

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk

**Die Rolle der Proteinkinase RIP1
bei Infektionen durch das humane
Cytomegalievirus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Hanna Rabia Khan

aus Bochum

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
10.12.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Garten

1. Korreferent: Prof. Dr. Thomas Gudermann

2. Korreferent: Prof. Dr. Dr. Robert Bals

Peter

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
1. Bedeutung einer Therapie bei Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus	1
1.1 Taxonomie	1
1.2 Molekularbiologie des HCMV	2
1.2.1 Virusstruktur	2
1.2.2 Genomstruktur	3
1.2.3 Viraler Infektionszyklus	4
1.2.4 Morphogenese	5
1.3 Medizinische Aspekte der HCMV-Infektion	6
1.3.1 Epidemiologie	6
1.3.2 Krankheitsverlauf der HCMV-Infektion	7
1.3.3 Antivirale Therapie	8
2. Interaktionen zwischen HCMV und der Wirtszelle	9
2.1 Zelluläre Proteinkinasen.....	12
2.2 Identifizierung der Rezeptor-interagierenden Proteinkinase RIP1 als mögliches Ziel für die HCMV-Therapie	12
2.3 Die Rezeptor-interagierende Proteinkinase RIP1	13
2.3.1 Struktur von RIP1	13
2.3.2 Die Funktion von RIP1 für zelluläre Signaltransduktionswege und Apoptose.....	15
3. Zielsetzung der Arbeit	19
II Material	22
1. Geräte	22
2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	23
3. Enzyme	25
4. Zellkulturreagenzien	26
5. Radioaktive Verbindungen	26
6. Antikörper.....	27
7. Kits	28
8. Medien und Puffer.....	28
8.1 Medien und Puffer für die Kultivierung eukaryontischer Zellen	28

8.2 Medien und Puffer für die Kultivierung von Bakterien	29
8.3 Puffer für die Lyse eukaryontischer Zellen	29
8.4 Puffer und Gele für die Elektrophorese und die Western-Blot-Analyse	31
8.5 Puffer und Gele für die Northern Blot-Analyse	32
8.6 Kinase-Aktivitäts-Test-Puffer	33
9. Eukaryontische Zellen und Zelllinien	33
10. Virusstämme	34
11. Bakterienstämme	35
12. Plasmide und rekombinante Adenoviren	35
13. Oligonukleotide und Sonden	40
III Methoden	43
1. Molekularbiologische Methoden	43
1.1 Klonierung und Isolierung von Nukleinsäuren	43
1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)	43
1.2.1 Ortsgerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese von Plasmiden	44
1.3 Homologe Rekombination in adenovirale Vektoren	44
1.3.1 Präparation des adenoviralen Vektors und der Insertionsfragmente	44
1.3.2 Homologe Rekombination in <i>E.coli</i> BJ5183	45
1.3.3 Rekonstitution rekombinanter Adenoviren	45
1.4 Präparation von Virus-DNA	45
1.5 Reverse Transkription	46
1.6 TaqMan-PCR (<i>Real-Time-PCR</i>)	46
1.7 „cDNA-Array“	47
1.8 Northern Blot	47
1.8.1 Hybridisierung von Oligonukleotidproben	48
1.8.2 Hybridisierung von cDNA-Proben	48
1.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot-Analyse	49
1.9.1 SDS-PAGE	49
1.9.2 Western Blot-Analyse	49
2. Zellbiologische Methoden	50
2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen	50
2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	50
2.3 Transiente Transfektion von Zellen	50

2.4 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)	51
2.5 Virusanzucht von rekombinanten Adenoviren.....	51
2.5.1 Anreicherung durch Ultrazentrifugation.....	52
2.6 Herstellung von HCMV-Virus-Stammsuspensionen.....	52
2.6.1 Plaque-Tests	52
2.7 HCMV-Infektions-Tests	53
2.8 Adenovirus-Transduktion mit HCMV-Überinfektion.....	53
2.9 HCMV-GFP-Replikations-Test	53
2.10 Luziferase-Test	54
2.11 Indirekte Immunfluoreszenz	54
2.12 <i>In vivo</i> -Markierung transient transfizierter Zellen.....	55
2.13 Vitalitäts-Test („Alamar Blue-Assay“)	55
2.14 Apoptose-Test („Caspase-Glo™ 3/7-Assay“).....	55
2.15 ELISA („ <u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmunoabsorbant <u>A</u> ssay“)	56
2.16 Zytokin-Antikörper-Test.....	56
3. Biochemische Methoden.....	56
3.1 Proteinaufreinigung	56
3.1.1 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie	57
3.1.2 Aufreinigung mittels Streptavidin-Sepharose	57
3.2 Immunpräzipitation.....	57
3.3 <i>In vitro</i> -Kinase-Aktivitäts-Test	58
IV Ergebnisse	59
1. Genetische Validierung von RIP1	59
1.1 Expression von RIP1 nach der HCMV-Infektion von HFF-Zellen	59
1.2 Effekt von RIP1 auf die HCMV-Replikation in HFF-Zellen	60
1.3 Effekt der Kinasedomäne von RIP1 auf die HCMV-Replikation	62
1.4 Expression von RIP1 nach HCMV-Infektion von U373-Zellen	64
1.5 Effekt von RIP1 auf die HCMV-Replikation in U373-Zellen.....	65
2. Chemische Validierung von RIP1	67
3. Interaktion von RIP1 mit viralen Proteinen	69
3.1 Interaktion von RIP1 mit einem HCMV-Phosphoprotein	69
3.2 Einfluss von RIP1 auf den HCMV-Promotor in HFF-Zellen.....	71
4. Effekt von RIP1 auf einige wesentliche Zellfunktionen.....	72

4.1 Zellwachstum und Apoptose	72
4.2 Lokalisation von RIP1	73
5. Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der Kinase-inaktiven RIP-Mutante	74
6. Effekt von RIP1 auf zelluläre Signaltransduktionswege während der HCMV- Infektion	76
6.1 MAP Kinase-Signalwege.....	76
6.2 NF κ B-Signalweg.....	76
7. Antivirale Eigenschaften von RIP K45R.....	79
7.1 Effekt von RIP K45R auf die Sekretion von antiviralen Faktoren	79
7.2 Identifizierung von potentiell antiviral wirkenden Faktoren	81
7.3 Effekt von RIP K45R auf die transkriptionelle Regulation von Zytokinen ...	86
7.4 Effekt von IL-8, MIP-1a und RANTES auf die HCMV-Replikation.....	90
V Diskussion	93
1. Eine Kinase-inaktive RIP1-Mutante hemmt die HCMV-Replikation.....	94
2. RIP1 hat keinen Einfluss auf einige wesentliche Zellfunktionen und zelluläre Signaltransduktionswege während der HCMV-Infektion	96
3. RIP1 hemmt die Induktion inflammatorischer Zytokine	98
3.1 RIP1 hemmt die Induktion des IL-8-Promotors	99
3.2 IL-8 und RANTES supprimieren die HCMV-Replikation.....	100
4. Vorläufiges Modell der Rolle der RIP1-Kinase für die HCMV-Replikation..	101
VI Zusammenfassung	104
VII Literaturverzeichnis	107
VIII Abkürzungen	119
Anhang.....	122
Lebenslauf	124
Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	126

Erklärung 127

Danksagung 128

I Einleitung

1. Bedeutung einer Therapie bei Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus

Das humane Cytomegalievirus (HCMV), dessen einziger Wirt der Mensch ist, stellt weltweit die häufigste Ursache für schwerwiegende Krankheitsverläufe bei Immunsupprimierten, z.B. AIDS-Patienten, Transplantatempfängern oder Neugeborenen dar (Mocarski and Courcelle, 2001). Die aktuellen Therapieoptionen der HCMV-Infektion mit Ganciclovir, Foscarnet und dem Antisense-Nukleotid Fomivirsen sind aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen bei einigen Patientengruppen nur bedingt einsetzbar. Zudem begünstigt die stete Zunahme an immunsupprimierten Patienten, die eine antivirale Langzeittherapie benötigen, die Bildung von resistenten HCMV-Stämmen (Villareal, 2003). Diese Fakten unterstreichen die Notwendigkeit, neue antivirale Therapien zu finden, um den HCMV-Infektionszyklus effizient zu hemmen.

Die Idee der vorliegenden Arbeit basiert auf dem relativ neuen Ansatz, Inhibitoren zu entwickeln, die zelluläre Kinasen hemmen, welche essentiell für die Virusreplikation sind (siehe I,1.3.3 und 2.3). Diese Inhibitoren hätten den Vorteil, dass sie auch gegen therapieresistente Viren wirksam wären.

1.1 Taxonomie

HCMV gehört zur Familie der *Herpesviridae* (Roizman *et al.*, 1981). Zu dieser Virusfamilie zählt man über 100 beschriebene Spezies, darunter acht humanpathogene (Tab. 1). Herpesviren werden aufgrund ihrer unterschiedlichen biologischen Eigenschaften in die Subfamilien α -, β - und γ -Herpesvirinae eingeteilt (Roizman *et al.*, 1992).

Die α -Herpesvirinae, deren wichtigste Vertreter die Herpes-Simplex-Viren (HSV1 und HSV2) sowie das Varizella-Zoster Virus (VZV) sind, zeichnen sich durch ein relativ breites Wirtsspektrum und einen kurzen Replikationszyklus aus. Die Herpes-Simplex-Viren persistieren in sensorischen Ganglien des Wirtes.

Die β -Herpesvirinae, zu denen das HCMV gehört, sind durch strikte Spezies- und Zelltypspezifität sowie einen langen Replikationszyklus gekennzeichnet.

Sie können in Lymphozyten, mononukleären Zellen und verschiedenen Organen, wie z.B. Leber und Niere persistieren. Neben dem HCMV gehören die humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6, HHV-7) zu dieser Unterfamilie.

Die γ -Herpesvirinae zeigen eine ausgeprägte Gewebsspezifität, sie infizieren vorwiegend B- und T-Lymphozyten und persistieren in lymphoiden Geweben.

Vertreter dieser Subfamilie sind das Epstein-Barr Virus (EBV) und das Humane Herpesvirus 8 (HHV-8) (Mocarski and Courcelle, 2001).

Tab. 1: Tabellarische Klassifizierung der acht humanpathogenen Herpesviren (Roizman *et al.*, 1992)

Subfamilie	Art	Abkürzung	Literatur
α -Herpesvirinae	Herpes-Simplex Virus 1	HSV1	(Gruter, 1924)
	Herpes-Simplex Virus 2	HSV2	(Schneeweis, 1962)
	Varizella-Zoster Virus	VZV	(Dumas <i>et al.</i> , 1980)
β -Herpesvirinae	Humanes Cytomegalievirus	HCMV	(Smith, 1956)
	Humanes Herpesvirus 6	HHV-6	(Lindquister and Pallett, 1991)
	Humanes Herpesvirus 7	HHV-7	(Frenkel <i>et al.</i> , 1990)
γ -Herpesvirinae	Epstein-Barr Virus	EBV	(Epstein <i>et al.</i> , 1965)
	Humanes Herpesvirus 8	HHV-8	(Chang <i>et al.</i> , 1994)

1.2 Molekularbiologie des HCMV

1.2.1 Virusstruktur

Das HCMV-Virion weist eine typische Herpesvirusarchitektur auf, bestehend aus doppelsträngiger DNA, Nukleokapsid, Tegument und viraler Hüllmembran (Abb. 2). Der elektronendichte Viruskern (*core*) setzt sich aus dem doppelsträngigen DNA-Genom (ca. 230 Kilobasen) und assoziierten Proteinen zusammen und besitzt einen Durchmesser von ca. 75nm (Wright *et al.*, 1964). Dieser wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, welches sich aus 162 Kapsomeren zusammensetzt und einen Durchmesser von 100nm besitzt. Kern und Kapsid bilden zusammen das Nukleokapsid, welches von einer amorphen

Proteinmatrix (Tegument) umgeben ist, die fast ausschließlich aus Phosphoproteinen besteht. Das Phosphoprotein pp65 kann dabei bis zu 95% der Proteinmasse des Teguments ausmachen (Gibson and Irmieri, 1984). Die aus der Wirtszellmembran abgeleitete Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht von etwa 11nm Dicke (Tooze *et al.*, 1993), in die zelluläre und virale Glykoproteine eingelagert sind. Durch ihre exponierte Stellung sind diese das Hauptziel für neutralisierende Antikörper des infizierten Wirtsorganismus. Die viralen Glykoproteine des HCMV sind in definierten Komplexen auf der Virusoberfläche organisiert (Cranage *et al.*, 1988; Kari and Gehrz, 1993; Eickmann *et al.*, 1998; Milne *et al.*, 1998; Huber and Compton, 1998 und 1999; Mach *et al.*, 2000).

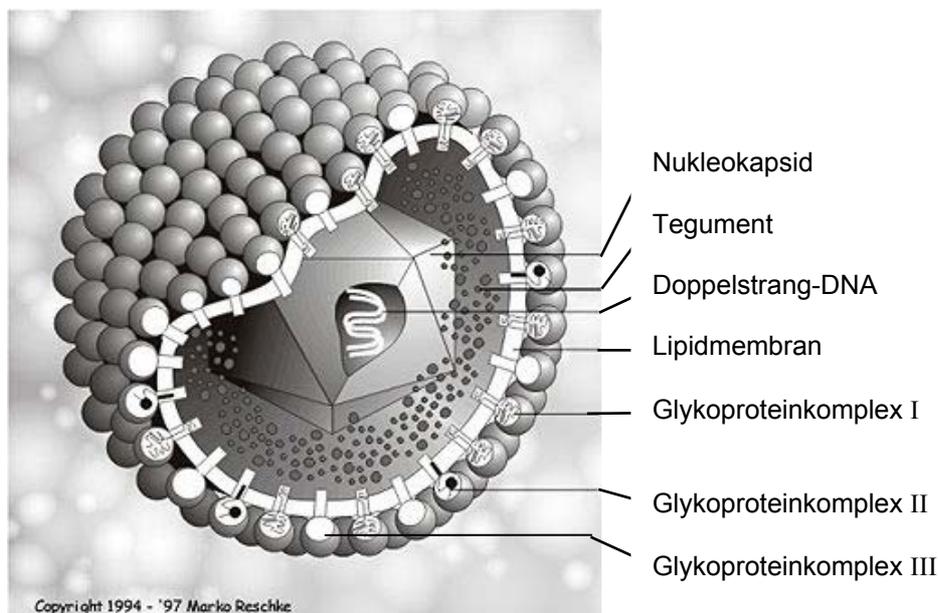


Abb. 2: Schematische Darstellung des humanen Cytomegalievirus (HCMV)
(freundlicherweise von M. Reschke zur Verfügung gestellt)

1.2.2 Genomstruktur

Das HCMV-Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA von ca. 230 Kilobasen (Kb) Länge und ist damit das größte Genom aller bekannten humanpathogenen Viren. Es ist in zwei unterschiedlich lange, nicht-repetitive Segmente (U_L = unique long; U_S = unique short) unterteilt, die jeweils von zwei invertierten, repetitiven Sequenzabschnitten (TR_L , TR_S = terminal repeat long bzw. short; IR_L , IR_S = internal repeat long bzw. short) flankiert werden (Chee *et*

al., 1990) (Abb. 3). An den Enden des Virusgenomes und an der Verbindungsstelle der beiden Segmente befinden sich weitere Sequenzbereiche, die als *a*-Sequenz bezeichnet werden. In ihnen sind konservierte Erkennungsregionen für die Prozessierung und Verpackung der Virus-DNA lokalisiert (McVoy *et al.*, 1998; Bogner *et al.*, 1998).



Abb. 3: Schematische Darstellung des HCMV-Genoms

Dargestellt ist die Prototyp-Isoform des HCMV-Genoms (Chee *et al.*, 1990). Die Pfeile veranschaulichen die Orientierung der Segmente zueinander.

Das Genom des HCMV-Laborstammes AD169 wurde 1990 vollständig sequenziert (Chee *et al.*, 1990). Aus der Sequenzanalyse lassen sich 208 offene Leserahmen ableiten, davon zeigen etwa 40 signifikante Homologien zu Genen anderer Herpesviren. Die Nomenklatur der viralen Genprodukte basiert, ausgehend von der definierten Isoform des Genoms (Chee *et al.*, 1990), auf der fortlaufenden Nummerierung der potentiellen Leserahmen, gemäß ihrer Lokalisation auf dem U_L - oder U_S -Segment. Beispielsweise wird das Tegumentprotein pp65 auch als ppUL83 bezeichnet.

1.2.3 Viraler Infektionszyklus

Der Infektionszyklus des HCMV beträgt in Zellkultur von der Adsorption bis zur Freisetzung der Tochterviren etwa 72 Stunden. Als primäre, unspezifische Rezeptoren für die Anheftung des HCMV (*attachment*) gelten Heparansulfatproteoglykane der Wirtszellmembran (Compton *et al.*, 1993; Mocarski and Courcelle, 2001). Als spezifische Rezeptoren für die Bindung der HCMV-Glykoproteinkomplexe sind bislang der zelluläre Haupthistokompatibilitätskomplex (Grundy *et al.*, 1987), CD (Cluster of differentiation) 13 (Soderberg *et al.*, 1993) und der Rezeptor für den Wachstumsfaktor EGF (Epidermal growth factor) (Wang *et al.*, 2003) bekannt.

Nach der Adsorption erfolgt die Penetration durch Fusion von Virus- und Zellmembran (Compton *et al.*, 1992). Die so eingeschleusten nackten Nukleokapside werden entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert

(Sodeik *et al.*, 1997). Nach Bindung der Kapside an den Kernporenkomplex wird die virale DNA ins Nukleoplasma abgegeben und zirkularisiert (Ojala *et al.*, 2000). Funktionelle Strukturkomponenten des Virus, wie die Tegumentproteine pp71 (pUL82), pp65 (pUL83) und pUL69 leiten die virale und zelluläre Genexpression ein (Roby and Gibson, 1986; Baldick *et al.*, 1997).

Die kaskadenartige Transkription und Expression der viralen Gene beginnt mit der sehr frühen Transkriptionsphase (0-3h nach Infektion), die zur Synthese von regulatorischen *immediate early*-Proteinen (IE-Proteinen) führt. Die IE-Proteine wirken als Transaktivatoren für die Transkription der *early*-Gene (E-Gene), deren Genprodukte für die virale DNA-Replikation benötigt werden. Mit dem Einsetzen der Replikation der Virus-DNA (24-36h nach Infektion) beginnt die späte Phase (L = late) der Virusreplikation. Während dieser Phase werden überwiegend Strukturproteine synthetisiert (Mocarski and Courcelle, 2001).

Die DNA-Synthese erfolgt nach dem *rolling circle* Mechanismus (McVoy and Adler, 1994) und resultiert in der Bildung eines einzigen DNA-Doppelstrangs, der mehrere Einheiten des viralen Genoms enthält (Konkatemere). Die virale DNA wird unter Beteiligung des Proteins pUL56, an den α -Sequenzen auf Genomgröße zurechtgeschnitten und in die Kapside verpackt (Bogner *et al.*, 1998).

1.2.4 Morphogenese

Der Reifungsprozeß der Virionen beginnt mit dem Zusammenbau der Kapside im Zellkern der Wirtszelle (Mocarski and Courcelle, 2001). Die Kapside verlassen über einen als Transportknospung bezeichneten Prozess den Kern und gelangen ins Zytoplasma (Radsak *et al.*, 1996). Der Transport der Kapside durch die Kernmembran beginnt mit der fokalen Auflösung der nukleären Laminstrukturen. Dieser Vorgang wird wahrscheinlich durch virale Proteine katalysiert, die den Phosphorylierungsstatus der Kernlaminaproteine verändern (Muranyi *et al.*, 2002). Die Kapside werden im perinukleären Raum von der inneren Kernmembran umhüllt. Diese Lipidhülle fusioniert mit der äußeren Kernmembran und setzt so die Nukleokapside ins Zytoplasma frei. Die endgültige Umhüllung der Kapside findet an den Membranen des frühen tubulären Endosoms oder des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) statt (Radsak *et*

al., 1991; Tooze *et al.*, 1993). Die äußere Hülle fusioniert im letzten Schritt der Exozytose mit der Wirtszellmembran, so dass einfach umhüllte, reife Tochtervirionen aus der Zelle freigesetzt werden (Abb. 4).

