf die Werte unbehandelter TetR-Zellen normiert. Waagrechte Linie: Mittelwert aus den Einzelanalysen aller Nicht-ISG- bzw. ISG-Genregionen. Insgesamt sind die Daten aus fünf (A) oder zwei (B-C) unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die Ergebnisse fügen sich sehr gut in das Bild, das die bisherigen Beobachtungen ergaben. STAT1, welches eine essentielle Funktion bei der IE1-vermittelten Genregulation übernimmt, akkumuliert IE1-abhängig im Zellkern und assoziiert dort mit den Promotoren der IE1-induzierbaren ISGs, um vermutlich deren Transkription zu aktivieren. STAT2 hingegen, welches scheinbar keine wichtige Rolle bei der IE1-Antwort spielt, kann auch nicht IE1-abhängig mit den Promotoren der aktivierten Gene assoziiert vorgefunden werden.

3.3.9 Bedeutung der STAT1-Y₇₀₁- und S₇₂₇-Phosphorylierungsstellen für die IE1-abhängige ISG-Induktion

Wie schon in der Einleitung dargelegt, gibt es neben dem klassischen Modell der Jak-STAT-Signaltransduktion Hinweise, die auf alternative Mechanismen der Signalweiterleitung hindeuten. Mittlerweile ist beispielsweise bekannt, dass auch unphosphorylierte STAT-Proteine eine Rolle bei der Aktivierung bzw. Regulation zellulärer Prozesse spielen (Zhong et al., 2005).

Um den Wirkungsmechanismus von IE1 weiter zu untersuchen, sollte im nächsten Abschnitt geklärt werden, ob die IE1-vermittelte Induktion der ISGs von der aktiven phosphorylierten STAT1-Form und somit vermutlich von einer klassischen STAT1-Signalweiterleitung abhängt, oder ob alternative Mechanismen denkbar wären. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte bereits IE1-abhängig eine Y₇₀₁- bzw. S₇₂₇-Phosphorylierung von STAT1 in induzierten TetR-IE1-Zellen nachgewiesen werden (siehe Paulus, unveröffentlicht). Somit wäre eine Beteiligung dieser aktiven STAT1-Modifikationsformen an der IE1-Antwort möglich. Die Gleichgewichtsmenge an Y₇₀₁-phosphoryliertem STAT1 im Vergleich zur Gesamt-STAT1-Menge ist jedoch nach Induktion der IE1-Expression deutlich geringer als nach Virusinfektion oder IFN- γ - bzw. IFN- α -Stimulation der Zellen.

Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, inwieweit die Y₇₀₁- bzw. die S₇₂₇-Phosphorylierungsstellen des STAT1-Proteins tatsächlich eine Rolle bei der IE1-vermittelten Genregulation spielen. Die Überprüfung erfolgte mit Hilfe eines im Rahmen dieser Arbeit entwickelten „knockdown/knockin“ Modells. Dabei wird endogenes STAT1 in den TetR-IE1-Zellen mit Hilfe der STAT1-spezifischen siRNA#146 abgebaut und durch exogen zugeführte siRNA-resistente rekombinante STAT1-Varianten, welche zudem Mutationen im Y₇₀₁- bzw. S₇₂₇-Rest tragen, ersetzt.

Zur Etablierung dieses Modell-Systems wurden die drei STAT1-Varianten STAT1*, STAT1*_{Y701F} und STAT1*_{S727A} verwendet. Um die komplementäre Bindung der siRNA#146 an die STAT1-mRNA und somit deren Abbau zu verhindern, wurden innerhalb der STAT1-spezifischen siRNA#146-Bindestelle zwei konservative Nukleotidaustausche vorgenommen (STAT1*). Bei der Mutante STAT1*_{Y701F} wurde zusätzlich die Aminosäure Tyrosin701 gegen ein Phenylalanin ausgetauscht, so dass dieser Rest nicht mehr phosphoryliert werden kann (Liu et al., 1998; Timofeeva et al., 2006). Die Mutante STAT1*_{S727A} trägt anstelle des Serin727 ein Alanin was mit der Serin-Phosphorylierung des STAT1-Proteins interferiert (Sadzak et al., 2008; Timofeeva et al., 2006). Alle drei STAT1-Mutanten wurden als fertige Plasmidkonstrukte aus der Arbeitsgruppe übernommen (Seiler, 2010).

Ähnlich wie bei der Herstellung der TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen (siehe 3.3.1), wurden mit Hilfe von rekombinanten Retroviren die STAT1-Genvarianten STAT1*, STAT1*_{Y701F} und STAT1*_{S727A} sowie das Wildtyp STAT1 stabil in die TetR-IE1-Zellen eingebracht (siehe 2.8.7). Zur Verifizierung der rekombinanten STAT1-Proteine wurden die transgenen Zellen zunächst mit einer Kontroll-siRNA#149 bzw. mit der STAT1-spezifischen siRNA#146 transfiziert, zwei Tage nach Transfektion für 1 h mit IFN- γ behandelt, anschließend zu Gesamtzellextrakten verarbeitet und schließlich im Western Blot-Verfahren mit geeigneten Antikörpern analysiert (siehe Abb. 3.22 A).

Nach Transfektion mit der Kontroll-siRNA#149 wiesen die TetR-IE1-Zellen, welche sowohl endogenes als auch exogenes STAT1 exprimieren, wie erwartet erhöhte Mengen des STAT1-Proteins im Vergleich zu Kontroll-TetR-IE1-Zellen auf, die nur endogenes STAT1 exprimieren. Weiterhin war zu erkennen, dass nach Transfektion mit der STAT1-spezifischen siRNA#146 nur in den TetR-IE1-Zellen, welche die siRNA-resistenten STAT1-Varianten STAT1*, STAT1*_{Y701F} bzw. STAT1*_{S727A} exprimieren, STAT1 deutlich nachweisbar war. Somit kann davon ausgegangen werden, dass diese Proteine tatsächlich resistent gegenüber siRNA#146-vermittelten Abbau sind. Sowohl die Y₇₀₁-Phosphorylierung des STAT1*_{Y701F}-Proteins wie auch die S₇₂₇-Phosphorylierung des STAT1*_{S727A}-Proteins waren nach Knockdown des endogenen STAT1 nicht mehr detektierbar. Interessanterweise wurde das STAT1*_{Y701F}-Protein nach IFN- γ -Behandlung ebenfalls nicht mehr am Serinrest phosphoryliert. Dies ist konsistent mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, in denen bereits gezeigt wurde, dass die IFN- γ -vermittelte S₇₂₇-Phosphorylierung des STAT1-Proteins von einer vorausgehenden Y₇₀₁-Phosphorylierung abhängt (Sadzak et al., 2008). Die Daten der Western Blot-Analyse bestätigten also die erwarteten Eigenschaften der rekombinanten STAT1-Proteine.

Im Folgenden sollte die Bedeutung der Y₇₀₁- und der S₇₂₇-Phosphorylierungsstelle für die IE1-vermittelte Hochregulierung IFN- γ -induzierbarer Gene untersucht werden. Hierfür wurden die transgenen Zellen erneut mit der Kontroll-siRNA#149 bzw. mit der STAT1-spezifischen siRNA#146 transfiziert, zwei Tage nach Transfektion für eine Dauer von 72 h mit Doxycyclin behandelt und die mRNA-Akkumulation von IE1, STAT1 und IE1-abhängig regulierten Genen (CXCL10 und GBP4) mittels q-RT-PCR bestimmt (siehe Abb. 3.22 B).

Wie erwartet war die IE1-Transkriptmenge in den Proben weitgehend vergleichbar. Des Weiteren korrelierten die STAT1-mRNA-Messwerte mit den Proteindaten und bestätigten erneut die siRNA-Resistenz der Proteine. Aus vorherigen Experimenten ebenfalls bekannt (siehe Abb. 3.16 B), führte der STAT1-Knockdown zu einer starken Reduktion der

Expression von CXCL10 bzw. GBP4 in Doxycyclin-behandelten Kontroll-TetR-IE1-Zellen. Die Überexpression von STAT1 bzw. STAT1* in mit Kontroll-siRNA#149 transfizierten Zellen hingegen bewirkte eine Erhöhung der CXCL10- und GBP4-mRNA-Mengen. Zudem konnte der Knockdown des endogenen STAT1 durch STAT1* kompensiert werden und führte zur Wiederherstellung der IE1-abhängigen Induktion der ISGs CXCL10 und GBP4. Dieser „rescue“ unterstreicht die Spezifität des siRNA-vermittelten STAT1-Knockdowns.

Interessanterweise konnte das rekombinante Protein STAT1*^{Y701F} den Effekt der endogenen STAT1-Herunterregulierung nicht aufheben, wohingegen STAT1*^{S727A} eine fast komplette Wiederherstellung der IE1-vermittelten Genregulation bewirkte. Die Y₇₀₁-Phosphorylierungsstelle scheint also essentiell für die IE1-abhängige ISG-Induktion zu sein, im Gegensatz zum Serinrest, welcher vermutlich eher eine unterstützende Rolle für die effiziente Induktion spielt.

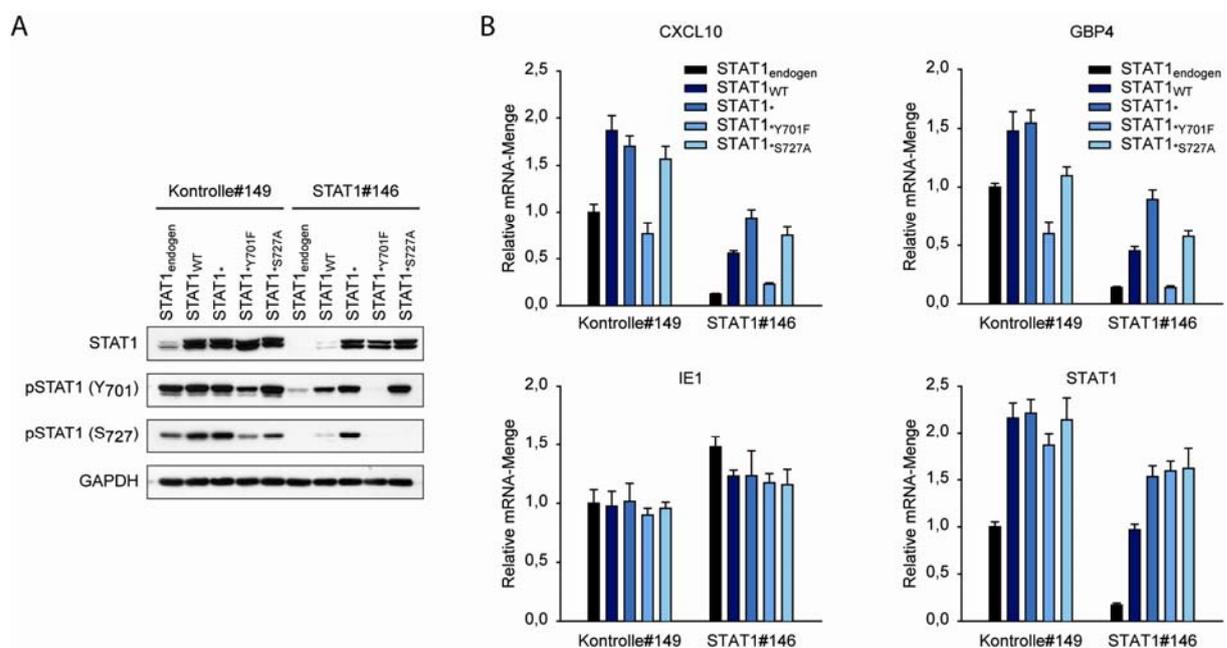


Abb. 3.22 Bedeutung der STAT1-Y₇₀₁- und S₇₂₇-Phosphorylierungsstelle für die IE1-abhängige ISG-Induktion. (A) TetR-IE1-Zellen, die exogene rekombinante STAT1-Proteine exprimieren bzw. Kontroll-TetR-IE1-Zellen (exprimieren nur das endogene STAT1) wurden mit einer Kontroll-siRNA#149 bzw. mit der STAT1-spezifischen siRNA#146 transfiziert, zwei Tage nach Transfektion für 1 h mit IFN- γ behandelt, anschließend zu Gesamtzellextrakten verarbeitet und im Western Blot-Verfahren mit geeigneten Antikörpern analysiert. (B) Die mit der Kontroll-siRNA#149 bzw. mit der STAT1-spezifischen siRNA#146 transfizierten transgenen Zellen wurden zwei Tage p.t. für 72 h mit Doxycyclin behandelt. Die relativen mRNA-Mengen der angegebenen Gene wurden durch q-RT-PCR mit spezifischen Primern bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten normiert auf Tubulin und im Vergleich zu Kontroll-TetR-IE1-Zellen, die mit der Kontroll-siRNA#149 transfiziert wurden.

Diese Ergebnisse entsprechen dem klassischen Modell der STAT1-Signalweiterleitung nach IFN-Stimulation. Die Y₇₀₁-Phosphorylierung im STAT1-Protein ist für die Vermittlung einer

IFN-Antwort essentiell, wohingegen eine Phosphorylierung am Serinrest 727 für die optimale Induktion der Zielgene benötigt wird (Decker & Kovarik, 2000). Zusammenfassend lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die IE1-vermittelte Genregulation, ähnlich wie nach IFN-Stimulation, vermutlich auch über Y₇₀₁- und S₇₂₇-phosphorylierte STAT1-Formen führt.