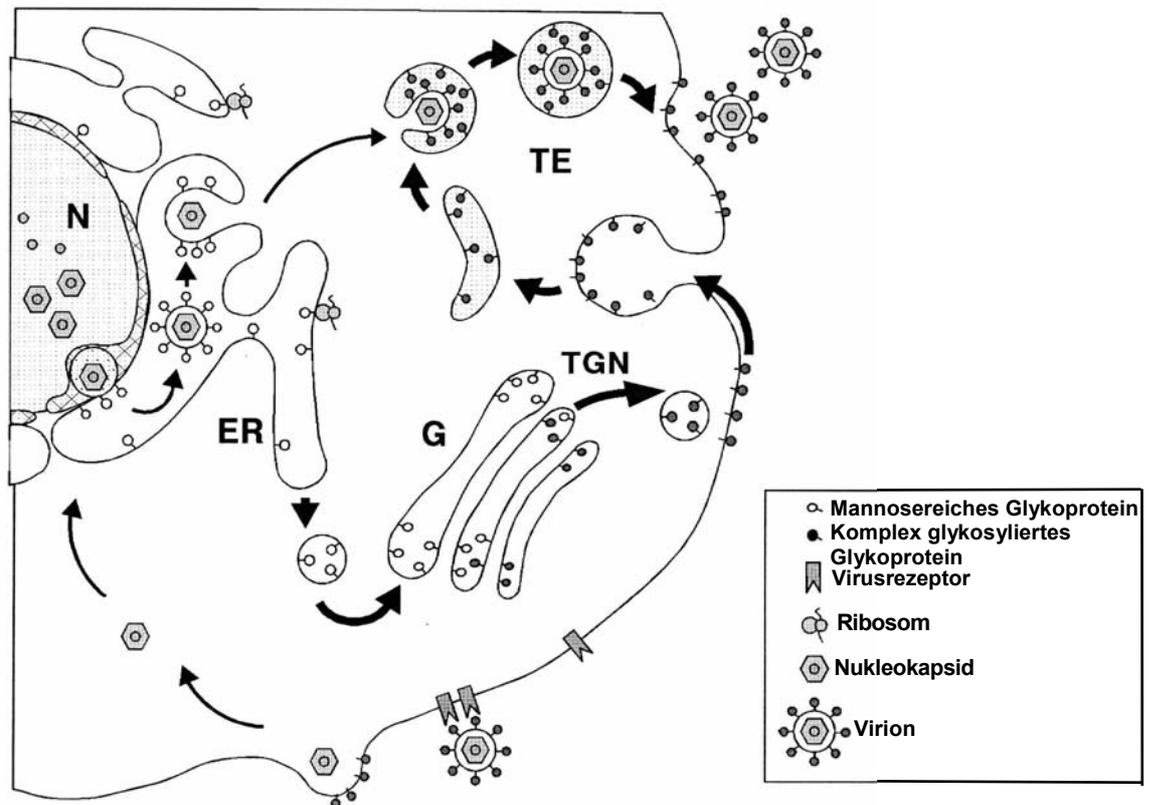


Abb. 4: Schematische Darstellung der Morphogenese des HCMV

(freundlicherweise von K. Radsak zur Verfügung gestellt, Radsak *et al.*, 1991)

Die schmalen Pfeile zeigen den Weg der reifen Virionen, die dicken Pfeile zeigen die intrazelluläre Transportroute des Glykoprotein B (gB) des HCMV. Abkürzungen: ER = Endoplasmatisches Retikulum, TE = tubuläres Endosom, G = Golgi, N = Zellkern, TGN = Trans-Golgi-Netzwerk

1.3 Medizinische Aspekte der HCMV-Infektion

1.3.1 Epidemiologie

Das Humane Cytomegalievirus verursacht weltweit Infektionen. Der Durchseuchungsgrad hängt stark vom sozioökonomischen Standard und dem damit verbundenen Hygieneverhältnissen ab. In den sogenannten Entwicklungsländern sind ca. 80% der Kinder bis zum ersten Lebensjahr seropositiv. In den

westlichen Ländern liegt die Durchseuchungsrate in der Gruppe der Zwanzigjährigen bei 20%, in der der über Vierzigjährigen bei 50-80% (Britt and Alford, 1996). Die Übertragung des Virus erfolgt durch Körperflüssigkeiten, wie z.B. durch Speichel, Zervixsekret, Samenflüssigkeit und Muttermilch oder Schmierkontamination mit virushaltigem Blut oder Urin. Neben diesen Übertragungswegen ist eine Infektion durch Organtransplantate oder Blutpräparate möglich (Ho, 1990; Britt and Alford, 1996).

Nach der Infektion breiten sich die Viren über den Blutstrom in freier Form oder oder zellgebunden an mononukleäre Phagozyten und Endothelzellen aus (Stoddart *et al.*, 1994). HCMV infiziert Zellen der Speicheldrüse, Niere, Nebenniere, Leber, Milz, Lunge und des Knochenmarks (Britt and Alford, 1996; Plachter *et al.*, 1996). Den Zustand der Latenz etabliert das Virus in Endothelzellen und in Vorläuferzellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (Fish *et al.*, 1998; Hahn *et al.*, 1998; Soderberg *et al.*, 1997). Der genaue Mechanismus, der die Einleitung und Erhaltung der Latenz bewirkt, ist bisher unbekannt (Prösch *et al.*, 1999; Soderberg-Naucler and Nelson, 1999). HCMV verbleibt lebenslang latent im Organismus, wobei die Latenz durch Reaktivierungen, ausgelöst unter anderem durch Zelldifferenzierung oder inflammatorische Zytokine, unterbrochen wird (Hahn *et al.*, 1998).

1.3.2 Krankheitsverlauf der HCMV-Infektion

Ausschlaggebend für den klinischen Verlauf ist der Zeitpunkt der Infektion und der Immunstatus des Infizierten. Bei Immunkompetenten verläuft die Primärinfektion meist asymptomatisch, während es bei immunsupprimierten Personen und bei pränatalen Infektionen zu schweren klinischen Verlaufsformen kommen kann. Bei immunsupprimierten Transplantatempfängern können durch Reaktivierung des HCMV schwere Hepatiden und Pneumonien auftreten, die zur Organabstoßung und zum Tod führen können (Perez, 1997). Bei Patienten, deren Immunsystem durch eine Infektion mit dem humanen Immunodefizienz Virus (HIV) geschwächt ist, kann eine Primärinfektion oder Reaktivierung zu Infektionen der Retina, des Gastrointestinaltraktes, der Lunge und des Zentralnervensystems führen (Drew, 1992). Die HCMV-Pneumonie ist die häufigste Todesursache bei AIDS (*Acquired immuno deficiency syndrome*)-Patienten und Knochenmarkstransplantat-Empfängern (Moskowitz *et al.*, 1985;

Enright *et al.*, 1993). Pränatale Infektionen als Folge einer Primärinfektion der Mutter führen bei ca. 0,1% der Neugeborenen zu schweren Schädigungen, wie z.B.: Hydrozephalie, Hepatosplenomegalie, Meningitis und Chorioretinitis (Doerr, 1987; Stagno, 1986; Britt *et al.*, 1991; Eggers *et al.*, 1998).

1.3.3 Antivirale Therapie

In der Therapie des HCMV werden unterschiedliche Substanzklassen eingesetzt. Im Folgenden sind die wichtigsten Substanzklassen aufgeführt. Detaillierte Überblicke über die Therapie der Herpesviren bieten folgende Arbeiten (Emery and Griffiths, 2000; Emery and Hassan-Walker, 2002; Cohen, 2002; Coen and Schaffer, 2003; Villarreal, 2003).

1. Substanzen, welche die virale DNA-Polymerase inhibieren
 - Ganciclovir (GCV, Cymevene[®]), ein Nukleosidanalogen
 - Cidofovir (CDV), ein Phosphonatanalogen
 - Foscarnet (PFA, Foscavir[®]), ein Pyrophosphatanalogen
 - Dihydroquinoline hemmen die virale Polymerase UL54 kompetitiv.

Der Nachteil der Nukleosidanaloga ist, dass sie potentiell DNA-schädigend wirken und damit toxisch sind. Ihr Einsatz führt häufig zur Selektion resistenter HCMV-Stämme. Ganciclovir-Resistenzen entstehen v. a. durch Mutationen der UL97-Kinase oder der viralen DNA-Polymerase UL54.

2. Fomivirsen (Vitravene[®], ISIS2922) ist ein Antisense-Oligonukleotid der HCMV-IE2-mRNA (Mulamba *et al.*, 1998).
3. Substanzen, welche die virale UL97-Kinase hemmen
 - Ribosylbenzimidazole (z.B. Maribavir[®]) (Wolf *et al.*, 2001; Biron *et al.*, 2002; Krosky *et al.*, 2003).
 - Indolocarbazole und Quinazoline (Marschall *et al.*, 2001 and 2002; Herget *et al.*, 2004).
4. Neue Substanzklassen, die durch Hemmung der zellulären Kinasen die Virusproduktion inhibieren.
 - SB203580 und FHPI, die zu den Imidazolen zählen und die Aktivität der zellulären MAP (Mitogen activated protein) Kinase p38 hemmen

(Lee *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1997). Eine Übersicht über die zellulären MAP Kinasen ist in der Abb. 8 (I, 2.3.2) dargestellt.

- Roscovitin, das in die Substanzklasse der Isopropylpurine gehört, inhibiert die zellulären Cyclin abhängigen Kinasen CDK1, 2 und 5 (Cyclin dependent kinase) (Bresnahan *et al.*, 1997; Meijer, 2000).
- Cyclooxygenase (COX)-2-Inhibitoren zählen zu den Coxiben, z.B. Celecoxib (Celebrex[®]), Valdecoxib (Bextra[®]), Paracoxib (Dynastat[®]) und Rofecoxib (Vioxx[®]). Sie hemmen die COX-2 vermittelte Prostaglandin E₂-Synthese (Zhu *et al.*, 2002). Valdecoxib und Rofecoxib wurden aufgrund von vermehrt auftretenden unerwünschten Nebenwirkungen (z.B. Herzinfarkt und Schlaganfall) im Jahre 2004 vom Markt genommen.

Einerseits können Inhibitoren gegen zelluläre „Schlüsselproteine“, z.B. Kinasen den Vorteil haben, dass sie auch gegen therapieresistente HCMV-Stämme wirksam sind. Andererseits kann die Hemmung von zentralen zellulären Proteinen unerwünschte Nebenwirkungen wie z.B. Toxizität für die Wirtszelle zur Folge haben.

Ein wirksamer Impfstoff gegen HCMV existiert bislang nicht. Daher ist es notwendig, ein potentes und gut verträgliches Medikament gegen HCMV zu entwickeln.

2. Interaktionen zwischen HCMV und der Wirtszelle

Viren verwenden und verändern als zelluläre Parasiten die Signaltransduktionswege der Wirtszelle. Dabei spielen Proteinkinasen als Teil der zellulären Signaltransduktionskaskaden eine wichtige Rolle. Die Interaktion der viralen Komponenten mit zellulären Faktoren bildet ein komplexes Netzwerk, welches für optimale Bedingungen für die Virus-Replikation sorgt und die Eliminierung der infizierten Zellen durch das Immunsystem verhindert. Nur wenn alle beteiligten Elemente perfekt miteinander kooperieren, kommt es zu einer produktiven Virusvermehrung (Fortunato *et al.*, 2000; Santoro *et al.*, 2003). Eine Übersicht über die wichtigsten zellulären Signaltransduktionswege, die speziell durch HCMV, aber auch durch andere Viren, aktiviert werden, zeigt Abb. 5.

Unmittelbar nach der HCMV-Infektion kommt es durch Bindung der Glykoproteine B und H an bislang noch unbekannte G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Zelle zur Aktivierung der MAP Kinase-, der Proteinkinase C- und der Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase-Signalwege. Sowohl die MAP Kinasen als auch die PI3-Kinase werden durch HCMV biphasisch induziert und scheinen essentiell für die Phosphorylierung der HCMV-IE-Proteine zu sein (Rodems and Spector; 1998; Johnson *et al.*, 2001a und b). Für das HI-Virus konnte das Transaktivator-Protein Tat als Induktor der Proteinkinase C identifiziert werden.

Die Ursache des Anstiegs der zellulären cAMP und Ca^{2+} -Spiegel nach einer HCMV-Infektion ist bislang noch nicht bekannt. Bei Influenzaviren sind es die Hämagglutinin-Proteine, bei Adenoviren die E3/19K-Proteine, die durch Akkumulation an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) das Einströmen von Ca^{2+} in die Zelle verursachen.

Viele Viren induzieren über die Interaktion mit zellulären Rezeptoren oder über ähnliche virale Rezeptoren den Nukleären Faktor κB (NF κ B)-Signalweg. Das Latente Membran Protein LMP1 des Epstein Barr-Virus beispielsweise wird während der Infektion in die Zellmembran inseriert. Dort interagiert es mit der Rezeptor-interagierenden Proteinkinase 1 (RIP1), dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptor assoziierten *Death*domäne Protein TRADD und dem TNF Rezeptor assoziierten Faktor 2 (TRAF2). Diese bilden gemeinsam einen Komplex, der zur Aktivierung des NF κ B-Signalwegs führt. Das *core*-Protein des Hepatitis C-Virus interagiert mit dem TNF-Rezeptor und induziert so die NF κ B-Signalkaskade. Für das HCMV-Protein UL144, welches Ähnlichkeiten mit der TNF-Rezeptor-Familie aufweist, wird eine Interaktion mit TRAF2 postuliert (Loenen *et al.*, 2001). Die Bildung radikaler Sauerstoffspezies sowie die Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus nach einer HCMV-Infektion können ebenfalls zur Induktion des NF κ B-Signalwegs führen. Der NF κ B-Signalweg und die MAP-Kinase-Signalwege sind in Kapitel I, 2.3.2 genauer erläutert. Einführungen in dieses Thema bieten folgende Arbeiten: Fortunato *et al.*, 2000; Loenen *et al.*, 2001; Mocarski, 2002; Santoro *et al.*, 2003.

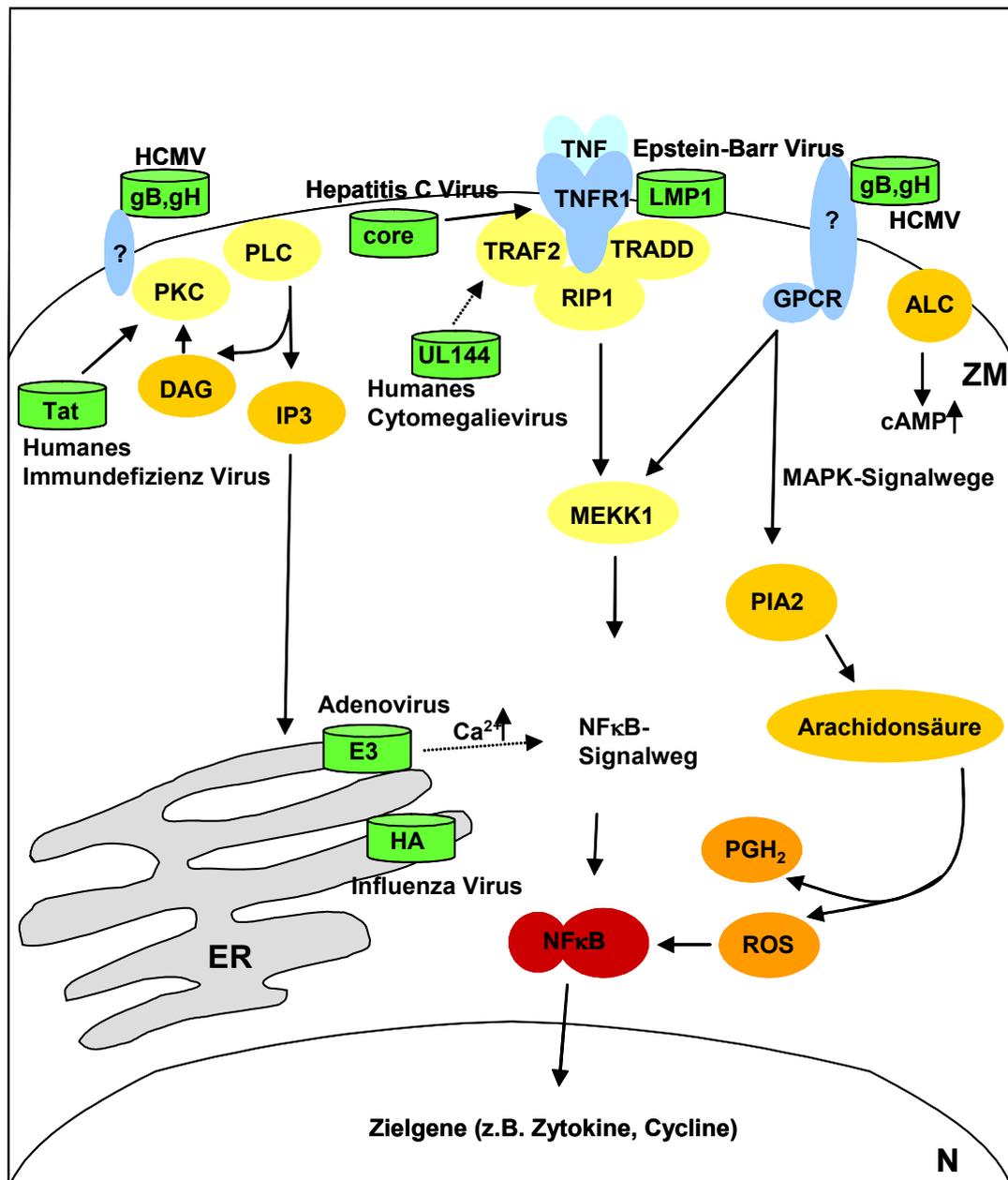


Abb. 5: Übersicht zur Interaktion viraler Proteine mit zellulären Signalwegen

Die Abbildung zeigt eine Zusammenfassung der wichtigsten zellulären Signaltransduktionswege, die durch virale Proteine induziert werden können, u.a. die MAPK Kinase-Signalwege, den NFκB-Signalweg, den PKC-vermittelten Signalweg, den PI3-Signalweg. Des Weiteren wird die Bildung von radikalen Sauerstoffspezies und das Einströmen von Ca²⁺ aus dem ER durch verschiedene virale Proteine induziert (modifiziert nach Fortunato *et al.*, 2000 und Santoro *et al.*, 2003).

Abkürzungen: N = Nukleus, ZM = Zellmembran, ER = Endoplasmatisches Retikulum, PKC = Proteinkinase C, PLC = Phospholipase C, PIA2 = Phospholipase A2, MAPK = Mitogen aktivierte Protein Kinase, TNF = Tumor Nekrose Faktor, TNFR1 = TNF Rezeptor 1, TRADD = TNF Rezeptor assoziiertes *Death*domäne Protein, TRAF = TNF Rezeptor assoziierter Faktor, FADD = Fas assoziiertes *Death*domäne Protein, RIP = Rezeptor-interagierende Proteinkinase, NFκB = Nukleärer Faktor κB, MEKK = Mitogen-aktivierte Protein Kinase/extrazellulär Signal-regulierte Kinase Kinase Kinase, GPCR = G-Protein gekoppelter Rezeptor, IP3 = Inositol (1,4,5) Triphosphat, HA = Hämagglutinin-Protein des Influenza-Virus, E3 = E3/19K-Adenovirus-Protein, core = Hepatitis C Virus-Hüllprotein, Tat = Transaktivator-Protein des HI-Virus, LMP1 =

Latentes Membran Protein 1, HCMV = Humanes Cytomegalievirus, gB, gH = Glykoproteine B und H des HCMV, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, ROS = radikale Sauerstoffspezies, ALC = Adenylatcyklase, DAG = Diacylglycerol, PGH₂ = Prostaglandin H₂

2.1 Zelluläre Proteinkinasen

Proteinkinasen spielen eine wichtige Rolle in den zellulären Signaltransduktionswegen. Sie gehören zu einer grossen Familie von Enzymen, die kovalent Phosphate an Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste spezifischer Proteine anhängen. Durch die Phosphorylierung kann u.a. die enzymatische Aktivität, die Interaktion mit anderen Proteinen, die Lokalisation in der Zelle und der Abbau von Proteinen durch Proteasen kontrolliert werden (Johnson and Lapadat, 2002).

Um neue antivirale Therapiestrategien zu finden, ist ein möglicher Ansatz, zunächst zelluläre Proteinkinasen zu untersuchen, deren Expression durch die HCMV-Infektion hochreguliert wird, wie z.B. die Rezeptor-interagierende Proteinkinase RIP1 (siehe I, 2.3). Dabei können die Proteinkinasen entweder durch das Virus induziert werden, oder als Teil der zellulären Immunantwort hochreguliert werden (Inohara and Nunez, 2003). Es ist notwendig, das Zusammenspiel zwischen Virus-induzierten und antiviralen Signaltransduktionswegen besser zu verstehen, da die antivirale zelluläre Immunantwort sehr komplex ist. Erst dann können antiviral wirkende Inhibitoren gegen zentrale zelluläre Proteine z.B. gegen Kinasen auch beim Menschen eingesetzt werden (Coen and Schaffer, 2003).

2.2 Identifizierung der Rezeptor-interagierenden Proteinkinase RIP1 als mögliches Ziel für die HCMV-Therapie

Zhu und Kollegen sowie Browne und Kollegen konnten 258 zelluläre mRNAs identifizieren, deren Expression durch die HCMV-Infektion verändert wird. Etwa 40 der identifizierten mRNAs kodieren für zelluläre Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Auch RIP1 wird durch die HCMV-Infektion hochreguliert (Zhu *et al.*, 1998; Browne *et al.*, 2001). Neben anderen zellulären Kinasen wurden RIP1 und RIP2 (analoge Bezeichnungen: RICK/ CARDIAK) nach der HCMV-Infektion von primären humanen Vorhautfibroblasten (HFF) hochreguliert

(Eickhoff *et al.*, 2003). HFF-Zellen gelten als etabliertes Zellkultur-System, in dem sich HCMV vollständig replizieren kann (Mocarski and Courcelle, 2001).

RIP1 ist an vielen zellulären Signaltransduktionskaskaden, wie z.B. dem NF κ B-Signalweg, der TNF α -Signalkaskade (Liu *et al.*, 1996; Kelliher *et al.*, 1998), den MAP-Kinase-Signalwegen (Yang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001) und der Caspase-induzierten Apoptose beteiligt (Stanger *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Bedeutung die Hochregulation von RIP1 für die HCMV-Infektion hat und ob RIP1 als Ziel für die antivirale Therapie geeignet ist.

2.3 Die Rezeptor-interagierende Proteinkinase RIP1

RIP1 gehört zu einer Familie verwandter Serin/Threonin-Kinasen, die Signaltransduktionswege regulieren (Stanger *et al.*, 1995). RIP2 (Inohara *et al.*, 1998), RIP3 (Sun *et al.*, 1999) und RIP4 (Meylan *et al.*, 2002) sind weitere bekannte Mitglieder dieser Kinasefamilie. RIP2, auch bekannt als RICK (RIP like Interacting CLARP Kinase) oder CARDIAK, ist ebenso wie RIP1 in verschiedene Signaltransduktionswege involviert, wie z.B. den NF κ B-, den MAPK p38- und den ERK-Signaltransduktionsweg. Für die Aktivierung dieser Signalwege ist die Kinase-Aktivität der RICK-Kinase nicht essentiell (Inohara *et al.*, 2000). Bei RIP1 wird die Beteiligung der Kinase-Aktivität an der Induktion der aufgeführten Signalwege kontrovers diskutiert (Devin *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). RIP3 ist in Mitochondrien lokalisiert und induziert ähnlich wie RIP1 über seine *Death*domäne Apoptose (Kasof *et al.*, 2000; Stanger *et al.*, 1995).

2.3.1 Struktur von RIP1

RIP1 wurde ursprünglich in einem „Yeast two hybrid Screening“ für Fas- (Apo-1/CD95) Interaktionspartner gefunden. Die Sequenz des humanen RIP1 ist 671 Aminosäuren (AS) lang (siehe Anhang, Abb. 31). Die RIP-cDNA kodiert für ein Protein mit einer molaren Masse von ca. 74 Kilodalton (kDa). RIP1 besitzt eine N-terminale Kinasedomäne (AS 1-300), eine Intermediärdomäne (AS 301-595) und eine *Death*domäne (AS 596-671). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen des humanen und des murinen RIP ergab, dass die Kinase- (76%

Identität) und die *Death*domänen (89% Identität) stärker konserviert sind als die Intermediärdomänen (56% Identität) (Stanger *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1996). Die Kinasedomäne beinhaltet die Konsensussequenzen für die Kinasesubdomänen VI (DLKPEN) und VIII (GTLYYMAPE) von Serin/Threoninkinase (Hanks and Lindberg, 1991). Eine RIP-Mutante, in der das konservierte Lysin (K) an Position 45 in der Kinasesubdomäne II zu einem Arginin (N) mutiert wurde, zeigt keine Kinase-Aktivität mehr (Hsu *et al.*, 1996). Dieses konservierte Lysin phosphoryliert die Hydroxylgruppen von Serin- und Threoninresten und ist für die enzymatische Aktivität von RIP1 essentiell (Hanks and Hunter, 1995). Zudem kann sich die RIP1-Kinase an noch nicht eindeutig identifizierten Serin/Threonin-Resten autophosphorylieren (Hsu *et al.*, 1996). Die Intermediärdomäne beinhaltet ein RIP-homotypisches Interaktionsmotiv RHIM (ca. AS 501-588), an das RIP3 bindet (Sun *et al.*, 2002). Auch das Zinkfingerprotein ZIN, welches die Aktivierung von NF κ B inhibiert (Chen *et al.*, 2002), MEKK3 (Yang *et al.*, 2001) und MEKK1 (Kim *et al.*, 2001) binden an die Intermediärdomäne von RIP1. Über seine C-terminale *Death*domäne kann RIP1 Proteine binden, die ebenfalls eine *Death*domäne enthalten, wie z.B. TRADD (TNF Rezeptor 1 assoziiertes *Death*domäne-Protein) und TRAF2 (TNF Rezeptor assoziierter Faktor 2) (Hsu *et al.*, 1995). Als mögliche zelluläre Substrate von RIP1 werden sowohl MEKK1 (Kim *et al.*, 2001) als auch MEKK3 (Yang *et al.*, 2001) diskutiert. Eine schematische Darstellung der Struktur von RIP1 zeigt die Abb. 6.

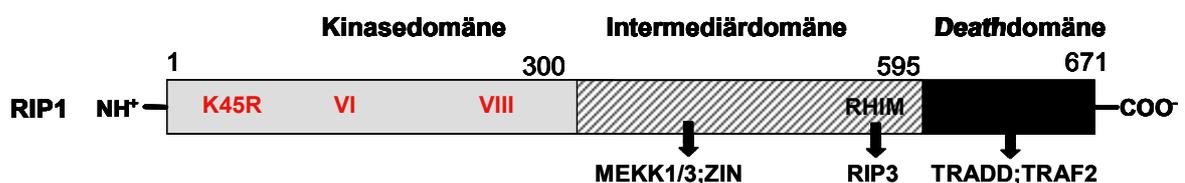


Abb. 6: Schematische Darstellung von RIP1

RIP1 besteht aus einer N-terminalen Kinasedomäne (AS 1-300), einer Intermediärdomäne (AS 301-595) und einer C-terminalen Deathdomäne (AS 596-671) (Stanger *et al.*, 1995). Die Mutation des konservierten Lysin an Position 45 zu einem Arginin (K45R) führt zu einer kinase-inaktiven RIP-Mutante (Hsu *et al.*, 1996). MEKK1 und 3 sowie ZIN binden an noch nicht identifizierten Bindungsstellen der RIP1-Intermediärdomäne (Kim *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). RIP3 bindet an RHIM in der RIP1-Intermediärdomäne (Sun *et al.*, 2002). Die *Death*domänenproteine TRADD und TRAF2 binden an die *Death*domäne von RIP1 (Hsu *et al.*, 1995). Abkürzungen: MEKK = Mitogen-aktivierte Protein Kinase/extrazellulär Signal-regulierte Kinase Kinase; RHIM = homotypisches RIP-Interaktionsmotiv; ZIN = NF κ B inhibierendes Zinkfinger Protein;

TRADD = TNF Rezeptor assoziiertes *Death*domäne Protein; TRAF = TNF Rezeptor assoziierter Faktor.

2.3.2 Die Funktion von RIP1 für zelluläre Signaltransduktionswege und Apoptose

RIP1 ist eines der Proteine, die über TRADD in den TNF-Rezeptor (TNFR)1-Signaltransduktionskomplex rekrutiert werden. Der TNFR1-Komplex aktiviert sowohl den TNF-vermittelten NF κ B-Signalweg, der für die Aktivierung der Immunantwort und der inflammatorischen Genen zuständig ist, als auch den TNF-vermittelten programmierten Zelltod, die Apoptose (Stanger *et al.*, 1995; Wajant *et al.*, 2003; Santoro *et al.*, 2003; Karin *et al.*, 2004). Eine Übersicht über RIP1 im TNFR1-Signaltransduktionskomplex gibt die Abb. 7.

Apoptose ist durch das Schrumpfen der Zellen, die Kondensation der Zellkerne und die internukleäre Degradation der DNA charakterisiert (Kerr *et al.*, 1972).

Für die Induktion der TNF-induzierten Apoptose ist die Überexpression der RIP1-*Death*domäne ausreichend (Hsu *et al.*, 1996; Ting *et al.*, 1996). Dabei bilden RIP1, TRADD, TRAF2 und FADD (Fas-assoziiertes *Death*domäne-Protein) den sogenannten DISC (Death-inducing signaling complex). FADD aktiviert Caspase-8, welche eine Caspase-Kaskade initiiert, die in der Induktion der Apoptose endet (Dixit *et al.*, 1999). Caspase-8 kann RIP1 an Position 324 spalten und dadurch die NF κ B-Aktivierung hemmen (Lin *et al.*, 1999). Auch Caspase-2 bildet mit TRAF2 und RIP1 einen Proteinkomplex, der sowohl die NF κ B- als auch die p38-Aktivierung induziert (Lamkanfi *et al.*, 2005).

Beim Caspase unabhängigen Zelltod, der Nekrose, ist nicht die *Death*domäne sondern die Kinase-Aktivität von RIP1 entscheidend (Holler *et al.*, 2000). Charakterisiert wird die Nekrose durch ein Anschwellen der Zellen und deren Organellen und die Freisetzung von zytoplasmatischem Material aus den Zellen (Fiers *et al.*, 1999). Verschiedene Stimuli wie Viren, Bakterien, inflammatorische Zytokine, Stress, Wachstumsfaktoren oder Hormone können über unterschiedliche Wege den NF κ B-Signalweg aktivieren (Santoro *et al.*, 2003).

Die NF κ B-Proteine bilden eine kleine Gruppe dimerer Transkriptionsfaktoren, die über eine Rel homologe Domäne (RHD) verfügen, in der sich ein nukleäres

Lokalisationssignal (NLS) befindet. In nicht stimulierten Zellen wird das NLS durch die Bindung von I κ B-Proteine - NF κ B-Inhibitoren - maskiert. Die Aktivierung von NF κ B hängt von der Ubiquitinierung der I κ B-Proteine ab, die durch den I κ B Kinase-Komplex (IKK-Komplex) gesteuert wird. Der IKK-Komplex besteht aus drei Untereinheiten: IKK α , β und γ . Sobald die I κ B-Proteine polyubiquitinyliert sind, werden sie innerhalb von Minuten abgebaut und die freien NF κ B-Dimere können in den Zellkern translokieren, wo sie die Transkription von spezifischen Genen, z.B. Zytokinen, aktivieren (Karin and Ben-Neriah, 2000; Karin *et al.*, 2004). Zytokine bilden eine grosse, heterogene Gruppe von Proteinen, die von verschiedenen Zellen des Immunsystems (u.a. Makrophagen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten), nach Stimulation durch Viren, Bakterien oder andere Zytokine, exprimiert werden. Zur Gruppe der Zytokine gehören u.a. die Interleukine, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Interferone (Mantovani *et al.*, 2000; Fitzgerald *et al.*, 2001).

Anhand von Experimenten mit Mausfibroblasten, die ein RIP1-Deletion tragen (RIP $^{-/-}$ -Zellen), konnte gezeigt werden, dass RIP1 essentiell für die Induktion des NF κ B-Signalwegs ist (Kelliher *et al.*, 1998). Erstaunlicherweise ist für die NF κ B-Aktivierung durch RIP1 nicht die Kinasedomäne sondern die Intermediärdomäne ausreichend (Hsu *et al.*, 1996; Ting *et al.*, 1996).

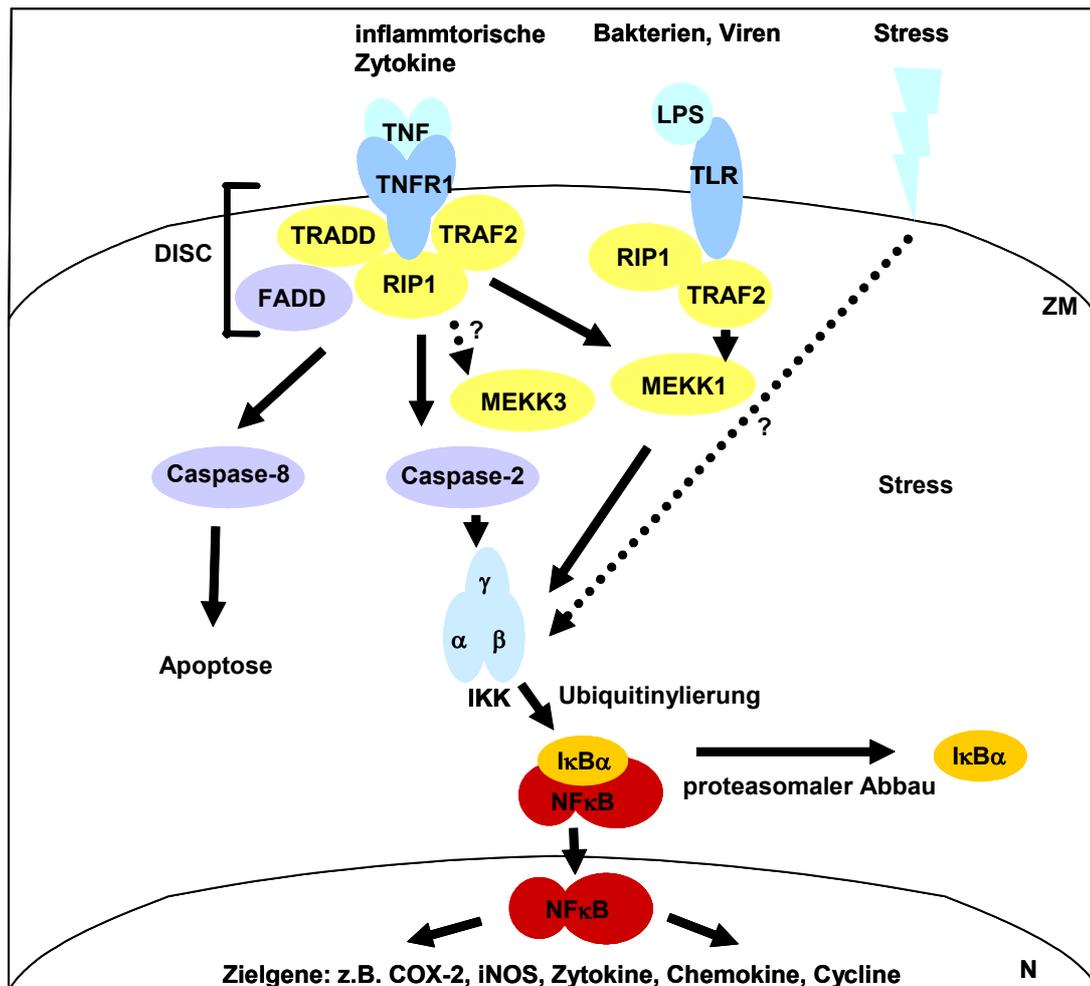


Abb. 7: RIP1 im TNFR1-Komplex und TLR-Komplex (modifiziert nach Dixit *et al.*, 1999; Santoro *et al.*, 2003).

RIP1 ist über den TNFR1-Signaltransduktionskomplex oder über den TLR-Komplex zusammen mit TRADD, TRAF2, Caspase-2 und MEKK1 an der Aktivierung der NFκB-Signaltransduktion beteiligt (Kelliher *et al.*, 1998; Meylan *et al.*, 2003). Für die Induktion der TNF-vermittelten Apoptose bilden RIP1, TRAF2, TRADD und FADD den DISC-Komplex und aktivieren über Caspase-8 die Caspase-Kaskade (Dixit, 1999). Die detaillierten Signalwege sind im Text beschrieben.

Abkürzungen: TNF = Tumor Nekrose Faktor, TNFR1 = TNF Rezeptor 1, TRADD = TNF Rezeptor assoziiertes *Death*domäne Protein, TRAF = TNF Rezeptor assoziierter Faktor, FADD = Fas assoziiertes *Death*domäne Protein, IKK = IκB Kinase (α, β und γ), NFκB = Nukleärer Faktor κB, MEKK = Mitogen-aktivierte Protein Kinase/extrazellulär Signal-regulierte Kinase Kinase Kinase, COX-2 = Cyclooxygenase-2, iNOS = induzierbare Nitric Oxid Synthase, N = Nucleus, ZM = Zellmembran

Neben seiner essentiellen Rolle in der NFκB-Signaltransduktion ist RIP1 auch für die TNF-vermittelte Aktivierung der drei MAP Kinasen p38, JNK (c-Jun N-terminale Kinase) und ERK (Extracellular signal-regulated kinase) notwendig. (Devin *et al.*, 2003). MAP Kinasen phosphorylieren spezifisch Serine und Threonine an ihren Zielproteinen und regulieren dadurch u. a. die Genexpression, die Zellteilung, den Zellmetabolismus, die Apoptose und die Aktivierung

der Immunantwort. MAP Kinasen sind Teil einer Phosphorylierungskaskade, die aus drei Ebenen besteht (Abb. 8). Die MAP Kinase-Signaltransduktionswege werden durch Viren, Karzinogene, Stress, UV-Strahlung, inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert (Überblicke bieten: Cobb and Robinson, 1997; Johnson and Lapadat, 2002; Weston and Davis, 2002).

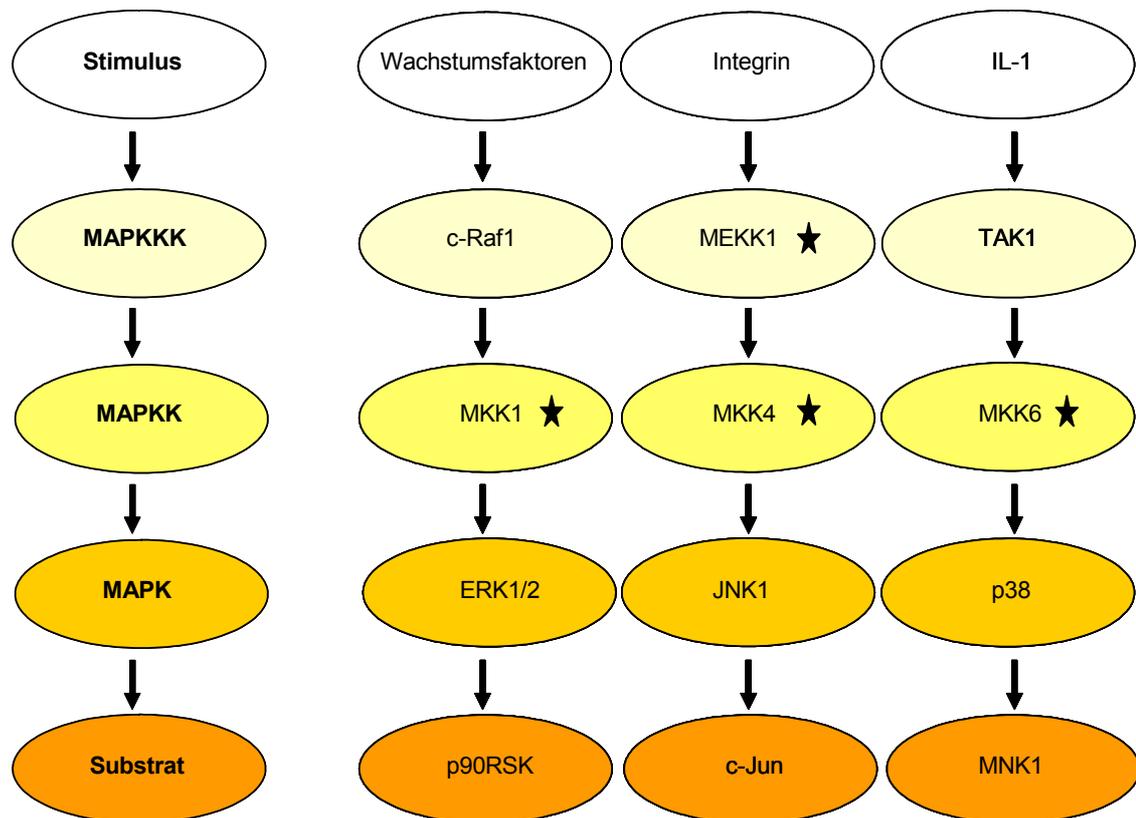


Abb. 8: Schematische Darstellung der MAP Kinase Phosphorylierungskaskade

Die farblich gekennzeichneten Module in einer Reihe stellen jeweils eine Ebene der der MAP Kinasen-Kaskade dar. In der Spalte I ist eine Phosphorylierungskaskade gezeigt. Die Pfeile stehen jeweils für die Phosphorylierung von einem Schritt der Kaskade zum nächsten: durch einen spezifischen Stimulus wird die MAP Kinase Kinase aktiviert. Diese phosphoryliert ihr Substrat, die MAP Kinase Kinase, die wiederum die MAP Kinase phosphoryliert. Im letzten Schritt der Kaskade wird das spezifische Substrat der jeweiligen MAP Kinase aktiviert. In den Spalten II, III und IV sind exemplarisch die Phosphorylierungskaskaden für ERK, JNK und p38 dargestellt. Die Sterne ★ symbolisieren Angriffspunkte für RIP1 über MEKK1 und MEKK3, die als RIP1-Substrate diskutiert werden (Yang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001). Die Abbildung ist modifiziert nach einer Veröffentlichung von Johnson und Lapadat, 2002.

Abkürzungen: ERK = Extrazelluläre Signal-regulierte Protein Kinase 1, JNK = c-Jun N-terminal regulierte Protein Kinase, MKK = Mitogen aktivierte Protein Kinase, MNK = MAPK interagierende Kinase, MAPKKK = Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase, MAPKK = Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase, MAPK = Mitogen aktivierte Kinase, IL-1 = Interleukin-1, c-Raf = c-Raf-Kinase, TAK = Transformierender Wachstumsfaktor-β aktivierte Protein Kinase, p90 RSK = 90kD Ribosomale Protein S6 Kinase.