3.3.10 Untersuchung der IE1-abhängigen Genregulation im Kontext einer hCMV-Infektion

Neben den mechanistischen Untersuchungen der IE1-vermittelten Genregulation ist es ebenfalls wichtig, die in dieser Arbeit neu beschriebene Funktion des Proteins im viralen Lebenszyklus zu analysieren. Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen konnten bereits eine Hochregulierung einiger der IE1-abhängig induzierten Gene im Kontext einer lytischen Infektion zeigen. (Dumortier et al., 2008; Munger et al., 2006; Simmen et al., 2001; Zhu et al., 1998, 1997). Im nächsten Punkt sollte deshalb geklärt werden, inwieweit das IE1-Protein für die Induktion der Gene nach Infektion verantwortlich ist. Um dies zu untersuchen wurden die für hCMV permissiven MRC-5-Zellen mit einer IE1-Deletionsmutante (TN*d*IE1) und der dazugehörigen „Revertante“ (TN*rev*IE1) infiziert. IE1-defiziente Virusmutanten weisen unter niedrigen MOI-Bedingungen einen deutlichen Replikationsdefekt auf, wohingegen hohe Infektionsmultiplizitäten eine effiziente Wildtypvirus-ähnliche Replikation bewirken (Greaves & Mocarski, 1998; Mocarski et al., 1996). Deshalb wurden die MOI-Bedingungen so gewählt (MOI ≥ 1 PFU/Zelle und MOI = 0,01 PFU/Zelle), dass der Einfluss der IE1-Deletionsmutante auf die ISG-Expression innerhalb der beiden Zustände - Wildtypvirus-ähnliches Wachstum bzw. attenuierte Virusreplikation - untersucht werden konnte. Um Effekte auszuschließen, die auf unterschiedlich großen Mengen an nicht-infektiösen Partikeln in den verschiedenen Viruspräparationen beruhen, wurde die Analyse mit jeweils zwei unabhängig hergestellten Präparationen von TN*rev*IE1 und TN*d*IE1 durchgeführt. Nach Infektion wurde mittels q-RT-PCR die relative mRNA-Menge der ISGs CXCL10, CXCL11 und GBP4 zu den angegebenen Zeitpunkten zwischen 0 h und 72 h nach Infektion bestimmt. Wie man in Abb. 3.23 A, B und C sehen kann, waren unter allen gewählten Bedingungen keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke der repräsentativen ISGs CXCL10, CXCL11 bzw. GBP4 nach Infektion mit TN*d*IE1 im Vergleich zur TN*rev*IE1-Infektion festzustellen. Interessanterweise stieg die relative mRNA-Menge von CXCL10 zu Beginn der Infektion bis ca. 12 h p.i. an, um dann im weiteren Infektionsverlauf wieder deutlich zu sinken. GBP4 und CXCL11 zeigten eine ähnliche Induktionskinetik, wobei die mRNA-Menge von CXCL11 etwas verzögert (24 h p.i.) ihren Maximalwert erreichte.

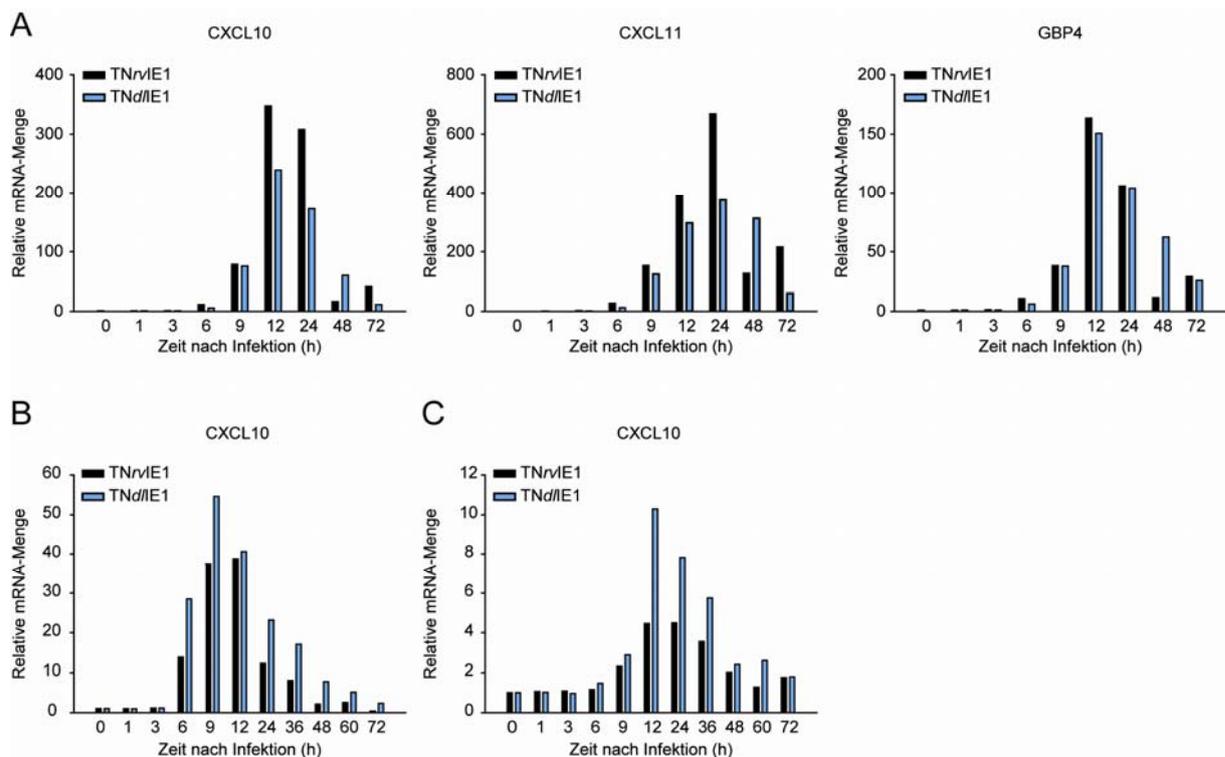


Abb. 3.23 ISG-Induktion nach Infektion mit TNrvIE1 und TNdIE1. Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden 0 h bis 72 h, wie angegeben, mit dem Wildtypvirus (TNrvIE1) bzw. einer IE1-Deletionsmutante (TNdIE1) unter verschiedenen MOI-Bedingungen und mit unterschiedlichen Viruspräparationen infiziert. Die relative mRNA-Menge von CXCL10, CXCL11 und GBP4 wurde mittels q-RT-PCR mit spezifischen Primern zu den angegebenen Zeitpunkten ermittelt, auf Tubulin normiert und im Vergleich zu nicht infizierten Zellen dargestellt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten. (A) Virus-Präparation 1, MOI > 1 PFU/Zelle; (B) Virus-Präparation 2, MOI ≥ 1 PFU/Zelle; (C) Virus-Präparation 2, MOI = 0,01 PFU/Zelle

Die IE1-abhängige Aktivierung von ISGs kann also im Kontext einer produktiven lytischen Infektion in MRC-5-Zellen unter diesen gewählten Analysebedingungen vermutlich durch redundante Funktionen weiterer viraler Faktoren ersetzt werden. Aufgrund der Induktionskinetik nach Virusinfektion müssten diese Faktoren bereits ab ca. 6 h p.i. vorliegen und könnten somit Bestandteile des Virions oder andere IE-Proteine sein.

4 Diskussion

4.1 Anwendung der RNAi-Technologie in der hCMV-Therapie

Mit der Entwicklung der RNAi-Technologie zu einer allgemein gebräuchlichen Methode in Säugetierzellen steht ein attraktives neues Instrument für innovative therapeutische Anwendungen zur Verfügung (Dallas & Vlassov, 2006; Elbashir et al., 2001). Um das Potential der RNAi-Technologie als neues Therapiekonzept gegen hCMV zu untersuchen, wurden mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Screening-Verfahrens insgesamt 40 siRNAs, die gegen virale Genprodukte gerichtet sind, bezüglich inhibitorischer Effekte auf die hCMV-Replikation untersucht. Insgesamt konnten acht siRNAs mit bemerkenswerten antiviralen Eigenschaften identifiziert werden. Die vielversprechendsten Kandidaten sind gegen die MIE-Proteine IE1 und/oder IE2 gerichtet und können die Virusreplikation spezifisch um bis zu 99,9% inhibieren (siehe Abb. 3.6 und Tabelle 3.2, 3.3). Somit konnte prinzipiell gezeigt werden, dass die RNAi-Technologie auch für den Einsatz in der hCMV-Therapie geeignet wäre. IE2 als Angriffsstelle findet bereits in der Behandlung der hCMV-assoziierten Retinitis mit dem antisense-Medikament Fomivirsen Anwendung (Steininger, 2007). Das IE1-Protein konnte dagegen als neue mögliche Zielstruktur für die hCMV-Therapie identifiziert werden. Dass diese Zielstruktur erfolgversprechend ist, wird durch Versuche im mCMV-Mausmodell bestärkt, in dem IE1-negative Viren keine Pathogenität aufweisen (Ghazal et al., 2005). Da ein langfristiges Ziel darin besteht, die siRNAs auch am Patienten anzuwenden, wurden IE1- und IE2-spezifische siRNAs in Richtung einer therapeutischen Nutzung optimiert. In diesem Zusammenhang wurden siRNAs, deren Zielsequenzen innerhalb aller annotierten hCMV-Stämme konserviert vorliegen und hohe antivirale Aktivitäten auch gegen klinisch relevante hCMV-Isolate aufweisen, ausgewählt und chemisch modifiziert (siehe Abb. 3.7, 3.9). Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Cholesterinmodifikation im sense-Strang sich nicht negativ auf das antivirale Potential der getesteten siRNAs auswirkt. Die 2'-O-Methyl-Gruppen, welche die Stabilität und Spezifität der Moleküle erhöhen sollten, verringerten allerdings die antiviralen Aktivitäten aller drei untersuchten siRNAs und sind somit als Modifikation in dieser Form für die drei verwendeten Moleküle nicht geeignet (siehe Abb. 3.9). Dies unterstreicht die Notwendigkeit, jede Art von Modifikation zunächst in Zellkultur zu testen, um die Wirksamkeit der korrespondierenden siRNAs sicher zu stellen. Der nächste Optimierungsschritt im Hinblick einer Therapieanwendung wäre, die Cholesterin-modifizierten siRNAs im Mausmodell auf ihre Membrangängigkeit zu testen. Denn neben der

Stabilisierung der siRNAs gegen nukleolytischen Abbau und einer gewünschten hohen Spezifität zählt die Aufnahme des Wirkstoffes in Gewebe oder Zellen zur größten Hürde, die es zu überwinden gilt. Während in Zellkulturversuchen die Komplexierung der siRNA mit kationischen Lipiden eine gängige Transfektionsmethode darstellt, wird für die Verwendung im Organismus intensiv an verschiedenen Trägerformulierungen geforscht. Das Spektrum reicht dabei von Polyethylenimin über polymere Nanokapseln bis hin zu Liposomen. Des Weiteren sind sowohl siRNA-Peptidkonjugate als auch Lipidmodifikationen der siRNAs, einschließlich der in dieser Arbeit verwendeten Cholesterinmodifikation, möglich (Dominska & Dykxhoorn, 2010; Kurreck, 2009). Für die hCMV-Therapie ist vor allem eine systemische Anwendung der siRNAs erwünscht, da das Virus ein breites Spektrum an Zellen infizieren und sich in fast jedem Organ ausbreiten kann (Sinzger et al., 1995). Dies ist bisher jedoch nur schwer zu erreichen. Jeder Versuch eine systemische Anwendung der siRNAs zu etablieren, muss Mechanismen enthalten, die neben der Erhöhung der Halbwertszeit, der spezifischen Verteilung an das Ziel-Organ bzw. -Gewebe, der zellulären Aufnahme und der darauffolgenden intrazytoplasmatischen Freisetzung immer noch eine effiziente spezifische Herunterregulierung der Ziel-mRNA bewirken (Vaishnav et al., 2010). Die lokale Applikation ist deutlich leichter zu bewerkstelligen. So wurde bereits gezeigt, dass unmodifizierte siRNAs in einfachem Salzpuffer, durch lokale Injektion ihre Wirkung in verschiedensten Geweben, wie beispielsweise im respiratorischen Trakt, in urogenitalen Epithelien, im zentralen Nervensystem sowie im Auge, entfalten können. Die meisten dieser Studien wurden im Mausmodell durchgeführt (Vaishnav et al., 2010). Sollte sich das zentrale Problem der zellulären Aufnahme lösen lassen, so könnte die RNAi einen wichtigen Beitrag für die Therapie von Virusinfektionen (einschließlich hCMV) und anderen Krankheiten leisten. Durch einfache Sequenzänderungen könnten siRNAs für jede neu auftretende Variante eines Virus, wie auch für völlig neue Virustypen adaptiert werden; eine Möglichkeit, die einen enormen Zeitvorteil gegenüber der klassischen Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe hätte.

4.2 Mögliche biologische Konsequenzen der IE1-vermittelten Genregulation

Um IE1 als mögliche neue Zielstruktur in der hCMV-Therapie näher zu charakterisieren, ist es vor allem wichtig Wechselwirkungen des viralen Proteins mit zellulären Genen und Proteinen zu untersuchen.

Die globale Auswirkung einer produktiven hCMV-Infektion auf das humane Transkriptom wurde bereits in verschiedenen Zelltypen untersucht (Chan et al., 2008; Dumortier et al.,

2008; Kenzelmann & Mühlemann, 2000; Munger et al., 2006; Simmen et al., 2001; Slobedman & Cheung, 2008; Zhu et al., 1998, 1997). Auch eine Transkriptomanalyse für das hCMV-Protein IE2, in der gezeigt wurde, dass IE2 vor allem die Expression E2F-induzierbarer Gene aktiviert, wurde durchgeführt (Song & Stinski, 2002). Relativ wenig ist allerdings über den Großteil der viralen Genprodukte zum Einfluss auf die zelluläre Transkription bekannt. Dies gilt auch für das virale Protein IE1. Es ist zwar schon lange anerkanntes Wissen, dass IE1 zur Aktivierung zellulärer Genprodukte beitragen kann (Davis et al., 1987; Everett, 1984), doch wurde die IE1-vermittelte Regulation bisher nur sporadisch für bestimmte Gene analysiert (Cherrington & Mocarski, 1989; Hagemeyer et al., 1992; Hayhurst et al., 1995; Margolis et al., 1995; Michelson et al., 1994; Sambucetti et al., 1989; Strååt et al., 2009; Tevethia et al., 1987; Yurochko et al., 1995). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass IE1 die Aktivierung von AP-1 (Kim et al., 1999), IL-6 (Geist & Dai, 1996), IL-8 (Murayama et al., 2000) oder NF κ B (Geist et al., 1997) induziert, was überwiegend mit Hilfe von transienten Transfektionen und Promotor-Reporter-Versuchen analysiert wurde.

Zur umfassenden Untersuchung des Einflusses von IE1 auf das humane Transkriptom, wurde mit dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten TetR-/TetR-IE1-Modellsystem, in dem vollständig funktionelles IE1 außerhalb der komplexen Situation einer Virusinfektion untersucht werden kann (siehe Abb. 3.11), eine systematische Genexpressionsanalyse durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden 25 IE1-induzierbare Gene identifiziert, die zugleich überwiegend in Korrelation mit der zellulären Typ II IFN-Antwort stehen (siehe Tabelle 3.7 und Abb. 3.13). Die proinflammatorischen Genprodukte CXCL9, CXCL10, CXCL11 und EDN1 können zum Anlocken von Immunzellen führen (Thelen & Stein, 2008). Andere sind in die Proteolyse (CTSS), den intrazellulären Transport (TAP1) oder der Zelloberflächen-Präsentation von Antigenen (HLA-DRA) involviert. CD274, TNFSF4 und TNFSF18 sind kostimulatorische Moleküle, welche die Aktivierung von Leukozyten bzw. Lymphozyten (T-Zellen eingeschlossen) begünstigen (Carreno & Collins, 2002; Lacotte et al., 2009; Nocentini et al., 2007; Rao et al., 2007; Taleb & Clément, 2007; Willett & Hosie, 2008).

Auf den ersten Blick scheint diese neu beschriebene Funktion des IE1-Proteins überraschend, da frühere Arbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe und eine weitere Studie (Huh et al., 2008) zeigten, dass IE1 der IFN- α/β -abhängigen Aktivierung bestimmter Typ I ISGs entgegenwirkt. Dadurch verleiht das Protein dem Virus eine weitgehende Resistenz gegenüber der antiviralen Typ I IFN-Antwort und trägt maßgeblich zum erfolgreichen Verlauf des produktiven hCMV-

Infektionszyklus bei (Krauss et al., 2009; Paulus et al., 2006). Somit scheint das virale IE1-Protein also spezifisch die Typ I IFN-Antwort zu blockieren und aber auf der anderen Seite Typ II ISGs zu aktivieren.

Es stellt sich nun die Frage, welchen Nutzen hCMV aus dieser neu beschriebenen Funktion des IE1-Proteins ziehen könnte. Da im Kontext einer lytischen Virusreplikation ebenfalls eine Induktion von Typ II ISGs bestätigt werden konnte (siehe Abb. 3.23), wäre eine Beteiligung der IE1-abhängigen IFN- γ -artigen Antwort am produktiven Verlauf der hCMV-Infektion denkbar. Allerdings wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke der untersuchten Gene zwischen Wildtypvirus und IE1-Deletionsmutante unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen detektiert (siehe Abb. 3.23). Dies könnte bedeuten, dass die IE1-vermittelte Genregulation in diesem System eine eher untergeordnete Rolle spielt, oder aber auch auf eine besondere Relevanz der Typ II ISG-Aktivierung hinweisen, da die Induktion eben nicht nur von einem viralen Protein abhängt. Neben der lytischen Replikation gibt es zudem noch weitere weniger gut untersuchte Stadien im viralen Lebenszyklus von hCMV, wie beispielsweise die Ausbreitung des Virus im Organismus, die Latenz-Etablierung oder die Reaktivierung aus der Latenz. Auch hier könnte die Funktion von IE1 eine IFN- γ -artige Antwort zu induzieren relevant sein.

4.2.1 Immunkontrolle

Für die Abwehr und Kontrolle von Virusinfektionen haben Säugetiere im Laufe der Evolution das IFN-System als einen effizienten, schnellen Mechanismus der angeborenen Immunantwort entwickelt. Die Koevolution zwischen Virus und Wirt führte im Gegenzug auch bei Viren zur Etablierung zahlreicher Strategien, um dieser ersten antiviralen Antwort des betroffenen Organismus erfolgreich zu entkommen (Hengel et al., 2005; Weber et al., 2004). Die Herpesviren einschließlich hCMV konnten diese Strategien perfektionieren, so dass eine vollständige Eliminierung durch die Immunantwort des Wirts verhindert wird. Doch trotz der vielen beschriebenen viralen Immunevasions-Mechanismen, behält der Wirt immer noch eine starke anti-hCMV-Immunkontrolle (Dummer et al., 1984; Gorenssek et al., 1988; Koskinen et al., 1994; Lindsley et al., 1986; Loewendorf & Benedict, 2010; Rinaldo, 1994). Das an seinen Wirt sehr gut angepasste und evolutionär sehr alte Virus scheint also die Wirtsimmunität nicht komplett zu vermeiden oder zu eliminieren, sondern stimuliert sie viel mehr durch verschiedenste Mechanismen, um das Überleben von beiden - Virus und Wirt - zu sichern. Somit könnte die IE1-induzierte IFN- γ -artige Antwort zur Immunkontrolle beitragen. Die biologischen Funktionen der Typ II ISGs sind, im Gegensatz zu den hauptsächlich

antiviral aktiven Typ I ISGs, nämlich vor allem immunstimulatorisch (Schoenborn & Wilson, 2007; Schroder et al., 2004).

4.2.2 Reaktivierung aus der Latenz

Wie alle Herpesviren kann hCMV neben dem lytischen Replikationszyklus eine lebenslange Latenz etablieren. Es ist wahrscheinlich, dass die Latenz im Organismus sowohl in Form einer kaum merklichen produktiven Infektion (Persistenz), als auch einer tatsächlichen Latenz mit stark eingeschränktem Transkriptionsprofil und ohne Virionenproduktion auftritt (Sinclair, 2008). Die Reaktivierung aus der Latenz findet regelmäßig statt. Im Gegensatz zu gesunden immunkompetenten Menschen, welche die lytische Replikation dank ihrer starken Immunantwort in Schach halten können, kann die Reaktivierung bei immunsupprimierten Menschen zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen führen (Drew, 1988; Rubin et al., 1989). Die Mechanismen, die zur Reaktivierung einer latenten hCMV-Infektion führen, sind Gegenstand aktueller Forschung. Es besteht allgemeiner Konsens darüber, dass Blutzellen der myeloiden Linie, wie beispielsweise CD34-positive Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und Monozyten latentes hCMV tragen können (Larsson et al., 1998; Mendelson et al., 1996; Taylor-Wiedeman et al., 1991, 1994). Des Weiteren ist man sich einig, dass die Zelldifferenzierung entscheidend für die Virus-Reaktivierung ist. Dies wird vermutlich durch die Differenzierungs-abhängige Regulation des MIEP bzw. weiterer IE-Promotoren vermittelt (Hahn et al., 1998; Reeves et al., 2005; Söderberg-Nauclér et al., 2001). Zudem ist bekannt, dass IFN- γ , welches unter anderem an der Differenzierung von Monozyten in Makrophagen beteiligt ist, die Reaktivierung einer latenten hCMV-Infektion induzieren kann (Söderberg-Nauclér et al., 2001). Sollte IE1 am Prozess der Reaktivierung beteiligt sein, so würde dies voraussetzen, dass das virale Protein zumindest in niedrigen Konzentrationen, z.B. aufgrund eines vorhergehenden Stimulus oder durch stochastische/sporadische Aktivität des MIEP, in latent infizierten Zellen vorliegt. Ob IE1 in latent infizierten Zellen exprimiert wird, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Arbeiten zeigen, dass die MIE-Gene während einer latenten Infektion mit hCMV nicht exprimiert werden, da der MIEP mit epigenetischen Reprimierungsmarkern stillgelegt ist (Goodrum et al., 2002; Reeves et al., 2005; Sinclair, 2008, 2010). Allerdings gibt es im Mausmodell Hinweise darauf, dass das IE1-Funktionshomolog in latent infizierten Lungenzellen selten, aber trotzdem mosaikartig über das infizierte Gewebe verteilt exprimiert wird (Kurz et al., 1999; Reddehase et al., 2002). Dabei kommt es zur Akkumulation des IE1- nicht aber des IE2-Funktionshomologs. Auch in latent mit hCMV infizierten myeloiden Vorläuferzellen konnten in 2-5% der Zellen IE-

mRNAs nachgewiesen werden, wobei es sich hauptsächlich (70–99%) um ungespleißte Transkripte handelte (Kondo et al., 1994).

Falls das IE1-Protein tatsächlich zumindest temporär in latent infizierten Zellen exprimiert werden sollte, so wären zwei verschiedene Szenarien denkbar, über die das Protein an der Reaktivierung des Virus beteiligt sein könnte: Zum einen direkt, über die Aktivierung des MIEP, oder indirekt durch Auslösen bzw. Fördern von Zelldifferenzierungen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass zwei GAS-Elemente innerhalb des MIEP für eine effiziente virale Replikation erforderlich sind (Netterwald et al., 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit neu beschriebene IE1-vermittelte Signaltransduktionskaskade ist abhängig von STAT1 (siehe Abb. 3.16 B) und, neueren Arbeiten der Arbeitsgruppe zufolge, vermutlich auch von GAS-Elementen in den Promotoren der aktivierten Gene. Somit könnte diese IE1-abhängige Kaskade im Kontext einer latenten Virusinfektion neben der Aktivierung zellulärer ISGs zur Induktion der MIE-Genexpression über die GAS-Elemente des MIEP beitragen und damit zu einer produktiven Virusreplikation führen. Ein experimenteller Ansatz zur Überprüfung dieser Hypothese könnte mit Luciferase-Reporter-Versuchen erfolgen. Mit Hilfe der TetR-IE1-Zellen und MIEP-Luciferase-Reporterkonstrukten, welche Mutationen in den GAS-Elementen tragen, könnte die IE1-abhängige Aktivierung analysiert werden.

Eine weitere Möglichkeit der Reaktivierung liegt in der Differenzierung latent infizierter Zellen. Diese kann, wie oben schon erwähnt, unter anderem durch IFN- γ -Stimulation erfolgen. Die alleinige Expression von IE1 reicht aber vermutlich auch schon aus, um das zelluläre Milieu zugunsten einer Situation vergleichbar mit der einer IFN- γ -Stimulation zu verändern. Somit könnte die IE1-abhängige Aktivierung von Typ II ISGs eine Alternative oder auch eine Art Abkürzung der IFN- γ -Kaskade darstellen, die zur Differenzierung der Zellen und damit zur Reaktivierung von hCMV aus der Latenz führt. Eine Option zur experimentellen Überprüfung bestünde in der Herstellung von Monozyten, die induzierbar IE1 exprimieren. Mit diesem Modellsystem könnte der Einfluss des viralen Proteins auf den Differenzierungsgrad und auf die hCMV-Permissivität der Zellen untersucht werden.

Die alleinige Expression von IE1 induziert unter anderem auch die Sekretion der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11, die (C-X-C Motiv) Rezeptor 3 (CXCR3)-positive Immunzellen anlocken können, was möglicherweise zur Transmigration der Zellen in das entsprechende Organ oder Gewebe und eine anschließende Differenzierung führt (Bonecchi et al., 1998; Lacotte et al., 2009; Loetscher et al., 1998; Sallusto et al., 1998; Thelen & Stein, 2008). Somit wäre eine weitere Variante denkbar, wie IE1 indirekt an der Reaktivierung beteiligt sein könnte: Latent infizierte CXCR3-positive Immunzellen wandern aufgrund des

IE1-induzierten Chemokingradienten ins Endothel ein und differenzieren dort, was zu einer Reaktivierung von hCMV aus der Latenz führen könnte.