RIP1 induziert möglicherweise über die Rekrutierung von MEKK3 die p38-Aktivierung (Lee *et al.*, 2003). Die Funktion der RIP1-Kinasedomäne für die Aktivierung des NF κ B- und der MAPK-Signalwege wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits schliessen viele Publikationen eine Rolle der Kinase für die Aktivierung des NF κ B-, des p38- und des JNK-Signalwegs aus (Kelliher *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2000; Devin *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). Andererseits wurde gezeigt, dass die Kinasedomäne von RIP1 für die Aktivierung von NF κ B bei schwacher Oligomerisierung des IKK-Komplexes und für die Aktivierung des ERK-Signalwegs essentiell ist (Inohara *et al.*, 2000; Devin *et al.*, 2003).

RIP1 konnte mittlerweile auch als Bestandteil der TLR-3 (Toll-like receptor 3) und TLR-4 induzierten NF κ B-Aktivierung identifiziert werden (Meylan *et al.*, 2004; Vivarelli *et al.*, 2004). Die Abb. 7 zeigt RIP1 im TLR-vermittelten NF κ B-Signalweg. TLRs initiieren die Immunantwort der Zelle, nachdem Pathogene als solche von der Zelle erkannt wurden. Die Aktivierung der TLRs führt zur Aktivierung von NF κ B, MAP Kinasen und inflammatorischen Zytokinen (Akira *et al.*, 2001).

3. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von RIP1 während der HCMV-Infektion verifiziert werden. In verschiedenen Arbeiten ist bereits gezeigt worden, dass RIP1 nach der HCMV-Infektion hochreguliert wird (Browne *et al.*, 2001; Eickhoff *et al.*, 2003). Auf den ersten Blick kann die Hochregulation von RIP1 zwei mögliche Ursachen haben. Einerseits könnte RIP1 Teil der antiviralen zellulären Immunantwort sein, die nach einer HCMV-Infektion aktiviert wird (siehe Kapitel I, 2). Andererseits könnte RIP1 als Teil des zellulären Signaltransduktions-Netzwerks für die produktive HCMV-Replikation benötigt werden. Für RICK (RIP2) konnte bereits gezeigt werden, dass dessen Hochregulation nach der HCMV-Infektion Teil eines neuen, NF κ B und Interferon- β abhängigen antiviralen Signalwegs ist (Eickhoff *et al.*, 2003). Auch RIP1 ist an wichtigen zellulären Signaltransduktionswegen, wie dem NF κ B-Signalweg und den MAP Kinase-Signalwegen beteiligt (siehe I, 2.3.2). Diese

Arbeit sollte zeigen, inwiefern RIP1 während der HCMV-Infektion Teil eines speziellen oder mehrerer Signaltransduktionswege ist. Dazu sollten Western Blot-Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern für die jeweiligen Signalwege durchgeführt werden. Die Kinase-Aktivität von RIP1 für die verschiedenen zellulären Signalwege wird kontrovers diskutiert (siehe I, 2.3.2). Daher war zunächst von Interesse zu zeigen, ob die RIP1-Kinase-Aktivität für die HCMV-Replikation notwendig ist. Eine Kinase-inaktive RIP1-Mutante RIP K45R wurde etabliert, in der das katalytische Lysin an Position 45 durch ein Arginin ersetzt wurde (Ting *et al.*, 1996). Diese RIP K45R-Mutante wurde in HCMV-Replikations-Tests eingesetzt (III, 2.8 und 2.9).

Da es sich beim humanen Cytomegalievirus um ein streng speziesspezifisches Virus handelt, sind *in vivo*-Versuche am Menschen nicht möglich (Roizman *et al.*, 1992). Aus diesem Grund konnten auch Mausfibroblasten, die eine RIP1-Deletion tragen (RIP^{-/-}-Zellen), nicht in den HCMV-Replikationstests eingesetzt werden, obwohl eine hohe Homologie zum humanen RIP1 besteht (Kelliher *et al.*, 1998). HCMV kann zwar an Mausfibroblasten andocken, sich aber nicht in ihnen replizieren. Für *in vitro*-Experimente gelten primäre humane Vorhautfibroblasten (HFF) als etabliertes Zellkultur-System, in dem HCMV sich vollständig replizieren kann. Ebenso geeignet sind semi-permissive humane Astrozyten (U373) (Mocarski and Courcelle, 2001). Da die Transfektionseffizienz nach transienter Transfektion in HFF-Zellen nur bei ca. 3-5% liegt, wurden replikations-defiziente rekombinante Adenoviren, die entweder RIPwt (AdRIPwt) oder die Kinase-inaktive RIP-Mutante RIP K45R (AdRIP K45R) exprimierten, hergestellt (III, 1.3, 1.4, 2.4, 2.5). Um auszuschließen, dass RIP K45R ein anderes Wachstumsverhalten, eine andere apoptotische Aktivität oder intrazelluläre Lokalisation als RIPwt aufzeigt, wurde dies mittels Wachstumskurven, Apoptosetests und immunocytochemischen Analysen geprüft.

Anschließend sollte anhand von RIP1-Deletions-Mutanten in HCMV-Replikations-Tests untersucht werden, welche Domäne von RIP1 für die HCMV-Replikation notwendig ist. Parallel dazu sollte RIP1 auch chemisch validiert werden. Hierfür wurden HCMV-Replikations-Tests mit spezifischen Inhibitoren der RIP1-Kinase durchgeführt.

Da für RIP1 bislang nur zelluläre Substrate gefunden wurden, sollte mit Hilfe von Kinase-Aktivitäts-Tests untersucht werden, ob RIP1 ein HCMV-spezifisches Substrat haben könnte (Kim *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001).

Anhand der Ergebnisse wurde schliesslich ein vorläufiges Modell zur Rolle der RIP1-Kinase während der HCMV-Replikation diskutiert (siehe V, 4, Abb. 30).

II Material

1. Geräte

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
BioRad Power Pac 200/300	BioRad, München
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Bühler Schüttler	VWR International, Ismaning
Brutschrank Hera Cell	Heraeus, Hanau
Coulter Counter	Beckman Coulter, Krefeld
Digitale Kameraausrüstung Spot	Diagnostic Instruments, Michigan, USA
Eraser	Raytest, Straubenhardt
Phosphoimager Bas 1800	FujiFilm, Japan
GelAir Dryer	BioRad, München
Gel Doc 2000 mit Software Multi-Analyst	BioRad, München
GT Analyst mit Software Analyst	Molecular Devices, Ismaning
Hybridisierungsofen	VWR International, Ismaning
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Oberkochen
Mini-Agarosegelkammer	BioRad, München
Mini-Protean II Cell Proteingelsystem	BioRad, München
Minifuge T	Heraeus, Hanau
Optima ^{TE} LE-80K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
PCR-Maschine Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Rollator RM5	Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim
Sonifier Bochem DIN 12897	Bochem Laborbedarf, Weilburg
Sorvall RC 5C Plus Kühlzentrifuge	Sorvall, Bad Nauheim
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
TransBlot [®] SD Semidry Transfer Cell	BioRad, München
TriCarb 2100 Liquid Szintillation Counter	Perkin Elmer, Köln
Ultraschallgerät Sonifier B15	Beckmann, Frankfurt
Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann, Frankfurt
UVC 500 UV-Crosslinker	Hoefer, California, USA
Victor ² V mit Software Wallac 1420 Manager	Wallac, Turku, Finland
VortexGene2	Scientific Industries, New York, USA
3UV [™] Transilluminator	UVP, California, USA

2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien von höchster Reinheit wurden von den angegebenen Firmen bezogen und den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Alamar Blue-Lösung (Resazurin)	Biozol, Eching
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ATP (Adenosin-5'-Triphosphat)	Roche Diagnostics, Mannheim
Bactoagar	Difco, Augsburg
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco, Augsburg
Bacto-Trypton	Difco, Augsburg
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg
Collagen G	Biochrom Seromed, Berlin
Coomassie-Brilliant Blau R-250	Merck, Darmstadt
Coomassie Plus Protein AssayReagent	Pierce, Rockfort, USA
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Serva, Heidelberg
Desthiobiotin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMF (Dimethylformamid)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNA-Heringssperma	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA-Längenstandard 1kBp	Invitrogen, Karlsruhe
DOC (Natriumdesoxycholat)	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
ECL™ Western Blotting Reagent	GE Healthcare, Freiburg
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Einmalpipetten für die Zellkultur	Greiner, Nürtingen
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics, Mannheim
FKS (fötales Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Formamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fugene6	Roche Diagnostics, Mannheim
Gelatine	Biochrom Seromed AG, Berlin
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Giemsa-Färbelösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Harnstoff (ultra pure)	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl] Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure])	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Histon 2B	Roche Diagnostics, Mannheim
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg

Immobilon™ –P Transfer Membran	Millipore Corporation, Michigan, USA
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid)	Roche Diagnostics, Mannheim
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Küvetten	BioRad, München
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipofectin®	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine™	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine® plus	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine® 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MBP (Myelin Basic Protein)	Biomol, Hamburg
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Microspin G-25/G-50	GE Healthcare, Freiburg
MOPS (4-Morpholinopropansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-hydroxysuccimid (NHS)-Biotin	Pierce, Rockfort, USA
Nick™ Column	GE Healthcare, Freiburg
Nitrocellulose-Membran (0,2 μm)	Schleicher&Schuell, Dassel
NKS (Neugeborenen Kälberserum)	Biochrom Seromed, Berlin
NP40 (IGEPAL CA-630)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTP-Set	Invitrogen, Karlsruhe
Parafilm	American Can Company, Greenwich, USA
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
PEG (Polyethylenglycol MW 8000)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PEI (Poly-Ethylenimin MW 2000)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PEI (Poly-Ethylenimin MW 25000)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Beverly, USA
Protein-A-Sepharose	GE Healthcare, Freiburg
Protein-G-Sepharose	GE Healthcare, Freiburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg Greiner, Nürtingen
Röntgenfilme BioMax MR/MS	Eastman Kodak, New York, USA
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Sephadex G50 Säulen	GE Healthcare, Freiburg
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Spritzen/ Kanülen	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Schleicher&Schuell, Dassel
StrepTactin Macroprep	IBA, Göttingen
Streptavidin-biotinylierte Meerrettich-peroxidase	GE Healthcare, Braunschweig
Streptavidin-Sepharose	Pierce, Rockfort, USA
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Superfect®	Qiagen, Hilden

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Tetracyclin	Roche Diagnostics, Mannheim
Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton-X100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Biochrom Seromed, Berlin
Tween 20	Merck, Darmstadt
UVette , Einmalküvetten	VWR International, Ismaning
Vectashield Mounting Medium	Alexis Deutschland, Grünberg
Whatman® 3MM-Papier	Whatman International, Maidstone, England
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zellkulturflaschen/ Zellkulturschalen/ Zellschaber	Greiner, Nürtingen Costar, Cambridge, USA Nunc, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen	Costar, Cambridge, USA Beckmann, München

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien stammen von den Firmen:

BioRad	München
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
Merck KGaA	Darmstadt
Invitrogen	Karlsruhe
Serva	Heidelberg
Sigma-Aldrich	Taufkirchen
VWR International	Ismaning

3. Enzyme

Alkalische Phosphatase (calf intestine alkaline phosphatase)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
Herculase® Enhanced DNA Polymerase	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
Klenow Fragment	Roche Diagnostics, Mannheim
Lysozym	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Pfu</i> -Turbo-DNA-Polymerase	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
Protease-Inhibitoren-Cocktail (<i>Complete™</i> EDTA-free)	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Madison, USA
RNaseH	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase free DNase-set	Qiagen, Hilden
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>T4</i> -DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>T4</i> -DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim

Trypsin/EDTA

Invitrogen, Karlsruhe

Die Restriktionsendonukleasen wurden mit den dazugehörigen Inkubationspuffern gemäß Herstellerangaben eingesetzt.

4. Zellkulturreagenzien

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
BAY 11-7085 (E)-[4- <i>t</i> -Buthylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile	Calbiochem, Bad Soden
Forskolin, <i>Coleus Forskohlii</i>	Calbiochem, Bad Soden
Ganciclovir	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IFN γ (Interferon γ)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IL (Interleukin)-1 β , -4, -6, -8	Calbiochem, Bad Soden
MG-132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal)	Calbiochem, Bad Soden
MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein-1 α)	Calbiochem, Bad Soden
RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted/CCL5)	Calbiochem, Bad Soden
Staurosporine (C ₂₈ N ₂₆ N ₄ O ₃)	Biomol, Hamburg
TNF α (Tumor Necrosis Factor α)	Merck, Darmstadt

5. Radioaktive Verbindungen

Adenosin 5'-[$\alpha^{32}\text{P}$] desoxytriphosphat	15TBq/mmol ~ 400Ci/mmol 370MBq/ml ~ 10mCi/ml, GE Healthcare, Freiburg
Adenosin 5'-[$\alpha^{33}\text{P}$] desoxytriphosphat	15TBq/mmol ~ 400Ci/mmol 370MBq/ml ~ 10mCi/ml GE Healthcare, Freiburg
Adenosin 5'-[$\gamma^{32}\text{P}$] triphosphat	110TBq/mmol ~ 3000Ci/mmol, 370MBq/ml ~ 10mCi/ml, GE Healthcare, Freiburg
Phosphorus-32 ([^{32}P] PO ₄)	92,5-129,5TBq/mmol ~ 2500-3000 Ci/mmol, 370MBq/ml ~ 10mCi/ml, GE Healthcare, Freiburg

6. Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primärantikörper wurden zur Detektion humaner Proteine verwendet.

<u>Primärantikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-c-Jun vom Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling, Madison, USA
Anti-ERK 1/2 von der Maus (monoklonal)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-GFP von der Maus	Clontech, California, USA
Anti-HA.11 von der Maus (monoklonal)	Hiss Diagnostics, Freiburg
Anti-HA von der Maus (monoklonal)	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-HCMV- IE1/2 (IE72/IE86) von der Maus (monoklonal)	Chemicon, Hofheim
Anti-HCMV-IE1 (IE72) von der Maus (monoklonal)	Tebu, Freiburg
Anti-HCMV-pp65 von der Maus (monoklonal)	T. Stamminger, Universität Erlangen
Anti-I κ B- α vom Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling, Madison, USA
Anti-IL-8 von der Maus (monoklonal)	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-p38 vom Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling, Madison, USA
Anti-Phospho-c-Jun (Ser63/Ser73) vom Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling, Madison, USA
Anti-Phospho-ERK 1/2 (Tyr202/204) vom Kaninchen (polyklonal)	New England Biolabs, Madison, USA
Anti-Phospho-I κ B- α (Ser32) vom Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling, Madison, USA
Anti-Phospho-p38 (Tyr180/Tyr182) vom Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling, Madison, USA
Anti-Rantes/CCL5	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-RICK vom Kaninchen (polyklonal)	Dianova, Hamburg
Anti-RIP1 vom Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti- <i>Strep</i> -Tactin [®] Peroxidase-konjugiert	IBA GmbH, Göttingen
Anti-Tubulin von der Maus (monoklonal)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen IgG vom Esel, FITC (Fluoresceinthiocyanat)-konjugiert	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG von der Ziege, Cy TM 3-konjugiert	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege, Peroxidase-konjugiert	Dako, Hamburg
Anti-Maus IgG vom Esel, FITC-konjugiert	Dianova, Hamburg
Anti-Maus IgG+IgM von der Ziege, Cy TM 3-konjugiert	Dianova, Hamburg
Anti-Maus IgG+IgM von der Ziege, Peroxidase-konjugiert	Dianova, Hamburg

7. Kits

Die folgenden Kits wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet.

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
ABI Prism PDAR (Pre-developed Assay Reagent) TaqMan-Kit für GAPDH, Eotaxin und MIP-1 α	Applied Biosystems, Darmstadt
Caspase-Glo™ 3/7 Assay	Promega, Mannheim
EndoFree Plasmid Max Kit	Qiagen, Hilden
DC Protein Assay Reagent A+B	BioRad, München
Mercury™ Pathway Profiling Luciferase System	Clontech, California, USA
Nucleospin Plasmid Kit	Machery&Nagel, Düren
QIAexpressionist™ System	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
Quantikine® human IL-6 ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine® human IL-8 ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine® human MIP-1 α ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine® human Rantes ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine® human TNF α ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quick Change™ Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
Random Primers DNA Labeling System	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy Mini Extraction Kit	Qiagen, Hilden
SteadyLight HTS Luminescence Reporter Gene Assay System	Perkin Elmer, Rodgau
Terminale Transferase Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
TranSignal™ Human Cytokine Antibody Array 3.0	Biocat, Heidelberg
VenorGem® Mycoplasma PCR Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin

8. Medien und Puffer

8.1 Medien und Puffer für die Kultivierung eukaryontischer Zellen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
HBS (HEPES buffered saline)	150mM NaCl 20mM HEPES, pH 7,5
MEM (Minimum Essential Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
Minimum Essential Medium Eagle ohne Phosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe
PBS (Phosphate buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe

8.2 Medien und Puffer für die Kultivierung von Bakterien

- 1x LB (Luria-Bertani-Broth)-Medium

0,5% (w/v)	Bacto-Hefe-Extrakt
1% (w/v)	Bacto-Trypton
1% (w/v)	NaCl (pH7,5 einstellen)

- 1x LB-Agar

1,5% (w/v)	Bacto-Agar in LB-Medium
------------	----------------------------

Antibiotika (100µg/ml Ampicillin oder 25µg/ml Kanamycin) werden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C zugesetzt.

- TSS-Puffer (sterilfiltriert)

0,5% (w/v)	Bacto-Hefe-Extrakt
1% (w/v)	Bacto-Trypton
0,5% (w/v)	NaCl
10% (w/v)	PEG 3000
5% (v/v)	DMSO
50mM	MgCl ₂ (pH6,5 einstellen)

8.3 Puffer für die Lyse eukaryontischer Zellen

- IP (Immunpräzipitations)-Puffer

50mM	Tris-HCl, pH7,5
2% (v/v)	Triton X-100
100mM	NaCl
10% (v/v)	Glycerol

Vor jedem Gebrauch wurden 30mM NaF, 10µg/ml Aprotinin, 10µg/ml Leupeptin, 100mM Natriumorthovanadat, 100µg/ml DNaseI und Protease-Inhibitor-Cocktail (siehe II, 3.; Verdünnung 1:25) zugesetzt.

- 2x Lysis-Buffer für den HCMV-Replikations-Assay

50mM	Tris-HCl, pH7,8
2% (v/v)	Triton X-100
20% (v/v)	Glycerol
4mM	EDTA, pH8,0
4mM	DTT

Der Puffer wurde bei -20°C gelagert, und vor jedem Gebrauch wurde mit dH₂O eine 1x Lösung hergestellt.

- Lysis-Buffer LB#4 für die Lyse von Adenoviren

20mM	HEPES, pH7,5
150mM	NaCl
20mM	β-Glycerophosphat
10mM	NaF
0,5% (v/v)	NP-40
2mM	MgCl ₂
2mM	EDTA, pH8,0
1mM	Na ₃ VO ₄

Vor jedem Gebrauch wurden 2mM DTT, 1mM PMSF und Protease-Inhibitor-Cocktail (siehe II, 3.; Verdünnung 1:25) zugesetzt.

- NSB II (New Storage Buffer II)
für die Lagerung von Adenoviren
- | | |
|-----------|-------------------|
| 20mM | HEPES, pH7,5 |
| 150mM | NaCl |
| 10% (v/v) | Glycerol |
| 10mM | NaF |
| 2mM | MgCl ₂ |
| 0,1mM | EDTA, pH8,0 |

Vor jedem Gebrauch wurden 2mM DTT und Protease-Inhibitor-Cocktail (siehe II, 3.; Verdünnung 1:25) zugesetzt.

- NSTB
(New Standard Triton Lysis Buffer)
für Immunpräzipitationen
- | | |
|-----------|--------------|
| 50mM | HEPES, pH7,5 |
| 1% (v/v) | Triton X-100 |
| 150mM | NaCl |
| 1mM | EDTA, pH8,0 |
| 10% (v/v) | Glycerol |

Vor jedem Gebrauch wurden 10mM Natriumpyrophosphat, 10mM NaF, 10mM Natriumorthovanadat, 10µg/ml Aprotinin, 10µg/ml Leupeptin, 1mM PMSF, 0,2mM DTT, 100µg/ml DNaseI und Protease-Inhibitor-Cocktail (siehe II, 3.; Verdünnung 1:25) zugesetzt.

- RIPA-Puffer, pH7,5
- | | |
|------------|-----------------|
| 1% (v/v) | Triton X-100 |
| 1% (v/v) | DOC |
| 0,1% (w/v) | SDS |
| 20mM | Tris-HCl, pH7,5 |
| 150mM | NaCl |
| 10mM | EDTA, pH8,0 |

Vor jedem Gebrauch wurden 30mM NaF, 10µg/ml Aprotinin, 10µg/ml Leupeptin, 2mM Natriumpyrophosphat, 1mM PMSF, 100µg/ml DNaseI und Protease-Inhibitor-Cocktail (siehe II, 3.; Verdünnung 1:25) zugesetzt.

- RIP-Lyse-Puffer, pH7,5 (high salt)
- | | |
|----------|-----------------|
| 20mM | Tris-HCl, pH7,5 |
| 1M | NaCl |
| 1% (v/v) | Triton X-100 |
| 1mM | EDTA, pH8,0 |

- RIP-Lyse-Puffer, pH7,5 (low salt)
- | | |
|----------|-----------------|
| 20mM | Tris-HCl, pH7,5 |
| 150mM | NaCl |
| 1% (v/v) | Triton X-100 |
| 1mM | EDTA, pH8,0 |

Vor jedem Gebrauch wurden 30mM NaF, 10µg/ml Aprotinin, 10µg/ml Leupeptin, 2mM Natriumpyrophosphat, 100µg/ml DNaseI und Protease-Inhibitor-Cocktail (siehe II, 3.; Verdünnung 1:25) zugesetzt.

- TES-Puffer für Hirt-DNA
- | | |
|------------|------------------|
| 10mM | Tris-HCl, pH 7,5 |
| 1mM | EDTA, pH8,0 |
| 0,6% (w/v) | SDS |

- TNCA-Puffer für die Aufbewahrung von Adenoviren

100mM	NaCl
10mM	CaCl ₂
0,2% (w/v)	NaN ₃ in Tris-HCl, pH8,0

8.4 Puffer und Gele für die Elektrophorese und die Western Blot-Analyse

- 10x TAE

2M	Tris-Base
0,1M	EDTA
1M	NaAcetat (pH 8,0 einstellen)
- 6x Probenpuffer für Agarosegele

0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylencyanol
40%	Ficoll Type 400

• Polyacrylamidgele

Komponenten	Trenngel 8%/ 10%/ 15%	Sammelgel 3,4%
dH ₂ O (ml)	4,6/ 3,9/ 2,3	3,4
Rotiphorese [®] Gel 30 (ml)	2,6/ 3,4/ 5,0	0,83
1M Tris, pH6,8 (ml)	-	0,63
1,5M Tris, pH8,8 (ml)	2,6/ 2,5/ 2,5	-
10% (w/v) SDS (ml)	0,1	0,05
10% (w/v) APS (ml)	0,1	0,05
TEMED (ml)	0,001	0,0001

- 10x Laemmli-Puffer

250mM	Tris-HCl
1,92M	Glycin
1% (w/v)	SDS
- 3x Laemmli-Probenpuffer

30% (v/v)	Glycerol
3% (w/v)	SDS
62,5mM	Tris-HCl, pH6,8
0,03% (w/v)	Bromphenolblau
5% (v/v)	β-Mercaptoethanol
- Coomassie G250

0,4% (w/v)	Coomassie G250
45% (v/v)	Methanol (technisch)
10% (v/v)	Essigsäure
- Coomassie-Entfärber

5% (v/v)	Methanol (technisch)
7% (v/v)	Essigsäure
- Transblot SD

25mM	Tris-HCl
192mM	Glycin
0,1% (w/v)	SDS
20% (v/v)	Methanol (technisch)

- 10x NET
 - 6% (w/v) NaCl
 - 0,5M Tris-HCl, pH7,5
 - 0,5% (v/v) Triton X-100
 - 50mM EDTA, pH8,0

- 10x NET+Gelatine
 - 2,5% (v/v) Gelatine
in 10x NET

- Strip-Puffer
 - 32mM Tris-HCl, pH8,0
 - 20% (w/v) SDS
 - 1% (v/v) β -Mercaptoethanol (14,4M)

8.5 Puffer und Gele für die Northern Blot-Analyse

- 10x MOPS
 - 4,19% (w/v) MOPS
 - 0,4% (w/v) NaAc
 - 0,37% (w/v) EDTA (pH7,0 einstellen)

- RNA-Gel
 - 900mg Agarose
 - 7,5ml 10x MOPS
 - 13,5ml Formaldehyd
 - 54ml DEPC dH₂O

- RSB (RNA-Proben-Puffer)
 - 50% (v/v) Formamid
 - 17,5% (v/v) Formaldehyd
 - 10% (v/v) 10x MOPS

- RLB (RNA-Lade-Puffer)
 - 15% (w/v) Ficoll 400
 - 50% (v/v) 10x MOPS
 - 1,6% (v/v) Ethidiumbromid (10mg/ml)
 - 10% (w/v) Bromphenolblau

- 20x SSC
 - 3M NaCl
 - 0,3M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
(pH7,0 einstellen)

- 100x Denhardt's-Lösung
 - 2% (w/v) Ficoll 400
 - 2% (w/v) BSA
 - 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidone

- Oligo-Hybridisierungspuffer
 - 7% (w/v) SDS
 - 10% (v/v) 100x Denhardt's-Lösung
 - 20% (w/v) NaPO₄, pH7,0
 - 25% (v/v) 20x SSC

- Oligo-Waschpuffer I
 - 15% (v/v) 20x SSC
 - 5%(w/v) SDS
 - 10% (w/v) NaPO₄, pH7,0
 - 10% (v/v) 100x Denhardt's-Lösung

- | | |
|--|---------------------------------|
| • Oligo-Waschpuffer II | 5% (v/v) 20x SSC |
| | 1% (w/v) SDS |
| • cDNA-Hybridisierungspuffer
(Northern „high“-solution) | 50% (v/v) Formamid |
| | 25% (v/v) 20x SSC |
| | 0,2% (w/v) SDS |
| | 5% (v/v) 100x Denhardt's-Lösung |

8.6 Kinase-Aktivitäts-Test-Puffer

RIP-Kinase-Aktivitäts-Test-Puffer	20mM HEPES, pH7,5
	1mM DTT
	3mM MnCl ₂
	20mM NaCl
	1μM dATP

Für den Kinase-Aktivitäts-Test wurden pro Reaktionsansatz 1μCi $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP (mit einer spezifischen Aktivität von 3000mCi/mmol) zugegeben.

9. Eukaryontische Zellen und Zelllinien

- HFF (Human Foreskin Fibroblasts)
Humane Vorhautfibroblasten wurden aus Vorhäuten von Neugeborenen oder Kleinkindern gewonnen und in Kultur gebracht. Für die Versuche wurden HFF zwischen der 5. und der 20. Passage verwendet (zur Verfügung gestellt von T. Stamminger, Universität Erlangen).
- U373
Die humanen Astrocytomzellen wurden von T. Stamminger, Universität Erlangen zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie wurde von der ATCC (American Type Culture Collection) bezogen (ATCC.HT-B17).
- HeLa
Die humanen Cervixkarzinomzellen wurden von der ATCC (ATCC.CCL-2) bezogen.
- HEK293
Humane embryonale Nierenepithelzellen wurden durch das humane Adenovirus Typ 5 stabil transformiert. Die Zelllinie wurde von der ATCC bezogen (ATCC.CRL-1573).
- HEK293T
Humane embryonale Nierenepithelzellen wurden durch das humane Adenovirus Typ 5 stabil transformiert. Zusätzlich ist in dieser Zelllinie das SV40 (Simian Virus 40) T-Antigen stabil integriert (Pear *et al.*, 1993).

- HEK293-tet (Klon 9)

Humane embryonale Nierenepithelzellen wurden durch das humane Adenovirus Typ 5 stabil transformiert. Zusätzlich exprimiert die Zelllinie konstitutiv einen Tetrazyklin-abhängigen Repressor (tet-Repressor) (Glotzer *et al.*, 2001). Die in den Zellklon transfizierten, rekombinanten Adenovirusgenome enthalten vor dem HCMV-IE-Enhancer/Promotor eine tet-Repressor-Bindungsstelle. In Abwesenheit von Tetrazyklin wird der Promotor blockiert und damit auch die Expression des in den Adenovektor rekombinierten Gens. Diese Expressionsblockade schließt einen möglichen zytotoxischen Effekt des rekombinierten Gens aus. Diese Zelllinie wurde von M. Cotten, Axxima Pharmaceuticals AG, zur Verfügung gestellt.

- A549

Die humanen Lungenkarzinomzellen wurden von der ATCC bezogen (ATCC.CCL-185).

- Jurkat

Diese humanen T-Lymphozyten wurden von der ATCC bezogen (ATCC.TIB-152).

- Jurkat RIP def.

Humane T-Lymphozyten wurden auf folgende Eigenschaften selektioniert: 1. nicht-responsiv auf die durch $TNF\alpha$ induzierte Apoptose zu sein, 2. responsiv auf die Fas/Apo1-Apoptose zu sein und 3. keine RIP-Expression zu zeigen (Ting *et al.*, 1996). Diese Zellen wurden von T. Stamminger, Universität Erlangen zur Verfügung gestellt.

- NIH 3T3

Die murinen Hautfibroblasten wurden von der ATCC bezogen (ATCC.CRL-1658).

- NIH3T3 $NF\kappa B$ -Luc (Klone 300D8 und 75E11)

Murine Hautfibroblasten exprimieren stabil das *Luciferase*-Gen unter dem $NF\kappa B$ -Promotor. Diese Zellklone wurden von T. Herget, Axxima Pharmaceuticals AG, zur Verfügung gestellt.

- MEF RIP^{-/-}

Diese murinen embryonalen Fibroblasten sind homozygot in Bezug auf einen RIP Knockout (Kelliher *et al.*, 1998). Diese Zellen wurden von T. Stamminger, Universität Erlangen, zur Verfügung gestellt.

10. Virusstämme

- HCMV AD169wt

Das Humane Cytomegalievirus Stamm AD169wt (Laborstamm) wurde ursprünglich von Rowe isoliert (Rowe *et al.*, 1956). Das Virus wurde von T. Stamminger, Universität Erlangen, zur Verfügung gestellt.

- HCMV AD169 GFP

Das Humane Cytomegalievirus Stamm AD169 exprimiert GFP (Green Fluorescent Protein) (Marschall *et al.*, 2000). Es wurde von T. Stamminger, Universität Erlangen, zur Verfügung gestellt.

11. Bakterienstämme

<i>E.coli</i> , Stamm XL-1 Blue	K12, recA1, lac ⁻ , endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, (F' pro AB, lacIq, lacZΔM15, Tn10) (Stratagene, Heidelberg)
<i>E.coli</i> , Stamm DH5α	supE44, ΔlacU169 (φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 (Pharmacia, Freiburg)
<i>E.coli</i> , Stamm K12 M15 [pREP4]	nal ^S , str ^S , rif ^S , thi ⁻ , lac ⁻ , ara ⁺ , gal ⁺ , mtl ⁻ , F ⁻ recA ⁺ , uvr ⁺ , lon ⁺ (Qiagen, Hilden)
<i>E.coli</i> , Stamm BJ5183	EndA, sbcBC, recBC, galK, met thi-1, bioT, hsdR (Str) (zur Verfügung gestellt von M. Cotten, Axxima Pharmaceuticals AG)

12. Plasmide und rekombinante Adenoviren

- pPM7tet

Der eukaryote Expressions- und Transfervektor für die homologe Rekombination in den Adenovirusvektor pAdtetKK beinhaltet den HCMV-IE-Enhancer/Promotor und das Kaninchen-β-Globin-Intron, das gleichzeitig als flankierende Sequenz für die homologe Rekombination dient (zur Verfügung gestellt von M. Cotten, Axxima Pharmaceuticals AG).

Die folgenden RIP-Konstrukte sind im Anhang in der Abb. 32 dargestellt.

- pPM7tet-RIPwt-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert das humane RIP1 (GenBank Accession Nummer NM_003804) mit einem C-terminalen Strep-tag (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIP K45R-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert eine Kinase-inaktive Mutante von RIP1, in der das katalytische Lysin 45 zum Arginin mutiert wurde, mit einem C-terminalen Strep-tag (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIPwt K-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert die Kinasedomäne (AS 1-300) von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIP K45R K-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert die Kinase-inaktive Mutante der Kinasedomäne von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIPwt KI-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert die Kinase- und Intermediärdomäne (AS 1-595) von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIP K45R KI-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert die Kinase-inaktive Mutante der Kinase- und Intermediärdomäne von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag (diese Arbeit).

- pPM7tet- RIPwt Δ I-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert die Kinase- und Deathdomäne (AS 1-300 und 595-671) von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag. Die Intermediärdomäne (AS 300-595) wurde durch reverse PCR deletiert (hergestellt von M. Baumann, Axxima Pharmaceuticals AG).

- pPM7tet-RIP K45R Δ I-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert die K45R-Mutante der Intermediärdomänen-Deletion von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag (hergestellt von M. Baumann, Axxima Pharmaceuticals AG).

- pPM7tet- RIP I-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert die Intermediärdomäne (AS 300-595) von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIP IDD-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert die Intermediär- und Deathdomäne (AS 300-671) von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIP DD-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert die Deathdomäne (AS 595-671) von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIP D138N-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert eine weitere Kinase-inaktive Mutante, in der das Aspartat 138 zum Asparagin (D138N) mutiert wurde. Zusätzlich weist es einen C-terminalen Strep-tag auf (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIPwt Δ 132-322-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert eine Mutante von RIP1, in der die MEKK3-Bindestelle (AS 132-322) deletiert wurde mit einem C-terminalen Strep-tag (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIP K45R Δ 132-322-ST

Das eukaryote Expressionsplasmid exprimiert die K45R-Mutante der Deletionsmutante Δ 132-322 von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIPwt D324N-ST

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert eine Mutante von RIP1, in der das Aspartat an Position 324 zum Asparagin mutiert wurde (D324N). An der Position 324 befindet sich die Caspase-8-Schnittstelle (diese Arbeit).

- pPM7tet-RIP K45R D324N-ST

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert die K45R-Mutante der D324N-Mutante von RIP1 (diese Arbeit).

- pPM7tet-MKK6_{2E}-ST

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert eine konstitutiv aktive Mutante von MKK6 (Raingeaud *et al.*, 1996), in der das Serin an Position 207 und das Threonin an Position 211 zu Glutamat mutiert wurden (hergestellt von M. Baumann, Axxima Pharmaceuticals AG).

- pcDNA3.1

Das eukaryonte Expressionsplasmid besitzt Ampicillin- und Neomycin-Resistenzkassetten, den SV40 ori als Replikationsursprung, das SV40-Polyadenylierungssignal, den HCMV-IE-Enhancer/Promotor und den Co1E1 ori (Invitrogen, Karlsruhe).

- pcDNA3.1-RIPwt-HA

Das eukaryonte Expressionsplasmid auf der Basis des pcDNA3.1-Vektors, exprimiert humanes RIP1 (GenBank Accession Nummer NM_003804) mit einem C-terminalen HA-tag (hergestellt von U. Wellbrock, Axxima Pharmaceuticals AG).

- pcDNA3.1-RIP K45R-HA

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert eine kinase-inaktive Mutante des RIP1, in der das Lysin an Position 45 zu einem Arginin mutiert wurde. Zusätzlich weist es einen C-terminalen HA-tag auf (hergestellt von U. Wellbrock, Axxima Pharmaceuticals AG).

- pcDNA3.1-Luc-Religation

Das eukaryonte Expressionsplasmid auf der Basis des pcDNA3.1-Vektors, exprimiert das Gen der „*firefly luciferase*“, religiert aus dem Plasmid pcDNA3.1-Luc-3'UTR-MARCKS (Wein *et al.*, 2003). Das Plasmid wurde von T. Herget, Axxima Pharmaceuticals AG, zur Verfügung gestellt (diese Arbeit).

- pcDNA-Luc-3'UTR-IL-8

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert sowohl das Gen der „*firefly luciferase*“ als auch die Basenpaare 972-1310 der nicht-translatierten 3'UTR-Region von IL-8 (Genbank Accession Nummer Y00787) (Winzen *et al.*, 1999) (diese Arbeit).

- pUHC 13-3-IL-8pr wt

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert das Gen der „*firefly luciferase*“ unter dem IL-8-Promotor (Holtmann *et al.*, 1999). Das Plasmid wurde von M. Kracht, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

- pUHC 13-3-IL-8pr mκB

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert eine Mutante des IL-8pr wt-Konstrukts, in der die NFκB-Bindestelle des IL-8-Promotors mutiert wurde (Holtmann *et al.*, 1999). Das Plasmid wurde von M. Kracht, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

- pUHC 13-3-IL-8pr mAP1

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert eine Mutante des IL-8pr wt-Konstrukts, in der die AP-1-Bindestelle des IL-8-Promotors mutiert wurde (Holtmann *et al.*, 1999). Das Plasmid wurde von M. Kracht, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

- pUHC 13-3-IL-8pr mNF

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert eine Mutante des IL-8pr wt-Konstrukts, in der die NF-IL6-Bindestelle durch Mutation inaktiviert wurde (Holtmann *et al.*, 1999). Das Plasmid wurde von M. Kracht, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

- pUHC 13-3-IL-8pr dm

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert eine Doppelmutante des IL-8pr wt-Konstrukts (Holtmann *et al.*, 1999), in der sowohl die NFκB- als auch die AP-1-Bindestelle mutiert wurden. Das Plasmid wurde von M. Kracht, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

- pK18II

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert das Gen der „*firefly luciferase*“ unter dem IL-6-Promotor (Matsusaka *et al.*, 1993; Betts *et al.*, 1993). Dieses Plasmid wurde von S. Akira, Osaka University, Japan, zur Verfügung gestellt.

- pK18 mNF

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert eine Mutante des K18 II-Vektors, in der die NF-IL6-Bindestelle mutiert wurde (Matsusaka *et al.*, 1993; Betts *et al.*, 1993). Das Plasmid wurde von S. Akira, Osaka University, Japan, zur Verfügung gestellt.

- pK18 mκB

Das eukaryonte Expressionsplasmid exprimiert eine Mutante des K18 II-Vektors, in der die NFκB-Bindestelle mutiert wurde (Matsusaka *et al.*, 1993; Betts *et al.*, 1993). Es wurde von S. Akira, Osaka University, Japan, zur Verfügung gestellt.

- pHM 287

Das eukaryonte Expressionsplasmid auf der Basis des pUC18-Vektors, exprimiert das Gen der „*firefly luciferase*“ unter dem HCMV-IE-Enhancer/Promotor. Es wurde von T. Stamminger, Universität Erlangen, zur Verfügung gestellt.

- pRR47

Das eukaryote Expressionsplasmid auf der Basis des pUC18-Vektors, exprimiert das HCMV-IE1/2 (pUL122/123) mit jeweils zwei Transkripten für IE1 (p72) und IE2 (p86). Es wurde von T. Stamminger, Universität Erlangen zur Verfügung gestellt.

- pEGFP-N2

Das EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)-kodierende, eukaryote Expressionsplasmid wurde als Standard-Transfektionskontrolle verwendet (Clontech, California, USA).

- pAdtetKK

Der durch die Deletion der E1/E3-Region replikations-defiziente Adenovirusvektor (36589 Bp), beinhaltet den HCMV-IE-Enhancer/Promotor, das Kaninchen- β -Globin-Intron, den prokaryontischen Replikationsursprung pBR 237 ori und exprimiert das MHC-Klasse I-Molekül der Maus (KK). Der Adenovirusvektor wurde von M. Cotten, Axxima Pharmaceuticals AG, zur Verfügung gestellt.

- AdJ5

Der Kontroll-Adenovirusvektor ist durch die Deletion der E1/E3-Region replikations-defizient, beinhaltet aber keine Expressionskassette. Er wurde von M. Cotten, Axxima Pharmaceuticals AG, zur Verfügung gestellt.

- AdGFP

Das rekombinante Adenovirus exprimiert GFP und wurde als Standard-Transduktionskontrolle verwendet. Es wurde von M. Cotten, Axxima Pharmaceuticals AG, zur Verfügung gestellt.

- AdRIPwt

Das rekombinante Adenovirus exprimiert RIP1 (GenBank Accession Nummer NM_003804) mit einem C-terminalen HA-tag. Es wurde von M. Cotten, Axxima Pharmaceuticals AG, zur Verfügung gestellt.

- AdRIP K45R

Das rekombinante Adenovirus exprimiert eine Kinase-inaktive Mutante von RIP1, bei der an Position 45 das Lysin gegen ein Arginin ausgetauscht wurde und enthält zusätzlich noch einen C-terminalen HA-tag. Es wurde von M. Cotten, Axxima Pharmaceuticals AG, zur Verfügung gestellt.

- AdRIPwt K

Das rekombinante Adenovirus exprimiert die Kinasedomäne (K) von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag. Es wurde in Zusammenarbeit mit M. Cotten, Axxima Pharmaceuticals AG, hergestellt.