4.2.3 Dissemination

Wie in der Einleitung schon erwähnt, breitet sich hCMV sehr effizient im Wirtsorganismus aus und vermag ein großes Spektrum an Zielzellen zu infizieren. Die Dissemination verläuft hauptsächlich zellgebunden in Zellen der myeloischen Linie (Gerna et al., 1992; Grefte et al., 1993, 1994; Sinzger et al., 1995; Sinzger & Jahn, 1996). Durch Kontakt mit Endothelzellen kann das Virus auf verschiedene Organe oder Gewebe übertragen werden (Waldman et al., 1995). Auch in diesem Zusammenhang wäre eine Beteiligung der IE1-induzierten Antwort denkbar. Das Sekretom der IE1-exprimierenden Zellen enthält Chemokine (siehe Abb. 3.12 C), die Immunzellen anlocken können (Loetscher et al., 1998). Nach chemotaktischer Rekrutierung dieser Zellen zu infiziertem Gewebe, wäre eine Übertragung des Virus möglich und die Virus-Ausbreitung könnte durch die weitere Verteilung der Zellen im Blutstrom gefördert werden. Die Untersuchung der promigratorischen Potenz des Sekretoms IE1-exprimierender Zellen könnte experimentell mit Hilfe einer modifizierten Boyden-Kammer untersucht werden (Boyden, 1962; Kohno et al., 1997; Koyama et al., 1993). Dies ist ein spezielles Zellkulturgefäß, das aus zwei Kammern, die durch eine Membran mit Porengrößen im einstelligen Mikrometerbereich getrennt sind, besteht. In die obere Kammer werden Zellen gegeben, deren Migrationsverhalten untersucht werden soll und in die untere Kammer chemotaktisch wirkende Substanzen.

4.2.4 HCMV-Pathogenese

HCMV wird zunehmend mit verschiedenen vaskulären und entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dazu zählen beispielsweise Autoimmunerkrankungen, Arteriosklerose und Myokarditis (Adam et al., 1997; Cheng et al., 2009; Dummer et al., 1994; Hendrix et al., 1991; Stassen et al., 2006). Ein Kennzeichen der Arteriosklerose ist die chronisch fortschreitende Degeneration der Arterien mit progressiven Veränderungen der Gefäßwand. Nach heutigem Kenntnisstand ist die Arteriosklerose ein inflammatorischer Prozess, in dem Immunzellen, wie Monozyten und T-Zellen, gehäuft innerhalb der Läsionen vorliegen. Es gibt sehr starke Hinweise darauf, dass dies hauptsächlich auf eine Deregulierung des komplexen Chemokin-Netzwerks zurückzuführen ist. Vor allem dem CXCR3-Rezeptor und seinen Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11, welche zur Rekrutierung von zirkulierenden und aktivierten Immunzellen an Entzündungsorte beitragen, wird eine wesentliche Rolle an diesem pathologischen Prozess zugeordnet (Lacotte et al., 2009;

Zernecke et al., 2008). Eine Beteiligung von hCMV an der Arteriosklerose wird unter anderem auch aufgrund der Sekretion inflammatorischer Chemokine von infizierten Zellen diskutiert (Dumortier et al., 2008). Somit könnte IE1 aufgrund seiner Fähigkeit eine IFN- γ -artige-Antwort zu induzieren, die unter anderem auch zur Sekretion dieser Chemokine führt, eine wichtige Rolle bei der hCMV-induzierten Immunpathogenese und bei entzündlichen Erkrankungen spielen (Cinatl et al., 1999; Craigen et al., 1997; Grundy et al., 1998; Scholz et al., 1999).

4.3 Modell der IE1-abhängigen ISG-Aktivierung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die mechanistische Untersuchung der IE1-vermittelten Genregulation gerichtet. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich ein vorläufiges Modell entwickeln (siehe Abb. 4.1).

Die IE1-abhängig induzierten Typ II ISGs häufen sich in bestimmten chromosomalen Regionen (siehe Tabelle 3.7) und weisen eine ähnliche Induktionskinetik auf, was mittels q-RT-PCR gezeigt wurde (siehe Abb. 3.12). Demnach erfolgt die Aktivierung der Gene wahrscheinlich koregulatorisch. Am plausibelsten scheint hierbei ein zweiphasiger Mechanismus mit einer Beteiligung von einem oder mehreren löslichen Faktoren, da durch Austausch des Zellkulturmediums induzierter TetR-IE1-Zellen eine deutliche Reduktion der IE1-vermittelten Genregulation beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3.14). Somit stimuliert IE1 in Phase I vermutlich die Sekretion eines bisher noch unbekanntem Faktors, wobei eine IE1-abhängige Transkriptionsaktivierung und nicht etwa eine Freisetzung aus einem bestehenden Depot das wahrscheinlichste Szenario ist. Diese Vermutung ergibt sich zum einen aus der verzögerten Kinetik der ISG-Aktivierung, die bei den meisten Genen erst ab ca. 48 h nach Induktion der IE1-Expression nachweisbar war (siehe Abb. 3.12) und zum anderen aus der Tatsache, dass eine Hauptfunktion von IE1 in der Transkriptionsaktivierung (Mocarski et al., 2007) liegt. Im Einklang damit konnte eine Hochregulierung einzelner Transkripte IE1-abhängig auch bereits 24 h nach Induktion beobachtet werden (siehe Tabelle 3.5).

Aufgrund der Transwell-Experimente scheint die IE1-vermittelte Genregulation auf IE1-exprimierende Zellen beschränkt zu sein (siehe Abb. 3.15) und kann durch den postulierten löslichen Faktor alleine nicht induziert werden. Das virale IE1-Protein wird also offenbar auch in Phase II des Prozesses benötigt. Demzufolge wäre auch eine direkte Aktivierung der IFN- γ -induzierbaren Gene durch den Transkriptionsaktivator IE1 denkbar, die allerdings eines vorausgehenden Stimulus bedarf.

Weiterhin konnte mit Hilfe von siRNA-Analysen gezeigt werden, dass STAT1 im Gegensatz zu STAT2 bzw. STAT3 eine essentielle Funktion bei der IE1-vermittelten Genregulation übernimmt (siehe Abb. 3.16). Diese Funktion wird vermutlich von Y₇₀₁- und S₇₂₇-phosphorylierten STAT1-Formen ausgeübt, was anhand des „knockdown/knockin“-Modellsystems, welches Untersuchungen zum Einfluss verschiedener STAT1-Varianten auf die IE1-abhängige Genregulation ermöglicht, dargelegt wurde (siehe Abb. 3.22).

STAT1 wird, wie in der Einleitung schon erwähnt, üblicherweise im Zuge der kanonischen IFN-Signalkaskade phosphoryliert und damit aktiviert. Western Blot-Analysen zeigten jedoch, dass die Phosphorylierung von STAT1 in induzierten TetR-IE1-Zellen offenbar mit einer wesentlich geringeren Effizienz als nach IFN-Behandlung stattfindet (Paulus, unveröffentlichte Beobachtungen). Dies könnte möglicherweise auf niedrige IFN-Konzentrationen im Sekretom IE1-exprimierender Zellen zurückzuführen sein. Bisher gibt es jedoch keinerlei Hinweise, dass IFN überhaupt an der IE1-vermittelten Genregulation beteiligt sind. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine IE1-abhängige Hochregulierung von IFN-Genen beobachtet werden und auch neutralisierende Antikörper gegen IFN- β und IFN- γ bewirkten keine Reduktion der IE1-abhängigen IFN- γ -artigen-Antwort (siehe Tabelle 3.8, 3.9 und Grandel, 2010). Zudem zählen die hier verwendeten Fibroblasten nicht zu den Zellen, die typischerweise IFN- γ produzieren (Schroder et al., 2004). Somit scheint ein alternativer Weg der STAT1-Phosphorylierung vorzuliegen. Dieser könnte durch Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise die epidermal growth factors (EGFs) ausgelöst werden. Die EGF-Rezeptoren besitzen eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität und können nach Aktivierung durch Bindung des entsprechenden Liganden unter anderem STAT1-Proteine an Y₇₀₁ phosphorylieren (David et al., 1996). Weitere mögliche Kandidaten, die als lösliche Faktoren in Frage kämen und die Aktivierung von STAT1 induzieren könnten, wären die kostimulatorischen Proteine der TNF-Familie TNFSF4 und TNFSF18, welche IE1-abhängig bereits 24 h nach Induktion hochreguliert vorliegen (siehe Tabelle 3.5). Die Liganden und Rezeptoren der TNF-Familie sind an einer Vielzahl von immunregulatorischen Abläufen beteiligt (Locksley et al., 2001). Experimentell könnte ein Mitwirken dieser Faktoren an der IE1-abhängigen ISG-Induktion unter anderem mit Hilfe von siRNA-basierten Knockdown-Analysen ermittelt werden, in denen spezifische siRNAs gegen TNFSF4, TNFSF18 bzw. EGF oder auch gegen die korrespondierenden Rezeptoren eingesetzt werden.

Des Weiteren wurde mittels IF-Analysen und zellulären Fraktionierungen eine Anreicherung von STAT1 im Zellkern IE1-exprimierender Zellen beobachtet (siehe Abb. 3.18 A und 3.20). Vergleichbar mit der klassischen Jak-STAT-Signalkaskade, könnte auch hier eine

vorangegangene Phosphorylierung von STAT1 die Homodimerisierung des Proteins bewirken, woraufhin das parallele STAT1-Dimer von Importin- $\alpha 5$ gebunden und dadurch in den Kern transportiert wird (Meyer & Vinkemeier, 2007; Reich & Liu, 2006; Sehgal, 2008). Die nukleäre Akkumulation von STAT1 könnte jedoch auch aufgrund einer Wechselwirkung mit IE1 erfolgen. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass IE1 mit dem ständig zwischen Kern und Zytoplasma pendelnden STAT1-Protein interagiert und so den Transkriptionsfaktor im Kern sequestrieren kann (Paulus et al., 2006; Meinel, unveröffentlichte Beobachtungen). Naheliegender wäre auch ein Zusammenspiel aus beiden Möglichkeiten: Aktives STAT1 transloziert Importin-abhängig in den Zellkern und bindet dort an IE1, wodurch die durchschnittliche Verweildauer im Kern verlängert wird. Das hätte wiederum eine Anreicherung von STAT1 in diesem Zellkompartiment zur Folge. Die essentielle Rolle, die IE1 in Phase II des Mechanismus einnimmt, könnte somit unter anderem auch der Beitrag zur nukleären Retention von STAT1 sein.

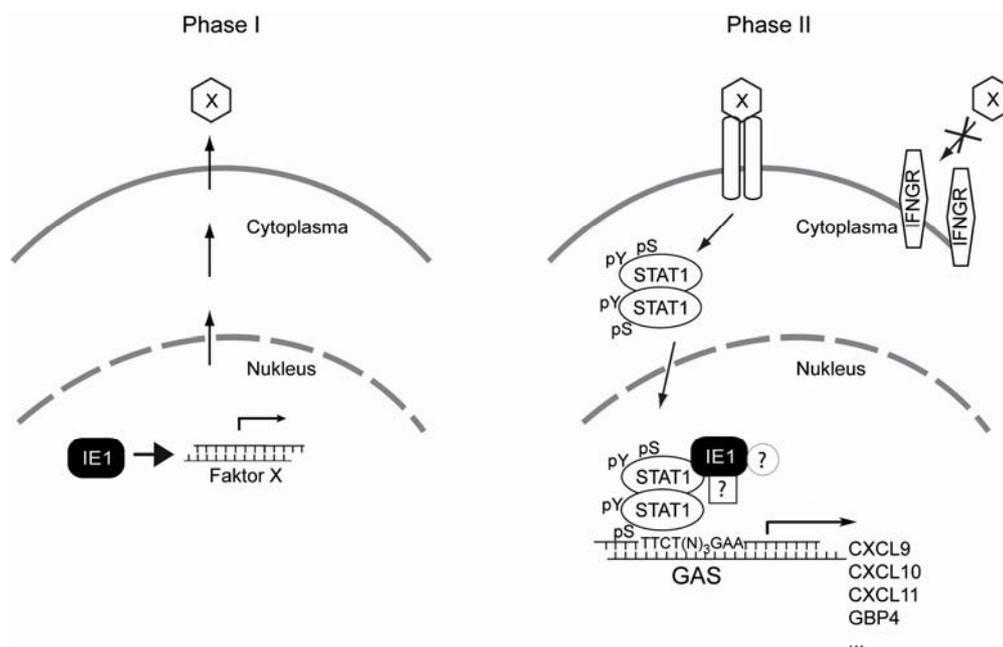


Abb. 4.1 Modell zum Mechanismus der IE1-abhängigen ISG-Aktivierung. In Phase I stimuliert IE1 die Sekretion eines löslichen Faktors (einer oder mehrere, Faktor X), der in Phase II nach Bindung an seinen Rezeptor womöglich eine Y₇₀₁- und S₇₂₇-Phosphorylierung (pY, pS) von STAT1 induziert. Eine Beteiligung von IFN- γ mit Bindung an den IFNGR (IFN- γ -Rezeptor) ist unwahrscheinlich. Das aktivierte und vermutlich parallele STAT1-Dimer wird in den Kern transportiert, wo es im Komplex mit IE1 und möglicherweise weiteren Faktoren an GAS-Elemente bindet und IFN- γ -regulierbare Gene aktiviert.

Weiterführende ChIP-Analysen zeigten, dass STAT1 offenbar in Abhängigkeit von IE1 an Promotorbereiche IE1-regulierbarer Gene bindet (siehe Abb. 3.21). Dort induziert es möglicherweise im Komplex mit IE1 und weiteren Kofaktoren die Transkription von Typ II

ISGs. Die Aktivierung der Gene ist scheinbar abhängig von GAS-Elementen im Promotorbereich, was anhand von Luciferase-Reporter-Analysen innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt wurde (Lüke & Paulus, unveröffentlichte Beobachtungen).