- AdRIP K45R K

Das rekombinante Adenovirus exprimiert die Kinase-inaktive (K45R) Kinasedomäne von RIP1 mit einem C-terminalen Strep-tag. Es wurde in Zusammenarbeit mit M. Cotten, Axxima Pharmaceuticals AG, hergestellt.

pp65 rev
 CCG GTA CCC TAT CCT CCA AAT TGT
 GGA TGC CTC CAA GCA CCT CGG TGC
 TTT TTG GGC

pp65 *Bam* for
^{*Bam*HI}
 GGG GAT CCG AGT CGC GCG GTC GCC
 GTT GTC C

pp65 K436N F
 GCC TCC ACT TCC GCG GGC CGC AAC
 CGC AAA TCA GCA TCC TCG GCG

pp65 K436N R
 CGC CGA GGA TGC TGA TTT GCG GTT
 GCG GCC CGC GGA AGT GGA GGC

RIP *PacI* for
^{*PacI* *Start*}
 GGT TAA TTA AAT GCA ACC AGA CAT GTC
 CTT G

RIP *KpnI* rev
^{*KpnI* *Stop* *Strep-tag*}
 CCG GTA CCC TAT CCT CCA AAT TGT
 GGA TGC CTC CAA GCG TCC TCT TCT
 ACA CTT TCT TC

RIP int for
^{*PacI* *Kozak* *Start*}
 GGT TAA TTA ACC ACC ATG GTG AAG AGT
 TTA AAG AAA GAG

RIP int rev
^{*KpnI* *Stop* *Strep-tag*}
 CCG GTA CCC TAT CCT TCC AAA TTG TGG
 ATG CCT CCA AGC ATT TTC CCT GAT TGG
 GTC CAG

RIP dd for
^{*PacI* *Kozak* *Start*}
 GGT TAA TTA ACC ACC ATG GGA AAG
 CAC TGG AAA AAC TG

RIP dd rev
^{*KpnI* *Stop* *Strep-tag*}
 CCG GTA CCC TAT CCT CCA AAT TGT
 GGA TGC CTC CAA GCG TTC TGG CTG
 ACG TAA ATC AAG

RIPdel 132-322 low
^{*SphI*}
 GGG GGG CAT GCC CAT GTA AGT AGC
 ACA TTC CTT C

RIPdel 132-322 up
^{*SphI*}
 GGG GGG CAT GCT TGA TTG TGT GGC
 AGT ACC TTC

RIPdel ID low
 ^{$\frac{1}{2}$ *EcoRV*}
 GGG GGG ATC CTC TTC TAC ACT TTC
 TAA TTG ACT

RIPdel ID up
 ^{$\frac{1}{2}$ *EcoRV*}
 GGG GGG ATC AGG GAA AAT CTG GGA
 AAG CAC TGG

D138N for
 GGC CTG ATA CAC AAG AAC CTG AAG
 CCT G

D138N rev
 CAG GCT TCA GGT TCT TGT GTA TCA
 CGC C

D324N for
 CAG TCT CTT CAA CTT AAT TGT GTG GCA
 GTA CC

D324N rev
 GGT ACT GCC ACA CAA TTA AGT TGA AGA
 GAC TG

K45R for GGA CTC ATG ATC ATG AGA ACA GTG
TAC AAG GGG
K45R rev CCC CTT GTA CAC TGT TCT CAT GAT CAT
GAG TCC

Sequenzierungsprimer

pPM7 F TAC GGT GGG AGG TCT AT
pPM7R AAC AAT CAA GGG TCC CC
RIP int TTC CAA AGC CAT GTG AGC
QEF CGG ATA ACA ATT TCA CAC CAG
QER GTT CTG AGG TCA TTA CTG G
AXX-Luc-for AGA GAG ATC CTC ATA AAG GC
LucNrev TAT GTT TTT GGC GTC TTC AT

TaqMan-Primer

RIP for AAT GGC GGC ACC CTC TAC TA
RIP rev ATA TCG CCC AGA GTA CTA CAG CAA
IL-8 for GCA TCT TCA CTG ATT CTT GGA TAC C
IL-8 rev GTC TGG ACC CCA AGG AAA ACT
IFN β for GAC ATC CCT GAG GAG ATT AAG CA
IFN β rev GGA GCA TCT CAT AGA TGG TCA ATG

TaqMan-Sonden (Applied Biosystems, Darmstadt)

RIP FAM-CGC CCG AGC ACC TGA ATG ACG-
TAMRA
IL-8 FAM-TCT TCA AAA ACT TCT CCA CAA CCC
TCG CA-TAMRA
IFN β FAM-CGT CCT CCT TCT GGA ACT GCT
GCA G-TAMRA

III Methoden

1. Molekularbiologische Methoden

1.1 Klonierung und Isolierung von Nukleinsäuren

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, wie sie zur Herstellung rekombinanter DNA eingesetzt werden, wie Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, Behandlung von DNA-Fragmenten mit Klenow-Polymerase oder T4-DNA-Polymerase, Ligierung freier DNA-Enden, Herstellung denaturierender Polyacrylamid-Gele etc. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook *et al.*, 1989).

Die folgenden Standardmethoden wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt:

- Plasmidpräparation (Mini-DNA) mit dem Nucleospin Plasmid Kit (Machery & Nagel, Düren).
- Grosse Plasmidpräparation (Maxi-DNA) mit dem QIAgen Plasmid Maxi Kit und für endotoxinfreie Maxi-DNA mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden).
- Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit Hilfe des QIAquick Gel-Extraction Kits (Qiagen, Hilden).
- Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen mit dem RNeasy Mini Extraction Kit (Qiagen, Hilden).
- Reinigung von PCR-Fragmenten mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden).

1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR, “Polymerase Chain Reaction”)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die sich zwischen zwei komplementär hybridisierenden Oligonukleotiden befinden (Mullis *et al.*, 1986). Die PCR wurde für den qualitativen Nachweis eines DNA-Abschnittes, zur Produktion von Fragmenten für Subklonierungen oder zur gerichteten Mutagenese verwendet. Für die Amplifikation wurde der gewünschte DNA-Abschnitt in folgendem Reaktionsansatz in einem Thermocycler (Eppendorf) vervielfältigt.

Der Reaktionsansatz (50µl) enthielt je 5µl 10x DNA-Polymerase- bzw. Herculase-Puffer, 0,4mM dNTP-Mix, 10-50pmol Oligonukleotide, 50-200ng DNA-Matrize und 2,5-5U *Pfu*-Turbo-DNA-Polymerase oder Herculase® (beide Stratagene). Die DNA-Matrize wurde für 5min bei 95°C vollständig denaturiert. Danach folgte der Reaktionszyklus, der 20-30mal wiederholt wurde:

Im ersten Schritt des Reaktionszyklus wurde die DNA 1min bei 94°C denaturiert, im zweiten folgte die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer für 30s. Als Temperatur für die Anlagerung der Oligonukleotide wurden Temperaturen gewählt, die 5°C unter den jeweiligen spezifischen Schmelztemperaturen lagen. Diese wurden nach der folgenden Formel berechnet: T_M (°C) = $81,5 + 0,41x$ (%GC-Gehalt) - $600/N + 16,6x\log M$, wobei N für die Anzahl

der bindenden Nukleotide steht und $\log M$ der dekadische Logarithmus der Molarität der Na^+ - und K^+ -Konzentrationen ist (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Dauer des folgenden Amplifikationsschrittes bei 72°C richtete sich nach der Länge des erwarteten Fragments und wurde mit 1min/kB kalkuliert.

Nach der PCR wurden die Amplifikate mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification Kits oder des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) laut Herstellerangaben gereinigt. Durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs) und anschließende Auftrennung im 1%igen Agarosegel wurden die Amplifikate analysiert. Die Ligation des PCR-Amplifikats mit dem Expressionsvektor erfolgte nach Sambrook *et al.*, 1989. Die ligierte DNA wurde mit Hilfe der Temperaturschock-Methode transformiert (Chung *et al.*, 1989).

1.2.1 Ortsgerichtete *in vitro*-Mutagenese von Plasmiden

Für das Einbringen von Punktmutationen in Plasmide wurde der Quick Change site directed mutagenesis Kit (Stratagene) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die dazu notwendigen Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass sie die gewünschten Mutationen in der Mitte trugen und zum Gegenstrang komplementär waren. Sie wurden von der *Pfu*-Turbo-Polymerase in einem Thermocycler (Eppendorf) verlängert. Die in *E.coli* methylierte ursprüngliche DNA-Matrize wurde durch Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* entfernt. Die Plasmid-DNA mit der gewünschten Mutation wurde in superkompetente XL1-Blue-Bakterien (Stratagene) transformiert.

1.3 Homologe Rekombination in adenovirale Vektoren

Die homologe Rekombination in adenovirale Vektoren wurde nach einem modifizierten Protokoll von Chartier (Chartier *et al.*, 1996) durchgeführt.

1.3.1 Präparation des adenoviralen Vektors und der Insertionsfragmente

Der Adenovirusvektor pAdtetKK wurde wie folgt aufgereinigt, um zu gewährleisten, dass er linearisiert und dephosphoryliert vorlag. Die Spaltung von $20\mu\text{g}$ pAdtetKK erfolgte mit 80U *PacI* (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von $100\mu\text{l}$ für 4h bei 37°C . Anschließend wurde der Ansatz mit 2U alkalischer Phosphatase (Roche) für 15min bei 37°C dephosphoryliert. Die alkalische Phosphatase wurde für 15min bei 56°C inaktiviert und Inkubation und Deaktivierung wurden nachfolgend mit 1U alkalischer Phosphatase wiederholt. Nach Auftrennung in einem 0,5%igen Agarosegel wurde der Ansatz laut Anleitung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) aufgereinigt. Danach wurde erneut eine Restriktionsspaltung mit *PacI* mit darauffolgender Dephosphorylierung durchgeführt. Der so präparierte adenovirale Vektor wurde zur homologen Rekombination eingesetzt (Cotten *et al.*, 2003).

$10\mu\text{g}$ der in den pPM7-Vektor inserierten Genfragmente (siehe II, 12) wurden mit 120U *BamHI* und 30U *PvuI* oder mit 60U *PacI* und 60U *KpnI* in einem Gesamtvolumen von $100\mu\text{l}$ für 4h bei 37°C gespalten. Nach Abtrennung des Vektoranteils in einem 15%igen Agarosegel wurden die Fragmente mittels des

QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) eluiert. Die Restriktionsspaltung und Aufreinigung wurden ein zweites Mal wiederholt, um die Fragmente vollständig von eventuellen Vektor-Verunreinigungen zu trennen.

1.3.2 Homologe Rekombination in *E.coli* BJ5183

Ca. 100ng des linearisierten, dephosphorylierten und aufgereinigten pAdtetKK-Vektor wurden mit jeweils ca. 200ng eines linearisierten und aufgereinigten Fragments (III, 1.3.1) vereinigt und mittels der Temperaturschock-Methode in *E.coli* BJ5183 transformiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin selektioniert. Der adenovirale Vektor wurde durch die Rekombination mit den entsprechenden Genen rezirkularisiert und konnte so in *E.coli* BJ5183 repliziert werden (Chartier *et al.*, 1996). Nach anschließender Isolierung der DNA (Mini-DNA mit dem Nucleospin Plasmid Kit, Machery & Nagel) wurde durch Restriktionsverdau analysiert, ob die entsprechenden rekombinanten Gene in der erwarteten Größe vorlagen. Die DNA positiver Klone wurde in *E.coli* DH5 α transformiert (Michou *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2001; Cotten *et al.*, 2003).

1.3.3 Rekonstitution rekombinanter Adenoviren

Die Rekonstitution der rekombinanten Adenoviren erfolgte durch Transfektion der rekombinanten, adenoviralen Genome mittels PEI (Polythylenimin). Vor der Transfektion wurden 20 μ g jedes rekombinanten, adenoviralen Genoms mit 80U *SpeI* für 4h bei 37°C verdaut, im 1%igen Agarosegel aufgetrennt und über den QIAquick Gel Extraktions Kit (Qiagen) aufgereinigt. Durch die DNA-Linearisierung wurde der prokaryote Replikationsursprung (pBR327ori) entfernt. Außerdem kann nur lineare adenovirale DNA repliziert werden (Michou *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2001; Cotten *et al.*, 2003). Die HEK293tet-Zellen wurden mit der linearen, adenoviralen DNA mittels der PEI-Transfektionsmethode transfiziert (siehe III, 2.4).

1.4 Präparation von Virus-DNA

Um zu überprüfen, ob die Adenoviren die entsprechenden RIP-Mutanten exprimierten, wurde virale DNA nach einem modifizierten Protokoll von Hirt (Hirt, 1967; Borst *et al.*, 1999) isoliert und anschließend in einer PCR (III, 1.2) analysiert. Als Ausgangsmaterial wurden mit rekombinanten Adenoviren (III, 2.5) infizierte HEK293-Zellen benutzt. Das Zellpellet einer 175cm²-Zellkulturflasche wurde in 3ml TES-Puffer (II, 8.3) und 0,3M NaCl ü.N. bei 4°C lysiert. Nach Zentrifugation für 30min bei 10'000xg und 4°C wurde die virale DNA aus dem Überstand mit Phenol/Chloroform-Behandlung von Proteinen befreit und mit 2 Volumen 100% Ethanol und 1/10 Volumen 3M NaAc (pH5,0) ü.N. bei 4°C gefällt. Nach zwei Waschschrritten mit 70%igem Ethanol wurde die Virus-DNA in 50 μ l RNase-behandeltes dH₂O aufgenommen, durch PCR analysiert und sequenziert.

1.5 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird RNA mittels Oligo-(dT)- oder Hexamer-Oligonukleotiden und der Reversen Transkriptase (RT) in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wird als Matrize für PCR-basierte Experimente genutzt (z.B. TaqMan-PCR).

Für die Umschreibung von Total-RNA aus eukaryonten Zellen in cDNA wurde der SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben verwendet. Für die Anlagerung der Oligonukleotidprimer wurden in einem Reaktionsansatz (20 μ l) 5 μ g Gesamt-RNA mit 0,5 μ g Oligo-(dT)-Primer für 5min bei 65°C erhitzt. Anschließend wurden 4 μ l 5x Einzelstrangpuffer (Invitrogen), 500 μ M dNTP-Mix und 0,5 μ l RNase-Inhibitor (40U/ μ l) zugegeben und für 2min bei 42°C inkubiert. Für die Einzelstrangsynthese wurde der Ansatz mit 1 μ l SuperScript II Reverse Transkriptase (200U/ μ l) (Invitrogen) für 50min bei 42°C inkubiert und die Reverse Transkriptase anschließend 15min bei 70°C inaktiviert. Um die RNA vollständig von der cDNA zu entfernen, wurde mit 1 μ l ein RNaseH-Verdau (1U/ μ l) für 20min bei 37°C durchgeführt. Die cDNA wurde in der TaqMan-PCR verwendet.

1.6 TaqMan-PCR („Real-Time-PCR“)

Die TaqMan-PCR ist ein automatisierter PCR-Test, bei dem die Amplifikation des PCR-Produktes quantitativ verfolgt werden kann. Bei dieser sogenannten „Real-Time“-PCR wurde bei den zu quantifizierenden Proben das Amplifikat nach jedem Zyklus über ein Fluoreszenzsignal-übermittelndes System detektiert (Higuchi *et al.*, 1992 und 1993).

Bei der Detektion durch eine fluoreszenzmarkierte, genspezifische Sonde wurde die 5'-3'- Exonuklease-Tätigkeit der *Taq*-DNA-Polymerase genutzt. Im ersten Schritt der PCR hybridisierten die spezifischen Oligonukleotide und die fluoreszenzmarkierte Sonde an den Matrizenstrang. Die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs am 5'-Ende der Sonde wurde durch die räumliche Nähe eines Quencher-Farbstoffs am 3'-Ende unterdrückt. Bei der Extension verdrängte die *Taq*-DNA-Polymerase die Sonde, die hydrolysiert wurde. Dabei wurde der Reporter-Farbstoff abgetrennt und konnte so ein Fluoreszenzsignal erzeugen (siehe Abb. 9). Die TaqMan-PCR wurde mit dem Reporter-Farbstoff SYBR Green in einem ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. In einem Reaktionsansatz (20 μ l) wurden je 0,3 μ Mol (EK) genspezifische Oligonucleotide, 0,1 μ Mol (EK) genspezifische TaqMan-Sonde und 10 μ l 2x PCR-Mastermix eingesetzt (Applied Biosystems).

Die TaqMan-PCR begann mit zwei Temperaturschritten von 50°C für 2min und 95°C für 10min. Danach folgten 40 Zyklen mit 95°C für 15s und 60°C für 1min. Von jeder cDNA-Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und als Ergebnis der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

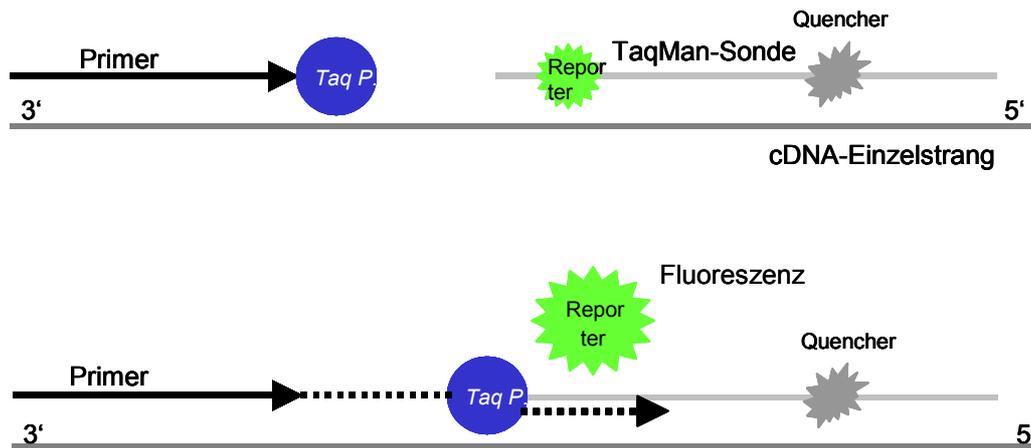


Abb. 9: Schematische Darstellung des Prinzips der TaqMan-PCR

1.7 „cDNA-Array“

Ein „cDNA-Array“ erlaubt, mit wenig Material die Regulation sehr vieler Gene unter verschiedenen Bedingungen zu vergleichen.

Für den „cDNA-Array“ wurden je 25ng cDNA in Duplikaten auf eine Hybond N⁺-Membran gespottet und immobilisiert (hergestellt von D. Schubert und S. Müller, Axxima Pharmaceuticals AG).

Als Probe wurde Gesamt-RNA mit dem RNeasy Kit (Qiagen) aus Zellen isoliert. Anschließend wurden 5µg mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe III, 1.5) und in Anwesenheit von α -³³P- dATP radioaktiv markiert. Nicht eingebautes radioaktives dATP wurde mit Hilfe von Microspin G-50-Säulchen (GE Healthcare) entfernt.

Die Probe wurde im Liquid Szintillation Counter (Perkin Elmer) gemessen, um den Einbau zu prüfen. Die Aktivität sollte mindestens 1×10^6 cpm pro µg DNA betragen. Die cDNA-Filter wurden in 2xSSC 5min bei RT inkubiert und 3h bei 65°C im Hybridisierungssofen (VWR International) mit cDNA-Hybridisierungspuffer (II, 8.5) prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurden 30µl radioaktiv markierte Probe mit 100µg/ml denaturierter Herings-Sperma-DNA für 5min bei 100°C denaturiert, zu den prähybridisierten cDNA-Filtern gegeben und für 20h bei 65°C im Hybridisierungssofen (VWR International) hybridisiert.

Die cDNA-Filter wurden zweimal in 2xSSC bei RT, zweimal in 2xSSC/0,5% SDS bei 65°C und zweimal in 0,5xSSC/0,5%SDS bei 65°C gewaschen. Danach wurden sie für 3d auf einer Phosphorimager-Platte exponiert und mit der Array Vision-Software (Imaging Research) ausgewertet.

1.8 Northern Blot

Die Northern Blot Analyse diente dazu, eine bestimmte Menge mRNA eines Genes in einer Zellkultur zu bestimmen.

Dazu wurde Gesamt-RNA aus $5,4 \times 10^5$ Zellen, die mit einem Guanidin-Isothiocyanat-Puffer lysiert wurden, mittels des RNeasy-Mini Kits (Qiagen) isoliert. Jeweils 5µg Gesamt-RNA wurde in einem RNA-Agarosegel aufgetrennt (siehe II, 8.5) und mittels Diffusions-Transfer ü.N. auf eine

Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell) transferiert (Sambrook *et al.*, 1989). Nach dem Transfer wurde die RNA auf der Membran durch „UV-crosslinking“ (UV Crosslinker, Hoefer) immobilisiert und die Position der 28S und 18S rRNA auf der Membran mit Hilfe eines 3UV™ Transilluminators (UVP) gekennzeichnet. Die Hybridisierung erfolgte entweder nach dem Oligonukleotid-Hybridisierungsprotokoll (siehe III, 1.8.1) oder nach dem cDNA-Hybridisierungsprotokoll (siehe III, 1.8.2).

1.8.1 Hybridisierung von Oligonukleotidproben

Zur radioaktiven Markierung der Oligonukleotidproben wurde der Terminale Transferase Kit (Roche) gemäß Herstellerangaben verwendet. 10ng des Oligonukleotid (20mer) wurden mit 50µCi α -³²P-dATP (mit einer spezifischen Aktivität von 3000mCi/mmol) 1h bei 37°C inkubiert. Nicht eingebautes radioaktives dATP wurde mit Hilfe von Microspin G50-Säulchen (GE Healthcare) abgetrennt. Zur Kontrolle der Markierung wurde 1µl der Probe im Liquid Szintillation Counter gemessen und die counts pro µg DNA berechnet. Für die Hybridisierung wurden Proben mit $>10^6$ cpm/µg DNA eingesetzt. Die Nitrocellulose-Membran wurde 4h bei 65°C unter Zugabe von 100µg/ml denaturierter Heringssperma-DNA zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für DNA auf der Membran und 100µg/ml poly(A) (EK) in Oligo-Hybridisierungs-Puffer (siehe II, 8.5) prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 65°C mit markierter Oligonukleotid-Probe. Nach zwei Waschschritten bei 60°C in Oligo-WaschpufferI und Oligo-WaschpufferII (II, 8.5) erfolgte der Nachweis gebundener Oligonukleotid-Probe durch Autoradiographie auf BioMax MS-Filmen (Eastman Kodak).

1.8.2 Hybridisierung von cDNA-Proben

Die radioaktive Markierung von cDNA-Proben wurde mit Hilfe des Random Primers DNA Labeling Systems (Invitrogen) laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden 25ng linearisierte cDNA mit 50µCi α -³²P-dATP 1h bei 25°C markiert. Nach dem Abstoppen der Markierungsreaktion mit Stop-Puffer (Invitrogen) wurde nicht eingebautes radioaktives dATP mit Microspin G-50-Säulchen abgetrennt und 1µl der Probe zur Kontrolle im Liquid Szintillation Counter gemessen. Für die Hybridisierung wurden Proben mit $>10^6$ cpm/µg DNA eingesetzt. Die markierte cDNA-Probe wurde zusammen mit 100µg/ml denaturierter Heringssperma-DNA (EK) 5min bei 100°C denaturiert und zur 4h bei 42°C in Northern „high“ Solution (siehe II, 8.5) prähybridisierten Membran gegeben und ü.N. im Hybridisierungssofen hybridisiert. Der Nachweis gebundener cDNA-Probe erfolgte über Autoradiographie (siehe III, 1.8.1).

1.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot-Analyse

1.9.1 SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970) wurden 8, 10, 12,5 oder 15%ige Polyacrylamidgele benutzt (siehe II, 8.4). Die in 3x Laemmli-Probenpuffer (siehe II, 8.4) aufgenommenen und für 7min bei 100°C aufgekochten Proteine wurden elektrophoretisch im Mini Protean Gel-System (BioRad) (in 1x Laemmli-Puffer, siehe II, 8.4) bei 20mA pro Gel aufgetrennt.

1.9.2 Western Blot-Analyse

Der Transfer von in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteinen (siehe III, 1.9.1) auf PVDF-Membran (Immobilon™-P Transfer Membran, Milipore Corporation) erfolgte nach dem „Halbtrockenblot“-Verfahren in einer TransBlot SD Semidry cell- Elektrobloiting-Apparatur (BioRad). Dabei wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Membran zwischen zwei Graphitplatten für 1h bei 0,8mA pro cm² Gel transferiert.

Für den Western Blot wurden Polyacrylamidgel, PVDF-Membran und Whatman-Filterpapier zwischen die Elektroden des Geräts wie folgt geschichtet:

Kathode (-)

3 Lagen **Whatman-Filterpapiere**, getränkt in Transblot SD (siehe II, 8.4)
SDS-Polyacrylamidgel
PVDF-Membran, in Methanol getränkt und in Transblot SD äquilibriert
2 Lagen **Whatman-Filterpapiere**, getränkt in Transblot SD

Anode (+)

Für die immunologische Detektion wurde die PVDF-Membran ü.N. bei 4°C in 1x NET-Gelatine (siehe II, 8.4) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der Primärantikörper (siehe II, 6.) wurde in 1x NET-Gelatine für 1h bei RT zugegeben. Nach dreimaligem Waschen (je 15min) mit 1x NET-Gelatine wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (siehe II, 6.) inkubiert. Bei der Detektion der Proteine über Chemilumineszenz mit dem ECL™-Western Blotting Reagent (GE Healthcare) wurden Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper (II, 2.6) eingesetzt. Die Chemilumineszenzreaktion wurde laut Herstellerangaben (GE Healthcare) durchgeführt und die Membran anschliessend auf Hyperfilm ECL-Röntgenfilmen (GE Healthcare) exponiert. Die PVDF-Membran konnte mit verschiedenen Antikörpern hintereinander inkubiert werden, wenn sie zwischendurch mit „Strip“-Puffer (siehe II, 8.4) 1h bei 50°C von Antikörpern und Detektionslösungen befreit worden war.

2. Zellbiologische Methoden

2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Die Kultivierung von humanen und murinen Zellen erfolgte im Inkubator bei 37°C und 7% CO₂-Gehalt in einer H₂O-gesättigten Atmosphäre.

Primäre humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden von einer Stammcharge ausgehend regelmäßig frisch angelegt und zwischen den Passagen 5 und 20 für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche verwendet. HFF-, HEK293-, HEK293T-, HeLa-, A549-, NIH 3T3- und MEF RIP^{-/-}-Zellen (siehe II, 9.) wurden in DMEM (Invitrogen) mit 10% FCS (Invitrogen) kultiviert. HEK293-tet (Klon9)-Zellen wurden in DMEM mit 10% NKS (Biochrom Seromed) und NIH3T3-NFκB-Luc-Zellen in DMEM mit 10% FCS plus das Selektionsantibiotikum Geneticin (G418, 500mg/ml in PBS) kultiviert. Bei Erreichen von 75% Konfluenz des Zellrasens wurden die adhärenenten Zellen mit 1ml Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in 5ml frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkultur-Flaschen, -Schalen oder -Platten mit Vertiefungen (Greiner) ausgesät. Jurkat-Zellen sind Suspensionszellen und wurden abzentrifugiert und in 10ml frischem RPMI-Medium (Invitrogen) mit 10% FCS aufgenommen und auf neue Zellkultur-Platten aufgeteilt. In regelmäßigen Abständen wurden Mycoplasmen-Testungen mit dem VenorGem[®] Mycoplasma Detection PCR Kit (Minerva Biolabs) durchgeführt.

2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nach dem Ablösen einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche mit 1ml Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) wurde das Trypsin durch Zugabe von 3ml FCS (Invitrogen) inaktiviert. Die Zellen wurden für 3min bei 500xg und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (90% FCS und 10% DMSO) aufgenommen und auf 1ml Aliquots aufgeteilt (je nach Zelltyp 1x10⁶-1x10⁸ Zellen). Die Zellen wurden ü.N. bei -80°C gelagert und danach zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) transferiert.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen in einem 37°C-Wasserbad kurz inkubiert. In einem sterilen Greiner-Röhrchen wurden die Zellen mit 3ml des entsprechenden Mediums versetzt, um toxische Effekte des DMSO zu vermeiden. Nach dem Zentrifugieren der Zellen (3min bei 500xg und RT) wurden sie in 2ml frischem Medium resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche (Greiner) mit 5ml vorgewärmtem Medium gegeben.

2.3 Transiente Transfektion von Zellen

Für die Transfektion von humanen oder murinen Zellen wurden verschiedene Transfektionsreagentien (siehe II, 2) benutzt, die alle auf dem Prinzip der Lipofektion beruhen. Es sind Gemische aus kationischen Lipiden, die nach Komplexierung mit DNA deren Aufnahme in die Zellen vermitteln.

Die transiente Transfektion von Zellen verlief mit den jeweiligen Transfektionsreagentien für die Lipofektion gemäß den Herstellerangaben (Invitrogen, Qiagen, Roche) folgendermaßen:

Die Zellkulturen (siehe II, 9) wurden in Zellkultur-Platten mit 6 Vertiefungen, 6cm-Schalen, 10cm-Schalen oder auf Glasplättchen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 50% konfluent waren. Für die Transfektion wurden Lösung A, bestehend aus Opti-MEM I (Invitrogen) und dem Transfektionsreagenz, und Lösung B, bestehend aus Opti-MEM und Plasmid-DNA, angesetzt. Da die Überexpression von RIP1 Apoptose auslöst (Stanger *et al.*, 1995), wurden alle RIP1-Plasmide mit dem Caspase-Inhibitor CrmA (II, 12) kotransfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 5-45min, je nach Transfektionsreagenz, wurden Lösungen A und B gemischt und für 10-30min inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Opti-MEM gewaschen, bevor sie mit dem Transfektionsansatz für 3-5h bei 37°C inkubiert wurden. Danach wurde das Transfektionsmedium durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die transfizierten Zellen wurden nach 48h geerntet.

HFF-Zellen wurden mit FuGene6 (Roche) in 10cm-Schalen transfiziert.

U373-Zellen wurden mit Lipofektin® (Invitrogen) in 6-Well-Platten transfiziert.

HEK283- und NIH 3T3-Zellen wurden mit Superfect® (Qiagen) in 6-Well-Platten transfiziert.

HeLa- und A549-Zellen wurden mit Lipofectamine™ oder Lipofectamine®2000 (Invitrogen) transfiziert.

2.4 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Für die Rekonstitution von rekombinanten Adenoviren wurden HEK293-tet (Klon 9)-Kulturen einen Tag vor der Transfektion in Zellkultur-Platten mit 6 Vertiefungen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 50% konfluent waren. Eine Stunde vor Transfektion wurde das Medium durch 1ml frisches DMEM ohne NKS pro Vertiefung ersetzt. Für die Transfektion wurden Lösung A bestehend aus 6µg rekombinanter, adenoviraler DNA in 250 µl HBS (siehe II, 8.1) und Lösung B bestehend aus 5µl PEI MW 2000 in 250µl HBS gelöst (siehe II, 2), gemischt und 20min bei RT inkubiert. Danach wurde Lösung C, bestehend aus 9µl PEI MW 25000 in 250µl HBS gelöst (siehe II, 2), dazupipettiert und 20min bei RT inkubiert. Der komplette Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf den Zellen verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 4h bei 37°C wurde das Transfektionsgemisch entfernt und durch 7ml frisches DMEM mit 10%NKS pro Vertiefung ersetzt (Cotten *et al.*, 2003).

2.5 Virusanzucht von rekombinanten Adenoviren

Vierzehn Tage nach Transfektion (siehe III, 2.4) wurde die Zellen mit einem Zellschaber (Costar) abgelöst, in ein Falcon-Röhrchen (Greiner) überführt und für 5min bei 1000xg abzentrifugiert. Der Ansatz wurde 5mal in flüssigem Stickstoff gefroren und bei 37°C wieder aufgetaut, um die Zellen vollständig zu lysieren. Mit der Hälfte des im Überstand vorhandenen rekombinanten Adenovirus wurde eine T175-Zellkulturflasche mit HEK293-tet (Klon 9)-Zellen infiziert, die andere Hälfte des Überstandes wurde bei -80°C eingefroren. Die HEK293-tet (Klon 9)-Zellen wurden für 90min bei 37°C mit dem Virus inkubiert, danach wurde das Virusinokulum abgenommen und durch 30ml frisches DMEM mit 10% NKS ersetzt. Nach 2-3 Tagen waren die Zellen durch Adenoviren lysiert und der Überstand wurde in 50ml-Zentrifugenröhrchen für

10min bei 2500xg und 4°C abzentrifugiert und in Aliquots bei -80°C gelagert (Tan *et al.*, 2001; Cotten *et al.*, 2003).

2.5.1 Anreicherung durch Ultrazentrifugation

Die Virusaliquots (III, 2.5) wurden auf ein 36%iges Saccharosekissen geschichtet und bei 28000xg für 1h bei 4°C unter Vakuumbedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5ml PBS aufgenommen und erneut bei 28000xg für 1h bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml TNCA-Puffer (siehe II, 8.3) aufgenommen und in 100µl-Aliquots bei -80°C eingefroren (Cotten *et al.*, 2003).

2.6 Herstellung von HCMV-Virus-Stammsuspensionen

Für die Herstellung einer HCMV-Virus-Stammsuspension wurden zu 90% konfluente HFF-Zellen in T300-Zellkulturflaschen (Greiner) mit dem Laborstamm AD169wt oder mit AD169 GFP (siehe II, 10) mit einer MOI (*Multiplicity of infection*) von 0,01 für 2h bei 37°C infiziert. Anschließend wurde das Virusinokulum durch frisches DMEM mit 10% FCS ersetzt. Zeigten nach ca. 10-14 Tagen 100% der Zellen lichtmikroskopisch einen cytopathischen Effekt (100% CPE), wurden die Zellen mit Gummischabern (Costar) abgelöst und gemeinsam mit dem Überstand für 1h bei 10000xg bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal in flüssigem Stickstoff gefroren und bei 37°C wieder aufgetaut, um die Zellen vollständig zu lysieren. Anschließend wurden die Zelltrümmer vom Virus durch Zentrifugation für 10min bei 1500xg bei RT getrennt, das Virus aliquotiert und bei -80°C eingefroren (Stinski, 1976 und 1978; Greaves *et al.*, 1995; Baldick and Shenk, 1996).

Wurde serumfreies Virus für die Experimente benötigt, so wurde das Virus-pellet in PBS aufgenommen, auf ein 36%iges Saccharosekissen geschichtet und für 1h bei 24000xg und 4°C zentrifugiert (Stinski, 1976 und 1978). Das Virus-Pellet wurde in DMEM ohne FCS resuspendiert und die aliquotierten Viren wurden bei -80°C gelagert.

2.6.1 Plaque-Test

Zur Titerbestimmung der HCMV-Virus-Stammsuspensionen wurden Plaque-Tests durchgeführt (modifiziert nach Marschall *et al.*, 2000). Dazu wurden HFF-Zellen, die auf Zellkultur-Platten mit 6 Vertiefungen zu einem 90% konfluenten Zellrasen gewachsen waren, mit 1ml pro Vertiefung der Verdünnungen (10^{-1} - 10^{-9}) der Virus-Stammsuspensionen für 2h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Virusinokulum abgenommen, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, und jeweils 2ml DMEM mit 10% FCS und 0,1% humanem Immunglobulin (Beriglobin) wurden auf die Zellen gegeben. Nach 7 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Methanol fixiert und anschließend mit einer 20fach verdünnten Giemsa-Lösung (Sigma-Aldrich) für 15min bei RT gefärbt. Die durch das Virus verursachten Plaques wurden mikroskopisch ausgezählt, der Mittelwert aus den Triplikaten der jeweiligen Virusverdünnung

ermittelt und zur Berechnung mit der jeweiligen Verdünnung multipliziert. Der Titer der HCMV-Viren wurde als PFU/ml (*Plaque Forming Unit*) angegeben.

2.7 HCMV-Infektions-Test

HFF-Zellen wurden auf 10cm-Schalen ausgesät, so dass sie am nächsten Tag zu 90% konfluent waren. Die Kulturen wurden mit dem Laborstamm HCMV-AD169wt oder mit HCMV-AD169 GFP mit einer MOI von 0,02 für 2h bei 37°C infiziert. Das Virusinokulum wurde abgenommen und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 10ml frisches DMEM mit 10% FCS zugegeben. Für die Analyse der zellulären Gene auf Transkriptionsebene wurde eine Northern Blot-Analyse (siehe III, 1.8) durchgeführt. Für die Protein-Analyse wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 300µl RIP-Lyse-Puffer (siehe II, 8.3) für 20min auf Eis lysiert. Die Zellen wurden mit Zellspateln abgeschabt und für 30min bei 10000xg und 4°C abzentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde in der Proteinbestimmung mit dem DC Protein Assay Reagent (BioRad), basierend auf der Methode von Bradford (Bradford *et al.*, 1976), eingesetzt. Dabei wurden BSA-Standards zur Quantifizierung mitgeführt und die Proteinmenge in den Proben bei einer Wellenlänge von 590nm gemessen. Der restliche Überstand wurde mit 3x Laemmli-Probenpuffer (siehe II, 8.4) versetzt, 7min bei 100°C aufgekocht, 3min sonifiziert, 1min bei 10000xg und RT abzentrifugiert und in einem Polyacrylamidgel (siehe III, 1.9.1) für eine Western Blot-Analyse (siehe III, 1.9.2) aufgetrennt.

2.8 Adenovirus-Transduktion mit HCMV-Überinfektion

HFF-Zellen, die zu 90%iger Konfluenz auf 10cm-Platten angewachsen waren, wurden mit rekombinanten Adenoviren, die entweder RIPwt (AdRIPwt, siehe II, 12), Kinase-inaktives RIP K45R (AdRIP K45R) oder den Kontrollvektor J5 (AdJ5) exprimierten, transduziert. Dabei wurden die Adenoviren in mehreren Verdünnungsstufen (111, 333, 1000 und 3000 Partikel pro Zelle) in 3ml DMEM mit 2% FCS pro Platte auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und für 4h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Transduktionsinokulum abgesaugt, die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und 10ml DMEM mit 10% FCS wurden pro Platte zugegeben. 24h nach Transduktion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 24h in 10ml DMEM ohne FCS „gehungert“. Anschließend wurden die HFF-Zellen mit HCMV-AD169wt (MOI 5) für verschiedene Zeiten stimuliert, sofort gewaschen und auf Eis lysiert (siehe III, 2.7). Die Überstände wurden mit 3x Laemmli-Puffer versetzt und in der Western Blot-Analyse (siehe III, 1.9.2) untersucht.

2.9 HCMV-GFP-Replikations-Test

HFF, die auf Zellkultur-Platten mit 24 Vertiefungen ausgesät wurden, so dass die Kulturen zu 90% konfluent waren, wurden mit rekombinanten Adenoviren (siehe III, 2.8) in verschiedenen Verdünnungen (111, 333, 1000 und 3000 Partikel pro Zelle) in einem Gesamtvolumen von 0,5ml pro Vertiefung

transduziert. Einen Tag nach Transduktion wurden die HFF-Zellen mit HCMV-AD169 GFP (MOI 0,02) in 0,5ml DMEM ohne FCS pro Vertiefung für 2h infiziert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 7d, das entspricht ca. 2 1/2 HCMV-Replikations-Zyklen (Mockarski and Courcelle, 2001), in DMEM mit 10% FCS bei 37°C inkubiert. Drei, fünf und sieben Tage nach Infektion wurde die HCMV-Infektion mit Hilfe der GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Zeiss) kontrolliert.

Sieben Tage nach HCMV-Infektion wurden die Zellen mit Lysis-Puffer für den HCMV-Replikations-Assay (II, 8.3) zunächst für 10min bei 37°C inkubiert und dann für 30min bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Lysate in Eppendorf-Tubes (Eppendorf) überführt und für 30min bei 10000xg und 4°C zentrifugiert. Je 100µl der Überstände wurde in Duplikaten in eine schwarze 96-Well-Platte (Greiner) überführt und die GFP-Fluoreszenz (als Maß für die HCMV-Replikation) bei Wellenlängen von 485nm/535nm im GT-Analyst (Molecular Devices) mit der Software Analyst Host gemessen (Marschall *et al.*, 2000).

2.10 Luziferase-Test

Um die Aktivierung verschiedener Promotoren zu untersuchen, wurden Luziferase-Tests mit transient transfizierten Luziferase-Reporterplasmiden durchgeführt. Die Zellen (u.a. HFF-Zellen) wurden in 6cm-Platten ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 50% konfluent waren und wurden transient z.B. mit dem Reporterplasmid pNFκB-Luc aus dem Mercury Pathway Profiling System (Clontech) oder mit dem Plasmid pUHC 13-3 IL-8pr-Luc (II, 12.) transfiziert (siehe III, 2.3). 24h nach Transfektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 24h in 3ml DMEM ohne Phenolrot und ohne FCS pro Platte „gehungert“. Anschließend wurden die Zellen mit 2ml HCMV-AD169wt (MOI 1) in DMEM ohne Phenolrot und ohne FCS für verschiedene Zeiten stimuliert oder als Kontrolle mit 20ng/ml TNFα für 10min stimuliert. Die Zellen wurden in 150µl RIP-Lyse-Puffer lysiert (III, 2.7) und nach Angleichung der Proteinmengen laut Herstellerprotokoll mit dem Steady Lite HTS Luminescence Reporter Gene Assay System (Perkin Elmer) inkubiert und im GT Analyst (Molecular Devices) mit der Software Analyst Host gemessen.

2.11 Indirekte Immunfluoreszenz

Um nachzuweisen, welche zelluläre Lokalisation RIPwt und RIP K45R nach Überexpression aufweisen, wurden indirekte Immunfluoreszenzen durchgeführt. Dazu wurden HFF- oder U373-Zellen in Zellkultur-Platten mit 24 Vertiefungen auf Glasplättchen (Durchmesser =10mm) so ausgesät, dass sie zu 90% konfluent waren, bevor sie mit verschiedenen Verdünnungen rekombinanter Adenoviren (siehe III, 2.9) transduziert wurden. 24h nach Transduktion wurden die Zellen pro Vertiefung mit 0,5ml HCMV-AD169GFP (MOI 1) in DMEM ohne FCS überinfiziert. 24h nach HCMV-Überinfektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5ml 4% Paraformaldehyd in PBS (Serva) pro Vertiefung für 30min fixiert. Die fixierten Zellen wurden nach dreimaligem Waschen in PBS mit 0,5ml 0,4% Triton-X100/PBS (Serva) permeabilisiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS

gewaschen und für 1h bei RT mit dem ersten Antikörper in 0,2% Triton X-100/PBS (II, 6) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Cy3- oder FITC-konjugierten Sekundärantikörper für 1h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium (Alexis) auf einem Objektträger eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Zeiss) betrachtet.