Da nur ein kleiner Teil der Gene mit GAS-Elementen aktiviert wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Spezifität des Mechanismus durch eine Beteiligung weiterer Proteine wie beispielsweise PML, NF κ B, IRF1 bzw. noch unbekanntem Faktoren erreicht wird (siehe Abb. 3.17).

Eine indirekte Beteiligung von STAT3 an der IE1-vermittelten Genregulation, die im Modell allerdings nicht aufgeführt ist, wäre ebenfalls in Betracht zu ziehen. Aufgrund von IF-Analysen und zellulären Fraktionierungen scheint STAT3 IE1-abhängig im Zellkern zu akkumulieren (siehe Abb. 3.18 C, 3.20). Dort interferiert IE1 möglicherweise mit den Funktionen von STAT3, da eine Herunterregulierung des Proteins in Kontroll-TetR-Zellen eine IE1-ähnliche Genregulation bewirkt (siehe Abb. 3.16 D). Aktuelle Vorstellungen zufolge ist die Gleichgewichtsmenge von STAT1 und STAT3 in den Zellen ausschlaggebend für die Antwort auf einen Stimulus. Diese beiden STAT-Proteine üben in den meisten Zelltypen antagonistische Funktionen aus, wie beispielsweise die Steuerung von Entzündungsreaktionen oder die Regulation der Zellproliferation. Je nachdem, welches STAT-Protein überwiegt, kann die Regulation in die eine oder andere Richtung erfolgen (Regis et al., 2008). Somit könnte die Expression von IE1 zur Verschiebung des Gleichgewichts der STAT-Proteine zugunsten von STAT1 beitragen und so die Aktivierung der Typ II ISGs induzieren.

Zusammenfassend konnte für das hCMV IE1-Protein in dieser Arbeit erstmals eine bisher einzigartige Modulierung einer der wichtigsten Signaltransduktionskaskaden beschrieben werden. Weitere Studien werden künftig zusätzliche Erkenntnisse über die Interaktion von IE1 mit der komplexen Jak-STAT-Signalkaskade liefern und einen Beitrag zum besseren Verständnis der Virus-Wirt-Wechselwirkung leisten können. Aber auch allgemeine biologische Prozesse, wie beispielsweise die Interaktionen („crosstalk“) zwischen verschiedenen Signalkaskaden, könnten durch weiterführende funktionelle Untersuchungen der IE1-abhängigen Genregulation möglicherweise besser verstanden werden.

Zudem bietet sich auf der Grundlage der vorliegenden Arbeit IE1 als mögliche neue Zielstruktur für antivirale Maßnahmen an, die langfristig einen wichtigen Beitrag zur Prävention und/oder Therapie von hCMV-assoziierten Krankheiten beisteuern könnten.

5 Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

- Adam, E., Melnick, J.L., DeBakey, M.E., 1997. Cytomegalovirus infection and atherosclerosis. *Cent. Eur. J. Public Health.* 5(3), 99-106.
- Adam, M.A., Miller, A.D., 1988. Identification of a signal in a murine retrovirus that is sufficient for packaging of nonretroviral RNA into virions. *J. Virol.* 62(10), 3802-3806.
- Adamo, J.E., Schröer, J., Shenk, T., 2004. Human cytomegalovirus TRS1 protein is required for efficient assembly of DNA-containing capsids. *J. Virol.* 78(19), 10221-10229.
- Ahn, J.H., Hayward, G.S., 1997. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J. Virol.* 71(6), 4599-4613.
- Alain, S., Honderlick, P., Grenet, D., Stern, M., Vadam, C., Sanson-Le Pors, M.J., Mazon, M.C., 1997. Failure of ganciclovir treatment associated with selection of a ganciclovir-resistant cytomegalovirus strain in a lung transplant recipient. *Transplantation.* 63(10), 1533-1536.
- Alcalay, M., Tomassoni, L., Colombo, E., Stoldt, S., Grignani, F., Fagioli, M., Szekely, L., Helin, K., Pelicci, P.G., 1998. The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* 18(2), 1084-1093.
- Ausubel, F.M., Brenz, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Strukl, K., 1987. *Current protocols in molecular biology.* John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., Pasquinelli, A.E., 2005. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs Results in Target mRNA Degradation. *Cell.* 122(4), 553-563.
- Barabas, S., Gary, R., Bauer, T., Lindner, J., Lindner, P., Weinberger, B., Jilg, W., Wolf, H., Deml, L., 2008. Urea-Mediated Cross-Presentation of Soluble Epstein-Barr Virus BZLF1 Protein. *PLoS Pathog.* 4(11).
- Becker, B.N., Odorico, J.S., Becker, Y.T., Levenson, G., McDermott, J.C., Grist, T., Sproat, I., Heisey, D.M., Collins, B.H., D'Alessandro, A.M., Knechtle, S.J., Pirsch, J.D., Sollinger, H.W., 1999. Peripheral vascular disease and renal transplant artery stenosis: a reappraisal of transplant renovascular disease. *Clin Transplant.* 13(4), 349-355.
- Bernardi, R., Pandolfi, P.P., 2003. Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene.* 22(56), 9048-9057.
- Bernstein, E., Denli, A.M., Hannon, G.J., 2001. The rest is silence. *RNA.* 7(11), 1509-1521.
- Birmingham, A., Anderson, E.M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., Marshall, W.S., Khvorova, A., 2006. 3[prime] UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Meth.* 3(3), 199-204.
- Bonecchi, R., Sozzani, S., Stine, J.T., Luini, W., D'Amico, G., Allavena, P., Chantry, D., Mantovani, A., 1998. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood.* 92(8), 2668-2671.
- Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G., 2009. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol. Lett.* 122(1), 1-11.
- Boriskin, Y.S., Butcher, P.D., 2001. Human cytomegalovirus UL21.5 gene is expressed as an "early-late" gene in cultured human fibroblasts. *Acta Virol.* 45(3), 185-189.
- van Boxel-Dezaire, A.H.H., Rani, M.R.S., Stark, G.R., 2006. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity.* 25(3), 361-372.
- Boyden, S., 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 115, 453-466.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Braunstein, J., Brutsaert, S., Olson, R., Schindler, C., 2003. STATs dimerize in the absence of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278(36), 34133-34140.
- Britt, W.J., 1996. Vaccines against human cytomegalovirus: time to test. *Trends Microbiol.* 4(1), 34-38.
- Bromberg, J., Darnell, J.E., 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene.* 19(21), 2468-2473.
- Card, J.P., Enquist, L.W., 1995. Neurovirulence of pseudorabies virus. *Crit Rev Neurobiol.* 9(2-3), 137-162.
- Carreno, B.M., Collins, M., 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 29-53.

- Castillo, J.P., Frame, F.M., Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Yurochko, A.D., Kowalik, T.F.**, 2005. Human cytomegalovirus IE1-72 activates ataxia telangiectasia mutated kinase and a p53/p21-mediated growth arrest response. *J. Virol.* 79(17), 11467-11475.
- Castillo, J.P., Kowalik, T.F.**, 2002. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene.* 290(1-2), 19-34.
- Chan, G., Bivins-Smith, E.R., Smith, M.S., Smith, P.M., Yurochko, A.D.**, 2008. Transcriptome analysis reveals human cytomegalovirus reprograms monocyte differentiation toward an M1 macrophage. *J. Immunol.* 181(1), 698-711.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., Shiekhattar, R.**, 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 436(7051), 740-744.
- Cheng, J., Ke, Q., Jin, Z., Wang, H., Kocher, O., Morgan, J.P., Zhang, J., Crumpacker, C.S.**, 2009. Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure. *PLoS Pathog.* 5(5), e1000427.
- Cherrington, J.M., Mocarski, E.S.**, 1989. Human cytomegalovirus iel1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J. Virol.* 63(3), 1435-1440.
- Cinatl, J., Vogel, J.U., Kotchetkov, R., Scholz, M., Doerr, H.W.**, 1999. Proinflammatory potential of cytomegalovirus infection. specific inhibition of cytomegalovirus immediate-early expression in combination with antioxidants as a novel treatment strategy? *Intervirology.* 42(5-6), 419-424.
- Cobbs, C.S., Soroceanu, L., Denham, S., Zhang, W., Kraus, M.H.**, 2008. Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity. *Cancer Res.* 68(3), 724-730.
- Coffin, J.M.**, 1992. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176, 143-164.
- Cohen, J.I., Corey, G.R.**, 1985. Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore).* 64(2), 100-114.
- Craigien, J.L., Yong, K.L., Jordan, N.J., MacCormac, L.P., Westwick, J., Akbar, A.N., Grundy, J.E.**, 1997. Human cytomegalovirus infection up-regulates interleukin-8 gene expression and stimulates neutrophil transendothelial migration. *Immunology.* 92(1), 138-145.
- Crough, T., Khanna, R.**, 2009. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(1), 76-98, Table of Contents.
- Dallas, A., Vlassov, A.V.**, 2006. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med. Sci. Monit.* 12(4), RA67-74.
- Damato, E.G., Winnen, C.W.**, 2002. Cytomegalovirus infection: perinatal implications. *J. Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 31(1), 86-92.
- David, M., Wong, L., Flavell, R., Thompson, S.A., Wells, A., Larner, A.C., Johnson, G.R.**, 1996. STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *J. Biol. Chem.* 271(16), 9185-9188.
- Davis, M.G., Kenney, S.C., Kamine, J., Pagano, J.S., Huang, E.S.**, 1987. Immediate-early gene region of human cytomegalovirus trans-activates the promoter of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84(23), 8642-8646.
- Davison, A.J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D.J., Alcendor, D.J., McGeoch, D.J., Hayward, G.S.**, 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* 84(Pt 1), 17-28.
- Decker, T., Kovarik, P.**, 2000. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene.* 19(21), 2628-2637.
- Dellaire, G., Bazett-Jones, D.P.**, 2004. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays.* 26(9), 963-977.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., Silverman, R.H.**, 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(26), 15623-15628.
- Dominska, M., Dykxhoorn, D.M.**, 2010. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J. Cell Sci.* 123(8), 1183-1189.
- Drew, W.L.**, 1988. Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev. Infect. Dis.* 10 Suppl 3, S468-476.
- Dummer, J.S., Ho, M., Rabin, B., Griffith, B.P., Hardesty, R.L., Bahnson, H.T.**, 1984. The effect of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection on T lymphocyte subsets in cardiac transplant patients on cyclosporine. *Transplantation.* 38(4), 433-435.
- Dummer, S., Lee, A., Breinig, M.K., Kormos, R., Ho, M., Griffith, B.**, 1994. Investigation of cytomegalovirus infection as a risk factor for coronary atherosclerosis in the explanted hearts of patients undergoing heart transplantation. *J. Med. Virol.* 44(3), 305-309.
- Dumortier, J., Streblov, D.N., Moses, A.V., Jacobs, J.M., Kreklywich, C.N., Camp, D., Smith, R.D., Orloff, S.L., Nelson, J.A.**, 2008. Human cytomegalovirus secretome contains factors that induce angiogenesis and wound healing. *J. Virol.* 82(13), 6524-6535.

- Dykxhoorn, D.M., Lieberman, J.**, 2006. Knocking down Disease with siRNAs. *Cell*. 126(2), 231-235.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T.**, 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*. 15(2), 188-200.
- Everett, R.D.**, 1984. Trans activation of transcription by herpes virus products: requirement for two HSV-1 immediate-early polypeptides for maximum activity. *EMBO J.* 3(13), 3135-3141.
- Everett, R.D., Chelbi-Alix, M.K.**, 2007. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie*. 89(6-7), 819-830.
- Everett, R.D., Parsy, M., Orr, A.**, 2009. Analysis of the functions of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 that are critical for lytic infection and derepression of quiescent viral genomes. *J. Virol.* 83(10), 4963-4977.
- Farrar, M.A., Schreiber, R.D.**, 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 571-611.
- Ferreiro, I., Joaquin, M., Islam, A., Gomez-Lopez, G., Barragan, M., Lombardía, L., Domínguez, O., Pisano, D.G., Lopez-Bigas, N., Nebreda, A.R., Posas, F.**, 2010. Whole genome analysis of p38 SAPK-mediated gene expression upon stress. *BMC Genomics*. 11, 144-144.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C.**, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669), 806-811.
- Gandhi, M.K., Khanna, R.**, 2004. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis.* 4(12), 725-738.
- Gawn, J.M., Greaves, R.F.**, 2002. Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a broad block to viral delayed-early gene expression. *J. Virol.* 76(9), 4441-4455.
- Geist, L.J., Dai, L.Y.**, 1996. Cytomegalovirus modulates interleukin-6 gene expression. *Transplantation*. 62(5), 653-658.
- Geist, L.J., Hopkins, H.A., Dai, L.Y., He, B., Monick, M.M., Hunninghake, G.W.**, 1997. Cytomegalovirus modulates transcription factors necessary for the activation of the tumor necrosis factor-alpha promoter. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16(1), 31-37.
- Gerna, G., Baldanti, F., Middeldorp, J., Lilleri, D.**, 2000. Use of CMV transcripts for monitoring of CMV infections in transplant recipients. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 16(4), 455-460.
- Gerna, G., Zipeto, D., Percivalle, E., Parea, M., Revello, M.G., Maccario, R., Peri, G., Milanesi, G.**, 1992. Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients. *J. Infect. Dis.* 166(6), 1236-1244.
- Ghazal, P., Visser, A.E., Gustems, M., García, R., Borst, E.M., Sullivan, K., Messerle, M., Angulo, A.**, 2005. Elimination of ie1 significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture. *J. Virol.* 79(11), 7182-7194.
- Goldmann, O., von Kockritz-Blickwede, M., Holtje, C., Chhatwal, G.S., Geffers, R., Medina, E.**, 2007. Transcriptome Analysis of Murine Macrophages in Response to Infection with *Streptococcus pyogenes* Reveals an Unusual Activation Program. *Infect. Immun.* 75(8), 4148-4157.
- Goodrum, F.D., Jordan, C.T., High, K., Shenk, T.**, 2002. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(25), 16255-16260.
- Gorensek, M.J., Stewart, R.W., Keys, T.F., McHenry, M.C., Babiak, T., Goormastic, M.**, 1988. Symptomatic cytomegalovirus infection as a significant risk factor for major infections after cardiac transplantation. *J. Infect. Dis.* 158(4), 884-887.
- Graham, F.L., van der Eb, A.J.**, 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52(2), 456-467.
- Grandel, B.**, 2010. Mechanismen der Zytomegalievirus IE1-vermittelten Aktivierung humaner Gene. Diplomarbeit. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg.
- Greaves, R.F., Mocarski, E.S.**, 1998. Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J. Virol.* 72(1), 366-379.
- Grefte, A., van der Giessen, M., van Son, W., The, T.H.**, 1993. Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J. Infect. Dis.* 167(2), 270-277.
- Grefte, A., Harmsen, M.C., van der Giessen, M., Knollema, S., van Son, W.J., The, T.H.**, 1994. Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 8), 1989-1998.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., Shiekhattar, R.**, 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 123(4), 631-640.

- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., Karin, M., 2009. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 15(2), 103-113.
- Grundy, J.E., Lawson, K.M., MacCormac, L.P., Fletcher, J.M., Yong, K.L., 1998. Cytomegalovirus-infected endothelial cells recruit neutrophils by the secretion of C-X-C chemokines and transmit virus by direct neutrophil-endothelial cell contact and during neutrophil transendothelial migration. *J. Infect. Dis.* 177(6), 1465-1474.
- Hagemeier, C., Walker, S.M., Sissons, P.J., Sinclair, J.H., 1992. The 72K IE1 and 80K IE2 proteins of human cytomegalovirus independently trans-activate the c-fos, c-myc and hsp70 promoters via basal promoter elements. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 9), 2385-2393.
- Hahn, G., Jores, R., Mocarski, E.S., 1998. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(7), 3937-3942.
- Harari, A., Rizzardi, G.P., Ellefsen, K., Ciuffreda, D., Champagne, P., Bart, P., Kaufmann, D., Telenti, A., Sahli, R., Tambussi, G., Kaiser, L., Lazzarin, A., Perrin, L., Pantaleo, G., 2002. Analysis of HIV-1- and CMV-specific memory CD4 T-cell responses during primary and chronic infection. *Blood*. 100(4), 1381-1387.
- Hayhurst, G.P., Bryant, L.A., Caswell, R.C., Walker, S.M., Sinclair, J.H., 1995. CCAAT box-dependent activation of the TATA-less human DNA polymerase alpha promoter by the human cytomegalovirus 72-kilodalton major immediate-early protein. *J. Virol.* 69(1), 182-188.
- He, L., Hannon, G.J., 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 5(7), 522-531.
- Hendrix, M.G., Daemen, M., Bruggeman, C.A., 1991. Cytomegalovirus nucleic acid distribution within the human vascular tree. *Am. J. Pathol.* 138(3), 563-567.
- Hengel, H., Koszinowski, U.H., Conzelmann, K., 2005. Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends Immunol.* 26(7), 396-401.
- Hirano, T., Ishihara, K., Hibi, M., 2000. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*. 19(21), 2548-2556.
- Hirano, T., Nakajima, K., Hibi, M., 1997. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8(4), 241-252.
- Horvath, C.M., 2004. The Jak-STAT pathway stimulated by interleukin 6. *Sci. STKE*. 2004(260), tr9.
- Huh, Y.H., Kim, Y.E., Kim, E.T., Park, J.J., Song, M.J., Zhu, H., Hayward, G.S., Ahn, J., 2008. Binding STAT2 by the acidic domain of human cytomegalovirus IE1 promotes viral growth and is negatively regulated by SUMO. *J. Virol.* 82(21), 10444-10454.
- Indraccolo, S., Pfeffer, U., Minuzzo, S., Esposito, G., Roni, V., Mandruzzato, S., Ferrari, N., Anfoso, L., Dell'Eva, R., Noonan, D.M., Chicco-Bianchi, L., Albini, A., Amadori, A., 2007. Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells. *J. Immunol.* 178(2), 1122-1135.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., Maul, G.G., 1999. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell Biol.* 147(2), 221-234.
- Ishov, A.M., Stenberg, R.M., Maul, G.G., 1997. Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J. Cell Biol.* 138(1), 5-16.
- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P.S., 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotech.* 21(6), 635-637.
- Jackson, A.L., Burchard, J., Schelter, J., Chau, B.N., Cleary, M., Lim, L., Linsley, P.S., 2006. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA*. 12(7), 1179-1187.
- Jacobs, B.L., Langland, J.O., 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*. 219(2), 339-349.
- Jacobs, J.P., Jones, C.M., Baille, J.P., 1970. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*. 227(5254), 168-170.
- Jacobson, M.A., Brecht, B.M., 2002. Association of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ T lymphocyte reactivity and protective immunity against acquired immunodeficiency syndrome-related CMV retinitis. *J. Infect. Dis.* 186(11), 1701-1702; author reply 1702-1703.
- Jang, W.G., Kim, H.S., Park, K., Park, Y.B., Yoon, K., Han, S., Hur, S., Park, K.S., Lee, I., 2004. Analysis of proteome and transcriptome of tumor necrosis factor alpha stimulated vascular smooth muscle cells with or without alpha lipoic acid. *Proteomics*. 4(11), 3383-3393.
- Kaerber, A., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 162, 480.
- Kalvakolanu, D.V., 2003. Alternate interferon signaling pathways. *Pharmacol. Ther.* 100(1), 1-29.

- Kelly, C., Van Driel, R., Wilkinson, G.W.**, 1995. Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 11), 2887-2893.
- Kenzelmann, M., Mühlemann, K.**, 2000. Transcriptome Analysis of Fibroblast Cells Immediate-Early After Human Cytomegalovirus Infection, *Journal of Molecular Biology.* 304(5), 741-751.
- Khaiboullina, S.F., Maciejewski, J.P., Crapnell, K., Spallone, P.A., Dean Stock, A., Pari, G.S., Zanjani, E.D., Jeor, S.S.**, 2004. Human cytomegalovirus persists in myeloid progenitors and is passed to the myeloid progeny in a latent form. *Br. J. Haematol.* 126(3), 410-417.
- Kim, S., Yu, S.S., Lee, I.S., Ohno, S., Yim, J., Kim, S., Kang, H.S.**, 1999. Human cytomegalovirus IE1 protein activates AP-1 through a cellular protein kinase(s). *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 4), 961-969.
- Kim, V.N.**, 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(5), 376-385.
- Kinsella, T.M., Nolan, G.P.**, 1996. Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum. Gene Ther.* 7(12), 1405-1413.
- Kishimoto, T., Akira, S., Taga, T.**, 1992. IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. *Int. J. Immunopharmacol.* 14(3), 431-438.
- Knoblach, T.**, 2006. Herstellung und molekulare Charakterisierung von humanen Zytomegalieviren mit spezifischen Mutationen im Immediate Early 1-Gen. Diplomarbeit. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg.
- Kohno, M., Yokokawa, K., Kano, H., Yasunari, K., Minami, M., Hanehira, T., Yoshikawa, J.**, 1997. Adrenomedullin is a potent inhibitor of angiotensin II-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Hypertension.* 29(6), 1309-1313.
- Kondo, K., Kaneshima, H., Mocarski, E.S.**, 1994. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(25), 11879-11883.
- Kondo, K., Mocarski, E.S.**, 1995. Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors. *Scand J Infect Dis Suppl.* 99, 63-67.
- Korioth, F., Maul, G.G., Plachter, B., Stamminger, T., Frey, J.**, 1996. The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp. Cell Res.* 229(1), 155-158.
- Koskinen, P., Lemström, K., Bruggeman, C., Lautenschlager, I., Häyry, P.**, 1994. Acute cytomegalovirus infection induces a subendothelial inflammation (endothelialitis) in the allograft vascular wall. A possible linkage with enhanced allograft arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* 144(1), 41-50.
- Kotelnikova, E., Ivanikova, N., Kalinin, A., Yuryev, A., Daraselia, N.**, 2010. Atlas of Signaling for Interpretation of Microarray Experiments. *PLoS ONE.* 5(2), e9256.
- Koyama, N., Harada, K., Yamamoto, A., Morisaki, N., Saito, Y., Yoshida, S.**, 1993. Purification and characterization of an autocrine migration factor for vascular smooth muscle cells (SMC), SMC-derived migration factor. *J. Biol. Chem.* 268(18), 13301-13308.
- Krauss, S., Kaps, J., Czech, N., Paulus, C., Nevels, M.**, 2009. Physical requirements and functional consequences of complex formation between the cytomegalovirus IE1 protein and human STAT2. *J. Virol.* 83(24), 12854-12870.
- Kröger, A., Köster, M., Schroeder, K., Hauser, H., Mueller, P.P.**, 2002. Activities of IRF-1. *J. Interferon Cytokine Res.* 22(1), 5-14.
- Kurreck, J.**, 2009. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48(8), 1378-1398.
- Kurz, S.K., Rapp, M., Steffens, H.P., Grzimek, N.K., Schmalz, S., Reddehase, M.J.**, 1999. Focal transcriptional activity of murine cytomegalovirus during latency in the lungs. *J. Virol.* 73(1), 482-494.
- Lacotte, S., Brun, S., Muller, S., Dumortier, H.**, 2009. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173, 310-317.
- Lai, E.C.**, 2002. Micro RNAs are complementary to 3[prime] UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet.* 30(4), 363-364.
- LaMorte, V.J., Dyck, J.A., Ochs, R.L., Evans, R.M.**, 1998. Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(9), 4991-4996.
- Larsson, S., Söderberg-Nauclér, C., Wang, F.Z., Möller, E.**, 1998. Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion.* 38(3), 271-278.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G.**, 2001. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics.* 73(1), 56-65.
- Leuschner, P.J.F., Ameres, S.L., Kueng, S., Martinez, J.**, 2006. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.* 7(3), 314-320.
- Levy, D.E., Darnell, J.E.**, 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(9), 651-662.

- Lim, C.P., Cao, X.**, 2006. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst.* 2(11), 536-550.
- Lindner, J., Barabas, S., Saar, K., Altmann, D., Pfister, A., Fleck, M., Deml, L., Modrow, S.**, 2005. CD4(+) T-cell responses against the VP1-unique region in individuals with recent and persistent parvovirus B19 infection. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 52(7-8), 356-361.
- Lindsley, M.D., Torpey, D.J., Rinaldo, C.R.**, 1986. HLA-DR-restricted cytotoxicity of cytomegalovirus-infected monocytes mediated by Leu-3-positive T cells. *J. Immunol.* 136(8), 3045-3051.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., Shuai, K.**, 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(18), 10626-10631.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J.**, 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 104(4), 487-501.
- Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E., Moser, B.**, 1998. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur. J. Immunol.* 28(11), 3696-3705.
- Loewendorf, A., Benedict, C.A.**, 2010. Modulation of host innate and adaptive immune defenses by cytomegalovirus: timing is everything. *J. Intern. Med.* 267(5), 483-501.
- Ludwig, A., Hengel, H.**, 2009. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro Surveill.* 14(9), 26-32.
- Mahy, B., Kangro, H.**, 1996. *Virology methods manual.* Academic Press, San Diego, CA.
- Malm, G., Engman, M.**, 2007. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med.* 12(3), 154-159.
- Mao, X., Chen, X.**, 2005. Crystallization and X-ray crystallographic analysis of human STAT1. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61(Pt 7), 666-668.
- Marchini, A., Liu, H., Zhu, H.**, 2001. Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J. Virol.* 75(4), 1870-1878.
- Margolis, M.J., Pajovic, S., Wong, E.L., Wade, M., Jupp, R., Nelson, J.A., Azizkhan, J.C.**, 1995. Interaction of the 72-kilodalton human cytomegalovirus IE1 gene product with E2F1 coincides with E2F-dependent activation of dihydrofolate reductase transcription. *J. Virol.* 69(12), 7759-7767.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., Zamore, P.D.**, 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell.* 123(4), 607-620.
- Maul, G.G., Yu, E., Ishov, A.M., Epstein, A.L.**, 1995. Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J. Cell. Biochem.* 59(4), 498-513.
- McVoy, M.A., Adler, S.P.**, 1994. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* 68(2), 1040-1051.
- Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P., Sinclair, J.**, 1996. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 12), 3099-3102.
- Mercorelli, B., Sinigaglia, E., Loregian, A., Palù, G.**, 2008. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev. Med. Virol.* 18(3), 177-210.
- Mertens, C., Darnell, J.E.**, 2007. SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell.* 131(3), 612.
- Mertens, C., Zhong, M., Krishnaraj, R., Zou, W., Chen, X., Darnell, J.E.**, 2006. Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev.* 20(24), 3372-3381.
- Meyer, T., Vinkemeier, U.**, 2007. STAT nuclear translocation: potential for pharmacological intervention. *Expert Opin. Ther. Targets.* 11(10), 1355-1365.
- Michaelis, M., Doerr, H.W., Cinatl, J.**, 2009. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia.* 11(1), 1-9.
- Michelson, S., Alcami, J., Kim, S.J., Danielpour, D., Bachelerie, F., Picard, L., Bessia, C., Paya, C., Virelizier, J.L.**, 1994. Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor beta 1. *J. Virol.* 68(9), 5730-5737.
- Miller, B.W., Morrison, A.R.**, 1999. Use of a retroviral vector for expression of a foreign gene. *Methods Mol. Biol.* 120, 1-9.
- Miller, M.S., Hertel, L.**, 2009. Onset of human cytomegalovirus replication in fibroblasts requires the presence of an intact vimentin cytoskeleton. *J. Virol.* 83(14), 7015-7028.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S.M., Nau, M.M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H.K., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., Minna, J.D.**, 1992. p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene.* 7(1), 171-180.
- Mocarski, E.S., Kemble, G.W., Lyle, J.M., Greaves, R.F.**, 1996. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(21), 11321-11326.
- Mocarski, E., Shenk, T., Pass, R.**, 2007. Cytomegaloviruses, In: Knipe, D. M., Howley, P. M. *Fields Virology*, 5. ed, vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2701-2772.

- Modrow, S., Falke, D., Schätzl, H., Truyen, U.**, 2010. *Molekulare Virologie*, 3. ed. Spektrum Akademischer Verlag.
- Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Günther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P.C., Rose-John, S.**, 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* 23(2), 473-480.
- Müller, S., Miller, W.H., Dejean, A.**, 1998. Trivalent antimonials induce degradation of the PML-RAR oncoprotein and reorganization of the promyelocytic leukemia nuclear bodies in acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Blood.* 92(11), 4308-4316.
- Munger, J., Bajad, S.U., Collier, H.A., Shenk, T., Rabinowitz, J.D.**, 2006. Dynamics of the Cellular Metabolome during Human Cytomegalovirus Infection. *PLoS Pathog.* 2(12).
- Murayama, T., Mukaida, N., Sadanari, H., Yamaguchi, N., Khabar, K.S., Tanaka, J., Matsushima, K., Mori, S., Eizuru, Y.**, 2000. The immediate early gene 1 product of human cytomegalovirus is sufficient for up-regulation of interleukin-8 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279(1), 298-304.
- Netterwald, J., Yang, S., Wang, W., Ghanny, S., Cody, M., Soteropoulos, P., Tian, B., Dunn, W., Liu, F., Zhu, H.**, 2005. Two gamma interferon-activated site-like elements in the human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer are important for viral replication. *J. Virol.* 79(8), 5035-5046.
- Nevels, M., Paulus, C., Shenk, T.**, 2004. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(49), 17234-17239.
- Nocentini, G., Ronchetti, S., Cuzzocrea, S., Riccardi, C.**, 2007. GITR/GITRL: more than an effector T cell costimulatory system. *Eur. J. Immunol.* 37(5), 1165-1169.
- Novak, U., Ji, H., Kanagasundaram, V., Simpson, R., Paradiso, L.**, 1998. STAT3 forms stable homodimers in the presence of divalent cations prior to activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247(3), 558-563.
- Okamura, K., Chung, W., Lai, E.C.**, 2008. The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs. *Cell Cycle.* 7(18), 2840-2845.
- Okamura, K., Lai, E.C.**, 2008. Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(9), 673-678.
- Pass, R.F., Stagno, S., Myers, G.J., Alford, C.A.**, 1980. Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-up. *Pediatrics.* 66(5), 758-762.
- Paulus, C., Krauss, S., Nevels, M.**, 2006. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103(10), 3840-3845.
- Paulus, C., Nitzsche, A., Nevels, M.**, 2010. Chromatinisation of herpesvirus genomes. *Rev. Med. Virol.* 20(1), 34-50.
- Persengiev, S.P., Zhu, X., Green, M.R.**, 2004. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA.* 10(1), 12-18.
- Perussia, B., Dayton, E.T., Fanning, V., Thiagarajan, P., Hoxie, J., Trinchieri, G.**, 1983. Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. *J. Exp. Med.* 158(6), 2058-2080.
- Prösch, S., Döcke, W.D., Reinke, P., Volk, H.D., Krüger, D.H.**, 1999. Human cytomegalovirus reactivation in bone-marrow-derived granulocyte/monocyte progenitor cells and mature monocytes. *Intervirology.* 42(5-6), 308-313.
- Rana, T.M.**, 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(1), 23-36.
- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., Wang, X.**, 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell.* 123(4), 621-629.
- Rao, R.M., Yang, L., Garcia-Cardena, G., Lusinskas, F.W.**, 2007. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ. Res.* 101(3), 234-247.
- Reddehase, M.J., Podlech, J., Grzimek, N.K.A.**, 2002. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J. Clin. Virol.* 25 Suppl 2, S23-36.
- Reeves, M., Sinclair, J.**, 2008. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 297-313.
- Reeves, M.B., MacAry, P.A., Lehner, P.J., Sissons, J.G.P., Sinclair, J.H.**, 2005. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(11), 4140-4145.
- Regad, T., Chelbi-Alix, M.K.**, 2001. Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene.* 20(49), 7274-7286.
- Regis, G., Pensa, S., Boselli, D., Novelli, F., Poli, V.**, 2008. Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19(4), 351-359.

- Reich, N.C., Liu, L.**, 2006. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat. Rev. Immunol.* 6(8), 602-612.
- Rinaldo, C.R.**, 1994. Modulation of major histocompatibility complex antigen expression by viral infection. *Am J Pathol.* 144(4), 637-650.
- Rubin, R.H., Lynch, P., Pasternack, M.S., Schoenfeld, D., Medearis, D.N.**, 1989. Combined antibody and ganciclovir treatment of murine cytomegalovirus-infected normal and immunosuppressed BALB/c mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33(11), 1975-1979.
- Sadzak, I., Schiff, M., Gattermeier, I., Glinitzer, R., Sauer, I., Saalmüller, A., Yang, E., Schaljo, B., Kovarik, P.**, 2008. Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(26), 8944-8949.
- Saffert, R.T., Kalejta, R.F.**, 2008. Promyelocytic leukemia-nuclear body proteins: herpesvirus enemies, accomplices, or both? *Future Virol.* 3(3), 265-277.
- Saha, B., Jyothi Prasanna, S., Chandrasekar, B., Nandi, D.**, 2010. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine.* 50(1), 1-14.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Mackay, C.R.**, 1998. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today.* 19(12), 568-574.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., Maniatis, T.**, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sambucetti, L.C., Cherrington, J.M., Wilkinson, G.W., Mocarski, E.S.**, 1989. NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J.* 8(13), 4251-4258.
- Saxena, S., Jónsson, Z.O., Dutta, A.**, 2003. Small RNAs with Imperfect Match to Endogenous mRNA Repress Translation. *Journal of Biological Chemistry.* 278(45), 44312-44319.
- Scacheri, P.C., Rozenblatt-Rosen, O., Caplen, N.J., Wolfsberg, T.G., Umayam, L., Lee, J.C., Hughes, C.M., Shanmugam, K.S., Bhattacharjee, A., Meyerson, M., Collins, F.S.**, 2004. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(7), 1892-1897.
- Schindler, C., Plumlee, C.**, 2008. Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19(4), 311-318.
- Schleiss, M.R.**, 2008. Comparison of vaccine strategies against congenital CMV infection in the guinea pig model. *J. Clin. Virol.* 41(3), 224-230.
- Schoenborn, J.R., Wilson, C.B.**, 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.* 96, 41-101.
- Scholz, M., Blaheta, R.A., Vogel, J., Doerr, H.W., Cinatl, J.**, 1999. Cytomegalovirus-induced transendothelial cell migration. a closer look at intercellular communication mechanisms. *Intervirology.* 42(5-6), 350-356.
- Schreiber, A., Härter, G., Schubert, A., Bunjes, D., Mertens, T., Michel, D.**, 2009. Antiviral treatment of cytomegalovirus infection and resistant strains. *Expert Opin Pharmacother.* 10(2), 191-209.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A.**, 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 75(2), 163-189.
- Schroeder, A., Levins, C.G., Cortez, C., Langer, R., Anderson, D.G.**, 2010. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. *J. Intern. Med.* 267(1), 9-21.
- Seeler, J.S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C., Dejean, A.**, 1998. Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(13), 7316-7321.
- Sehgal, P.B.**, 2008. Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19(4), 329-340.
- Seiler, J.**, 2010. Mechanismus der Induktion Interferon- γ -regulierter Gene durch das hCMV IE1-Protein. Diplomarbeit. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg.
- Shankaranarayanan, P., Chaitidis, P., Kühn, H., Nigam, S.**, 2001. Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* 276(46), 42753-42760.
- Shen, Y., Zhu, H., Shenk, T.**, 1997. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(7), 3341-3345.
- Silva, M.C., Yu, Q., Enquist, L., Shenk, T.**, 2003. Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. *J. Virol.* 77(19), 10594-10605.
- Simmen, K.A., Singh, J., Luukkonen, B.G., Lopper, M., Bittner, A., Miller, N.E., Jackson, M.R., Compton, T., Früh, K.**, 2001. Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(13), 7140-7145.

- Sinclair, J.**, 2008. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J. Clin. Virol.* 41(3), 180-185.
- Sinclair, J.**, 2010. Chromatin structure regulates human cytomegalovirus gene expression during latency, reactivation and lytic infection. *Biochim. Biophys. Acta.* 1799(3-4), 286-295.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H., Jahn, G.**, 1995. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 4), 741-750.
- Sinzger, C., Jahn, G.**, 1996. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology.* 39(5-6), 302-319.
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H., Williams, B.R.**, 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol.* 5(9), 834-839.
- Slobedman, B., Mocarski, E.S.**, 1999. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J. Virol.* 73(6), 4806-4812.
- Slobedman, B., Cheung, A.K.L.**, 2008. Microarrays for the study of viral gene expression during human cytomegalovirus latent infection. *Methods Mol. Med.* 141, 153-175.
- Söderberg-Nauclér, C., Nelson, J.Y.**, 1999. Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology.* 42(5-6), 314-321.
- Söderberg-Nauclér, C., Streblow, D.N., Fish, K.N., Allan-Yorke, J., Smith, P.P., Nelson, J.A.**, 2001. Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent. *J. Virol.* 75(16), 7543-7554.
- Song, Y., Stinski, M.F.**, 2002. Effect of the human cytomegalovirus IE86 protein on expression of E2F-responsive genes: a DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(5), 2836-2841.
- Sourvinos, G., Everett, R.D.**, 2002. Visualization of parental HSV-1 genomes and replication compartments in association with ND10 in live infected cells. *EMBO J.* 21(18), 4989-4997.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Röhl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Kotliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M., Vornlocher, H.**, 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* 432(7014), 173-178.
- Stark, A., Brennecke, J., Russell, R.B., Cohen, S.M.**, 2003. Identification of *Drosophila* MicroRNA Targets. *PLoS Biol.* 1(3).
- Stassen, F.R., Vega-Córdova, X., Vliegen, I., Bruggeman, C.A.**, 2006. Immune activation following cytomegalovirus infection: more important than direct viral effects in cardiovascular disease? *J. Clin. Virol.* 35(3), 349-353.
- Steininger, C.**, 2007. Novel therapies for cytomegalovirus disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2(1), 53-72.
- Strååt, K., Liu, C., Rahbar, A., Zhu, Q., Liu, L., Wolmer-Solberg, N., Lou, F., Liu, Z., Shen, J., Jia, J., Kyo, S., Björkholm, M., Sjöberg, J., Söderberg-Nauclér, C., Xu, D.**, 2009. Activation of telomerase by human cytomegalovirus. *J. Natl. Cancer Inst.* 101(7), 488-497.
- Stuurman, N., de Graaf, A., Floore, A., Josso, A., Humbel, B., de Jong, L., van Driel, R.**, 1992. A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J. Cell. Sci.* 101 (Pt 4), 773-784.
- Taga, T., Kishimoto, T.**, 1995. Signaling mechanisms through cytokine receptors that share signal transducing receptor components. *Curr. Opin. Immunol.* 7(1), 17-23.
- Taleb, S., Clément, K.**, 2007. Emerging role of cathepsin S in obesity and its associated diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45(3), 328-332.
- Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S., Leis, M., Stamminger, T.**, 2006. Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections. *J. Virol.* 80(16), 8006-8018.
- Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S., Stamminger, T.**, 2008. Nuclear domain 10 components promyelocytic leukemia protein and hDaxx independently contribute to an intrinsic antiviral defense against human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 82(1), 126-137.
- Tavalai, N., Stamminger, T.**, 2008. New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783(11), 2207-2221.
- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G., Borysiewicz, L.K., Sinclair, J.H.**, 1991. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 9), 2059-2064.
- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, P., Sinclair, J.**, 1994. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J. Virol.* 68(3), 1597-1604.

- Tevethia, M.J., Spector, D.J., Leisure, K.M., Stinski, M.F.**, 1987. Participation of two human cytomegalovirus immediate early gene regions in transcriptional activation of adenovirus promoters. *Virology*. 161(2), 276-285.
- Thelen, M., Stein, J.V.**, 2008. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat. Immunol.* 9(9), 953-959.
- Thermo Scientific**, 2008. Off-Target Effects: Disturbing the Silence of RNA interference (RNAi).
- Tiemann, K., Rossi, J.J.**, 2009. RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Molecular Medicine*. 1(3), 142-151.
- Timofeeva, O.A., Plisov, S., Evseev, A.A., Peng, S., Jose-Kampfner, M., Lovvorn, H.N., Dome, J.S., Perantoni, A.O.**, 2006. Serine-phosphorylated STAT1 is a prosurvival factor in Wilms' tumor pathogenesis. *Oncogene*. 25(58), 7555-7564.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., Zamore, P.D.**, 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*. 306(5700), 1377-1380.
- Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Grönholm, J., Palvimo, J.J., Silvennoinen, O.**, 2005. SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses. *Blood*. 106(1), 224-226.
- Vaishnav, A.K., Gollob, J., Gamba-Vitalo, C., Hutabarat, R., Sah, D., Meyers, R., de Fougerolles, T., Maraganore, J.**, 2010. A status report on RNAi therapeutics. *Silence*. 1(1), 14.
- Vanhatupa, S., Ungureanu, D., Paakkunainen, M., Silvennoinen, O.**, 2008. MAPK-induced Ser727 phosphorylation promotes SUMOylation of STAT1. *Biochem. J.* 409(1), 179-185.
- Waldman, W.J., Knight, D.A., Huang, E.H., Sedmak, D.D.**, 1995. Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: an in vitro model. *J. Infect. Dis.* 171(2), 263-272.
- Wang, R., Cherukuri, P., Luo, J.**, 2005. Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *J. Biol. Chem.* 280(12), 11528-11534.
- Watts, J.K., Deleavey, G.F., Damha, M.J.**, 2008. Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug Discov. Today*. 13(19-20), 842-855.
- Weber, F., Kochs, G., Haller, O.**, 2004. Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol.* 17(4), 498-515.
- Wenta, N., Strauss, H., Meyer, S., Vinkemeier, U.**, 2008. Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(27), 9238-9243.
- Wesoly, J., Szweykowska-Kulinska, Z., Bluysen, H.A.R.**, 2007. STAT activation and differential complex formation dictate selectivity of interferon responses. *Acta Biochim. Pol.* 54(1), 27-38.
- Wilkinson, G.W., Kelly, C., Sinclair, J.H., Rickards, C.**, 1998. Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 5), 1233-1245.
- Willett, B.J., Hosie, M.J.**, 2008. Chemokine receptors and co-stimulatory molecules: unravelling feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123(1-2), 56-64.
- Winterling, C.**, 2009. Einfluss des Zytomegalievirus IE1-Proteins auf die virale Chromatinstruktur und die zelluläre DNA-Schadensantwort. Diplomarbeit. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg.
- Yang, D.P., Goldberg, K.M., Ma, X., Magargle, W., Rappaport, R.**, 1998. Development of a Fluorescent Focus Identification Assay Using Serotype-Specific Monoclonal Antibodies for Detection and Quantitation of Rotaviruses in a Tetravalent Rotavirus Vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5(6), 780-783.
- Yarilina, A., Ivashkiv, L.B.**, 2010. Type I interferon: a new player in TNF signaling. *Curr. Dir. Autoimmun.* 11, 94-104.
- Yekta, S., Shih, I., Bartel, D.P.**, 2004. MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 304(5670), 594-596.
- Yu, D., Silva, M.C., Shenk, T.**, 2003. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100(21), 12396 -12401.
- Yuan, Z., Guan, Y., Chatterjee, D., Chin, Y.E.**, 2005. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*. 307(5707), 269-273.
- Yurochko, A.D., Kowalik, T.F., Huong, S.M., Huang, E.S.**, 1995. Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *J. Virol.* 69(9), 5391-5400.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P.**, 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 101(1), 25-33.
- Zernecke, A., Shagdarsuren, E., Weber, C.**, 2008. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28(11), 1897-1908.

- Zhong, M., Henriksen, M.A., Takeuchi, K., Schaefer, O., Liu, B., ten Hoeve, J., Ren, Z., Mao, X., Chen, X., Shuai, K., Darnell, J.E.**, 2005. Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(11), 3966-3971.
- Zhong, S., Müller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., Pandolfi, P.P.**, 2000a. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood.* 95(9), 2748-2752.
- Zhong, S., Salomoni, P., Pandolfi, P.P.**, 2000b. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat. Cell Biol.* 2(5), E85-90.
- Zhu, H., Cong, J.P., Mamtora, G., Gingeras, T., Shenk, T.**, 1998. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(24), 14470-14475.
- Zhu, H., Cong, J.P., Shenk, T.**, 1997. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(25), 13985-13990.
- Zhu, H., Shen, Y., Shenk, T.**, 1995. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J. Virol.* 69(12), 7960-7970.
- Zimmermann, T.S., Lee, A.C.H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M.N., Harborth, J., Heyes, J.A., Jeffs, L.B., John, M., Judge, A.D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L.V., Palmer, L.R., Racie, T., Röhl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., Sood, V., Soutschek, J., Toudjarska, I., Wheat, A.J., Yaworski, E., Zedalis, W., Koteliansky, V., Manoharan, M., Vornlocher, H., MacLachlan, I.**, 2006. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* 441(7089), 111-114.

5.2 Abkürzungsverzeichnis

Soweit nicht anders verzeichnet, folgen die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen den Empfehlungen des Duden, dem Gold Book der IUPAC (inklusive physikalische Größen und Einheiten) (<http://goldbook.iupac.org>) und dem White Book der JCBN (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bibliog/white.html>) (einschließlich Abkürzungen der Nukleotide und Aminosäuren).

ANKRD1	ankyrin repeat domain 1	HBG1	Hämoglobin Gamma A
BACmid	bacterial artificial chromosome	hCMV	humanes Cytomegalievirus
BLM	Bloom-Syndrom	HDAC3	Histondeacetylase 3
Bp	Basenpaar	hDaxx	humanes Todes-Domänen assoziierte Protein
BSA	bovines Serumalbumin	HES1	hairy and enhancer of split 1
C4A	complement component 4A	HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
Cam	Chloramphenicol	HRP	Meerrettichperoxidase
CBP	CREB-Bindeprotein	HRSP12	heat-responsive protein 12
CCDC3	coiled-coil domain containing 3	HSV-1	Herpes-Simplex-Virus
CCL11	C-C Motiv-Ligand 11	ICP	infected cell protein
CD274	CD274-Molekül	IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1
CHI3L1	chitinase 3-like 1	IE	immediate early
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation	IF	Immunfluoreszenz
CHL1	close homolog of L1	IFI44L	IFN-induced protein 44-like
CRM1	chromosome region maintenance 1	IFIT2	IFN- α -induced protein 54kDa
CSK	cytoskeleton	IFIT3	IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
CTSS	cathepsin S	IFN	Interferon
CXCL	C-X-C Motiv-Ligand	IFNGR	IFN- γ -Rezeptor
DAPI	4,6 Diamidino-2-phenylindol	Ig	Immunglobulin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	IL	Interleukin
dsRNA	doppelsträngige RNA	IRF1	IFN regulatory factor 1
E	early	IRS	internal repeat short
E.coli	Escherichia coli	ISG	IFN-stimulated gene
EBV	Epstein-Barr-Virus	ISGF3	IFN-stimulated gene factor 3
EDN1	Endothelin 1	ISRE	IFN-stimulated response element
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Jak	Janus-Kinase
EGFP	enhanced green fluorescent protein	Kan	Kanamycin
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat	L	late
EL	early late	LB	Luria-Bertani
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	LIF	Leukämie inhibitorischer Faktor
et al	und andere	Luc	Luciferase
FBS	fötales Rinderserum	mCMV	murines Cytomegalievirus
FFA	Fluoreszenz-Fokus-Assay	MIE	major immediate early
FRT	Flp recognition target	MIEP	major immediate early promotor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	miRNA	microRNA
GB	Glykoprotein B	MOI	multiplicity of infection
GBP	Guanylat Binde-Protein	mRNA	messenger RNA
GL	Glykoprotein L	ND10	nukleäre Domäne 10

NFκB	nukleärer Faktor κB	RPL30	Ribosomales Protein L30
NK-Zellen	natürliche Killerzellen	SCN3A	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit
NLS	nukleäres Lokalisationssignal	SDS	Natriumdodecylsulfat
NP	Nukleoplasma	SERTAD4	SERTA domain containing 4
Nt	Nukleotid	SH2	src-Homologie 2 Domäne
OAS1	2',5'-Oligoadenylat-Synthetase 1	shRNA	short hairpin RNA
OD	optische Dichte	siRNA	small interfering RNA
OSM	Oncostatin M	SLC4A4	solute carrier family 4
p.i.	post infection	SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	STAT	signal transducer and activator of transcription
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	SUMO	small ubiquitin-like modifier
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung	TAP1	Transporter 1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	TCID	tissue culture infectious dose
PDE1A	Phosphodiesterase 1A	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
PFA	Paraformaldehyd	TetR	Tetracyclin-Repressor
PFU	plaque forming unit	TMOD1	tropomodulin 1
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat	TN	hCMV-Stamm Towne
PML	Promyelozytische Leukämie	TNFSF	Tumor-Nekrose-Faktor Superfamilie
pp	Phosphoprotein	TNXB	tenascin XB
pRB	Retinoblastom-Protein	TRBP	HIV-transactivating response RNA-binding protein
PTGFR	Prostaglandin F Rezeptor	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
q-RT-PCR	quantitative reverse Transkriptase-PCR	TRS	terminal repeat short
RASL11A	RAS-like, family 11, member A	TUBB	Tubulin
RelA	virale reticuloendotheliosis oncogene-Homolog A	Tyk	Tyrosinkinase
rev	Revertante	UL	unique long
RISC	RNA-induced silencing complex	US	unique short
RLU	relative Lichteinheit	WB	Western Blot
RNA	Ribonukleinsäure	wt	Wildtyp
RNAi	RNA-Interferenz	ZP	Zytoplasma

5.3 Veröffentlichungen

Posterpräsentationen bei Fachtagungen

T. Knoblach, B. Grandel, C. Paulus, M. Nevels “STAT1-and PML-Dependent Proinflammatory Gene Expression Triggered by the HCMV IE1 Protein” Fourth European Congress of Virology, Cernobbio (Italy) 2010

Vorträge bei Fachtagungen

M. Nevels, T. Knoblach, J. Schroer, C. Paulus “RNA Interference Targets” Target Herpes Meeting, Erlangen 2007

T. Knoblach, J. Schroer, C. Paulus, M. Nevels “Down Regulation of Viral and Cellular Targets by RNAi to Inhibit HCMV-Replication”, Target Herpes Meeting, Regensburg 2008

M. Nevels, T. Knoblach, J. Schroer, C. Paulus “Basic Set of Antiviral siRNA Reagents” Target Herpes Meeting, Glasgow (Scotland) 2008

T. Knoblach, J. Schroer, C. Paulus, M. Nevels “Generation of an Optimised Set of Antiviral siRNA Reagents” Target Herpes Meeting, Düsseldorf 2009

T. Knoblach, B. Grandel, C. Paulus, M. Nevels “Optimised Set of Antiviral siRNA Reagents and Effects of IE1 on the Human Transcriptome” Target Herpes Meeting, Neapel (Italy) 2009

Artikel in Fachzeitschriften

T. Knoblach, B. Grandel, J. Seiler, F. Lüke, C. Paulus, M. Nevels “Human Cytomegalovirus IE1 Protein Elicits a Type II Interferon-Like Host Cell Response in the Absence of Interferon” wird in Kürze eingereicht bei PLoS Pathogen

Danksagung

Frau Dr. Christina Paulus und **Herrn PD Dr. Michael Nevels** danke ich sehr herzlich für die hervorragende und engagierte Betreuung der Arbeit. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft war mir eine große Motivation. Die wertvollen Tipps und Anregungen sowie ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion ermöglichten mir ein breites Methodenspektrum anzueignen sowie strukturiert und kritisch mit generierten Daten umzugehen. Dies hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Zudem möchte ich mich herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Herrn PD Dr. Michael Nevels danke ich außerdem für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner danke ich vielfach für die Übernahme des Erstgutachtens, die für eine „externe“ Promotion unerlässlich war.

Besonderer Dank gebührt auch **Herrn Prof. Dr. Hans Wolf** für die sehr guten Arbeitsbedingungen im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene.

Bei allen ehemaligen und aktuellen **Mitgliedern der Arbeitsgruppe** bedanke ich mich herzlich für die große Hilfsbereitschaft und die super Arbeitsatmosphäre, die den Laboralltag sehr angenehm gestaltet hat. Insbesondere möchte ich **Jana Seiler** für die Bereitstellung der Plasmidkonstrukte sowie **Benedikt Grandel** und **Nathalie Czech** danken. **Alexandra Nitzsche** und **Katrin Mücke** möchte ich für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit und für ihr immer offenes Ohr bei allen erdenklichen Fragen danken. Herzlichen Dank auch an **Ines Tschertner** und **Kaddi Bernhard** für die fränkische Unterstützung im Labor.

Ein herzlicher Dank gilt auch allen nicht namentlich genannten **Kolleginnen und Kollegen** am Institut für die freundliche Zusammenarbeit.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen **Freunden**, meiner **Familie** und ganz besonders **Andy** für die Unterstützung während der Promotion bedanken.