2.12 *In vivo*-Markierung transient transfizierter Zellen

Um die Interaktion zwischen dem Matrixprotein pp65 von HCMV und RIP *in vivo* zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen auf 10cm-Schalen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 50% konfluent waren. Die Zellen wurden mit HCMV-pp65, RIP und CrmA transient kotransfiziert (III, 2.3). 48h nach Transfektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in 10ml DMEM ohne Phosphat und ohne FCS (Sigma-Aldrich) pro Platte für 3h bei 37°C „gehungert“. Die Zellen wurden anschließend mit 300 μ Ci 32 P-Orthophosphat (GE Healthcare) pro Platte markiert und die Hälfte der Zellen wurde danach mit 20ng/ml TNF α für 30min stimuliert.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 300 μ l RIPA-Puffer (II, 8.3) für 15min auf Eis lysiert und 30min bei 10000xg und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde für eine Immunpräzipitation (siehe III, 3.2) mit dem HCMV-pp65-Antikörper (II, 6) eingesetzt.

2.13 Vitalitäts-Test (“Alamar Blue-Assay”)

Um zu testen, bei welchen Konzentrationen die verwendeten Inhibitoren und Zytokine die Vitalität der Zellen beeinträchtigen, wurden Alamar Blue-Tests durchgeführt (Ahmed *et al.*, 1993). Die Zellen wurden in Zellkultur-Platten mit 96 Vertiefungen (Greiner) ausgesät, so dass sie 90% konfluent waren und mit den Testsubstanzen (Inhibitoren, Zytokine) in den entsprechenden Konzentrationen für mindestens 5 Tage bei 37°C inkubiert. Die Alamar Blue-Lösung (Farbstoff Resazurin von Biozol) wurde im Verhältnis 1:10 zu den Zellen gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen für die Berechnung der Vitalität dienten unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die Zellkultur-Platten mit 96 Vertiefungen im Victor²V (Wallac) mit der Software Wallac1420 bei einer Wellenlänge von 540nm gemessen.

2.14 Apoptose-Test (“Caspase-Glo™ 3/7-Assay”)

Der „Caspase-Glo™ 3/7-Assay“ (Promega) wurde eingesetzt, um Apoptose in Zellkultur zu untersuchen. Der Kit wurde gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das Caspase-Glo 3/7-Reagenz enthält ein Substrat für die Caspasen-3 und -7 (Z-DEVD-Aminoluciferin), das bei Aktivierung einer oder beider Caspasen gespalten wird und dabei Aminoluciferin freisetzt. Dieses dient als Substrat für die thermostabile Ultra-Glow™-Luziferase, die die Luziferasereaktion katalysiert. Gemessen wurde dann ein Lumineszenzsignal, das proportional zu der Menge an aktivierten Caspasen ist.

2.15 ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbant Assay”)

Der ELISA wurde dazu verwendet, Zytokine quantitativ in Zellkulturüberständen nachzuweisen. Dazu wurden ausschließlich Quantikine®-ELISA (R&D Systems) gemäß Herstellerprotokollen verwendet. In einem sogenannten „Sandwich“-ELISA waren monoklonale Antikörper spezifisch für das zu charakterisierende Protein an den Boden von Zellkultur-Platten mit 96 Vertiefungen gebunden. 50-200µl der verdünnten Zellkulturüberstände und der Verdünnungen des jeweiligen Zytokins wurden in Duplikaten auf die Vertiefungen gegeben und 1-2h bei RT inkubiert. In diesem Schritt wurde das in den Proben vorhandene Zytokin vom immobilisierten Antikörper gebunden. Nach dreimaligem Waschen der Proben, zur Entfernung nicht gebundenen Zytokins, wurden jeweils 100µl Peroxidase-konjugierter polyklonaler Antikörper gegen das Zytokin auf die Vertiefungen gegeben und 1h bei RT inkubiert. Die Proben wurden dreimal gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden sie mit einer Chromogen-Substratlösung für 30min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 50µl Stop-Lösung pro Vertiefung wurde die Farbreaktion beendet. Die Extinktion der entstehenden Färbung war proportional zur Zytokin-Konzentration im Zellkulturüberstand. Die Proben wurden im Victor²V (Wallac) mit der Software Wallac 1420 gemessen und anhand der Zytokinkonzentration-Standard-Kurve ausgewertet.

2.16 Zytokin-Antikörper-Test

Der „TranSignal™ Human Cytokine Antibody Array“ (Biocat) ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis von 36 Zytokinen nach dem Prinzip des „Sandwich“-ELISAs. Je 2ml eines Zellkulturüberstands wurden unverdünnt auf eine Membran gegeben und 2h bei RT inkubiert. In dieser Zeit konnten alle in dem jeweiligen Überstand vorhandenen Zytokine an die spezifischen Bindungs-Antikörper auf der Membran binden. Nach fünfmaligem Waschen wurden die Membranen mit je 2ml Biotin-konjugierten Anti-Zytokin-Antikörper (sogenannte Detektions-Antikörper) für 2h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Membranen fünfmal gewaschen und mit einer Streptavidin-Peroxidase-Lösung für 30-60min bei RT inkubiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen wurde die Chemilumineszenz mit einem ECL-Reagenz (Biocat) auf Hyperfilm ECL-Röntgenfilmen (GE Healthcare) nachgewiesen (III, 1.9.2).

3. Biochemische Methoden

3.1 Proteinaufreinigung

Für die Aufreinigung von Proteinen aus *E.coli* wurden 100µl M15 [pREP4] oder SG13009 [pREP4] (Qiagen) mit je 1µl Expressionsplasmid transformiert (III, 1.2) und auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin und Kanamycin selektioniert (II, 8.2). Positive Klone wuchsen in einer 20ml-ÜNK bei 37°C und wurden am nächsten Tag in 2l LB-Medium 1:10 verdünnt. Die Bakterien wurden bis zur optimalen exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{600nm} von 0,4-0,6 bei 37°C geschüttelt. Dann wurden die Kulturen mit 0,1M IPTG (Roche) für 3h induziert. Die Bakterien wurden für 10min bei 4000xg und 4°C pelletiert und

dreimal in flüssigem Stickstoff gefroren und im 37°-Wasserbad aufgetaut. Die Bakterienpellets wurden in jeweils 10ml 0,5% NP-40 in HEPES, pH8,0 resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Es wurden je 100µl/mg Lysoszym zugefügt und die Proben in einem „Sonifier“ (Bochem) dreimal für 15s bei 100% Leistung auf Eis vollständig lysiert. Die Proben wurden für 5min bei 10000xg und 4°C zentrifugiert und Überstände sowie Pellets in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und in Coomassie-Lösung gefärbt (siehe III, 1.9.1).

3.1.1 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung mit dem Ni-NTA Superflow-Kit (Qiagen) erfolgte im „batch“-Verfahren, d.h. ohne Hinzunahme einer Säule. Je 1ml 50%iger Ni-NTA Superflow wurde einmal mit PBS gewaschen und mit 5ml Lyse-Puffer äquilibriert. 4ml des Überstandes der Proben aus der Proteinaufreinigung (III, 3.1) wurden auf die Ni-NTA Superflow gegeben und 1h bei 4°C gedreht. Anschließend wurden die Proben für 5min bei 3000xg und 4°C zentrifugiert und dreimal in 10mM Imidazol gewaschen. Die Proben wurden je 15min mit 5ml des jeweiligen Elutionspuffer (mit 100mM Imidazol, 250mM Imidazol und 500mM Imidazol) bei 4°C gedreht und nach jedem Elutionsschritt dreimal mit 10ml 10mM Imidazol gewaschen. Imidazol kompetiert mit den an Ni-NTA Superflow gebundenen His₆-tag-Fusionsproteinen um die Nickel-Bindungsstellen und das Fusionsprotein wird freigesetzt. Die Überstände der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (III, 1.9.1) und in einer Western Blot-Analyse untersucht (siehe III, 1.9.2).

3.1.2 Aufreinigung mittels Streptavidin-Sepharose

Die Aufreinigung von Proteinen mit einem Strep-tag erfolgte mittels Streptavidin-Sepharose (Strep Tactin Macrobeads von Pierce) ebenfalls im „batch“-Verfahren (III, 3.1.1). 400µl 50%ige Streptavidin-Sepharose wurden einmal mit PBS gewaschen und in LB#4-Lysepuffer (siehe II, 8.3) äquilibriert. Je 4ml des Überstandes (III, 3.1) wurden auf die Streptavidin-Sepharose gegeben und für 1h bei 4°C gedreht. Die Proben wurden für 5min bei 3000xg und 4°C abzentrifugiert und dreimal mit 10ml LB#4-Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurden die Proteine jeweils 15min mit 2,5mM Desthiobiotin (EK) in LB#4-Lysepuffer eluiert. Die Überstände der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe III, 1.9.1) und in der Western Blot-Analyse (siehe III, 1.9.2) untersucht.

3.2 Immunpräzipitation

Um die Interaktion von Proteinen zu untersuchen, wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden Zellen transient mit den zu untersuchenden HA-Fusionsproteinen transfiziert (siehe III, 2.3). 48h nach Transfektion wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS (Invitrogen) gewaschen und mit 300µl RIP-Lyse-Puffer (II, 8.3) für 20min auf Eis inkubiert.

Die Zellen wurden mit einem Gummispatel (Costar) geerntet und für 30min bei 10000xg und 4°C abzentrifugiert. 250µl des Überstandes wurden zusammen mit 60µl gewaschener Protein-G-Sepharose (GE Healthcare, 1:1 verdünnt mit RIP-Lyse-Puffer) und monoklonalem Anti-HA-Antikörper (150fach verdünnt, Babco) 3h bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden siebenmal mit RIP-Lyse-Puffer gewaschen, in 50µl 3x Laemmli-Probenpuffer (II, 8.4) aufgenommen, in einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (III, 1.9.1) und immunologisch in der Western Blot-Analyse (siehe III, 1.9.2) nachgewiesen.

3.3 *In vitro*-Kinase-Aktivitäts-Test

Der *in vitro*-Kinase-Test wurde verwendet, um die Wirkung von Inhibitoren auf Proteinkinasen zu testen.

Je 2µg (entspricht 4,95nM) aus *E.coli* aufgereinigtes RIPK-GST oder RIP K45R K-GST (hergestellt von K. Stegmüller, Axxima Pharmaceuticals AG) wurde mit 25µg MBP-Substrat und Inhibitoren (10µM) in 1xRIP-Kinase-Assay-Puffer (3.8.6) mit 1µCi γ -³²P-ATP pro Reaktionsansatz (20µl) für 1h bei 37°C inkubiert. Der Assay wurde mit 0,1M EDTA (EK) gestoppt. Die Proben wurden in 3x Laemmli-Puffer (II, 8.4) aufgenommen und in einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe III, 1.9.1) und in Coomassie-Lösung gefärbt. Nach dem Trocknen wurden die Gele auf BioMax MS-Röntgenfilmen (Eastman Kodak) für 1h bis ü.N. exponiert. Zur Kontrolle der Expression der einzelnen Proteine wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt (siehe III, 1.9.2).

IV Ergebnisse

1. Genetische Validierung von RIP1

1.1 Expression von RIP1 nach der HCMV-Infektion von HFF-Zellen

Die folgenden Experimente wurden in primären humanen Vorhautfibroblasten (HFF) durchgeführt. HFF-Zellen sind ein etabliertes Zellkultur-System, in dem HCMV sich vollständig replizieren kann (Mocarski and Courcelle, 2001; Marschall *et al.*, 2000). Verglichen mit nicht infizierten HFF-Zellen (0hpl), in denen keine nachweisbare RNA-Expression von RIP1 detektiert werden konnte, war die RIP1-mRNA 48h nach HCMV-Infektion (48hpl) gut nachweisbar (Abb. 10). Parallel dazu konnte in Western Blot-Analysen ebenfalls eine Hochregulation der RIP1-Expression beobachtet werden (Abb. nicht gezeigt). In Kontrollversuchen mit nicht infizierten HFF-Zellen konnte auch nach 72h keine Induktion der RNA- oder Protein-Expression von RIP1 beobachtet werden.

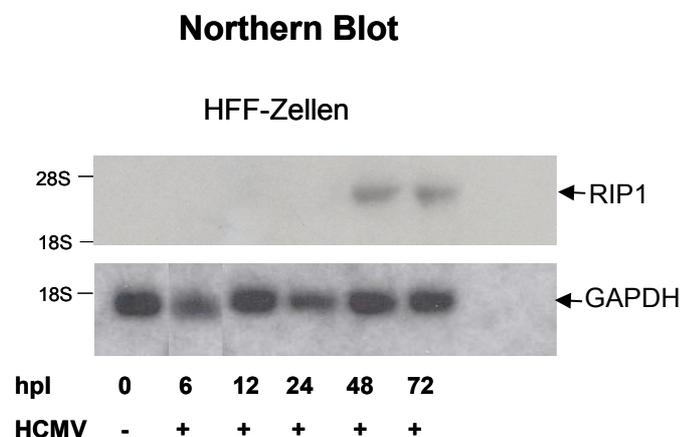


Abb. 10: Expression von RIP1 nach HCMV-Infektion in HFF-Zellen

HFF-Zellen wurden mit HCMV-AD169wt mit einer MOI von 0,02 infiziert und Gesamt-RNA wurde 6, 12, 24, 48 und 72h nach Infektion (hpl) extrahiert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte HFF-Zellen (0hpl). Für die Northern Blot-Analyse (III, 1.8) wurden je 5µg der Gesamt-RNA in einem 1,8%igen Formaldehyd-haltigen Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit einer ³²P-markierten RIP1-cDNA-Sonde hybridisiert (obere Autoradiographie). Zum Nachweis konstanter RNA-Mengen wurde die Membran anschließend mit einer ³²P-markierten GAPDH-Sonde hybridisiert (untere Autoradiographie).

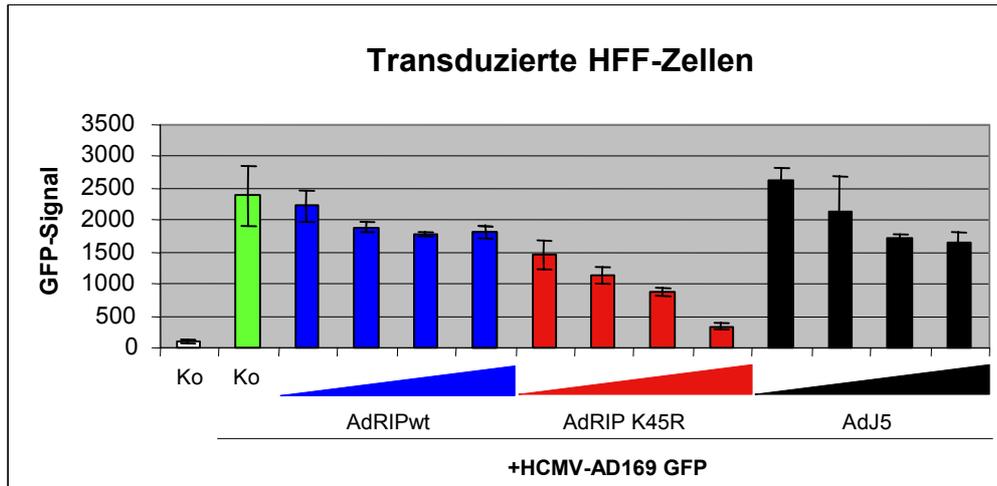
1.2 Effekt von RIP1 auf die HCMV-Replikation in HFF-Zellen

Die Expression der RIP1-Kinase wird durch die HCMV-Infektion induziert (IV, 1.1). Durch die HCMV-Infektion werden unter anderem auch zelluläre Signalwege aktiviert, für die die Beteiligung der Kinase-Aktivität von RIP1 kontrovers diskutiert wird (siehe I, 2.3.2). Aus diesem Grund wurde zuerst untersucht, ob die RIP1-Kinase-Aktivität für die HCMV-Replikation notwendig war.

Dazu wurden der Wildtyp und die Kinase-inaktive Mutante (RIP K45R, II, 12) der RIP1-Kinase in einem HCMV-Replikations-Test (III, 2.9) miteinander verglichen. RIP K45R kann als „kompetitiver Inhibitor“ in Konkurrenz zu endogenem RIP1 wirken. HFF-Zellen, die zum Zeitpunkt der Transduktion 90% konfluent waren, wurden mit replikationsdefizienten, rekombinanten Adenoviren (AdRIPwt und AdRIP K45R) transduziert (III, 2.8). Als Kontrolle für den Effekt der Adenovirus-Transduktion, wurde ein rekombinantes Adenovirus (AdJ5) mitgeführt, das eine leere Expressionskassette besaß (II, 12). 24h nach der Adenovirus-Transduktion wurden alle Zellen mit HCMV, das das *Green Fluorescent Protein* exprimierte (HCMV-AD169 GFP), mit einer MOI von 0,02 überinfiziert. Durch diese niedrig gewählte MOI konnte sichergestellt werden, dass zum Zeitpunkt der Zellernte, sieben Tage nach HCMV-Infektion, ca. 25% der Zellen infiziert und damit genügend Zellen für die Auswertung vorhanden waren. Die GFP-Fluoreszenz korrelierte dabei mit der HCMV-Virus-Produktion (Marschall et al., 2000) (Abb. 11A).

Verglichen mit Kontrollzellen, die nur mit HCMV infiziert wurden, konnte in Zellen, die zusätzlich mit Kinase-inaktivem RIP K45R (AdRIP K45R) transduziert wurden, eine dosisabhängige Hemmung der HCMV-Replikation beobachtet werden. Bereits bei einer moderaten Überexpression von RIP K45R (1000 Partikel pro Zelle), war die Virus-Produktion um ca. 60% der Kontrollinfektion supprimiert. Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um einen unspezifischen, adenoviralen Effekt handelt, da das Kontrollvirus AdJ5 nur eine marginale Hemmung der HCMV-Replikation verursachte (Abb. 11A). Die Kinase-Aktivität der RIP1-Kinase schien für die HCMV-Replikation notwendig zu sein.

A



B

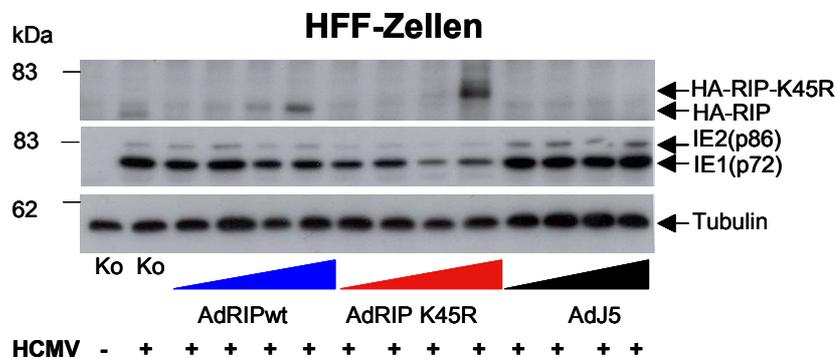


Abb. 11: Einfluss von inaktivem RIP1 auf die HCMV-Replikation

HFF-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (AdRIPwt, AdRIP K45R und AdJ5) mit steigenden Partikelzahlen (111, 333, 1000 und 3000) pro Zelle transduziert und 24h nach Transduktion mit HCMV AD169 GFP (MOI 0,02) überinfiziert.

A: Sieben Tage nach HCMV-Überinfektion wurden die Zellen lysiert und die GFP-Fluoreszenz wurde als Maß für die HCMV-Replikation gemessen (Marschall *et al.*, 2000). Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen (Ko) und nur mit HCMV infizierte Zellen (Ko, grüner Balken). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Doppelbestimmungen eines repräsentativen Tests von insgesamt fünf.

B: 24h nach der HCMV-Überinfektion wurden die Zellen lysiert. Jeweils 50µg der Proteinextrakte wurden für die Western Blot-Analyse eingesetzt (III, 1.9). Überexprimiertes RIP1 wurde mit einem HA-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle der HCMV-Infektion wurde der Antikörper auf der Membran entfernt und diese mit einem spezifischen Antikörper gegen die HCMV-IE1/2-Proteine inkubiert (III, 1.9). Zur Kontrolle der Proteinmengen wurde die Membran anschließend mit einem Tubulin-Antikörper inkubiert (ca. 20% Schwankungen). Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind links angegeben.

Für die Expressionskontrolle wurden überexprimiertes RIPwt oder RIP K45R, die zur Unterscheidung von endogenem RIP1 mit einem HA-tag versehen waren, in einer Western Blot-Analyse mit einem spezifischen HA-Antikörper nachgewiesen (III, 1.9). Auffällig war, dass die apparente molekulare Masse der RIP K45R-Mutante (HA-RIP K45R) in transduzierten Zellen um ca. 5-

10kDa grösser war, als die des RIP1-Wildtyps. Dies könnte ein Hinweis auf eine andere Proteinfaltung der Mutante sein. Die Expression der HCMV-Proteine IE1 und IE2 war bereits 24h nach HCMV-Infektion durch die Überexpression von RIP K45R deutlich reduziert. Die Überexpression des RIP Wildtyps oder des Kontrollvirus AdJ5 konnten, verglichen mit der Kontrolle (Ko+HCMV), keine Hemmung der Expression der HCMV-IE-Proteine verursachen. (Abb. 11 B). Hieraus folgt, dass die Hemmung der endogenen RIP1-Kinase-Aktivität durch die Mutante RIP K45R die Synthese der frühen HCMV-Proteine vermindert. Die frühen HCMV-Proteine IE 1 und 2 sind essentiell für die Aktivierung der viralen Gentranskription und der DNA-Replikation (Mocarski and Courcelle, 2001).

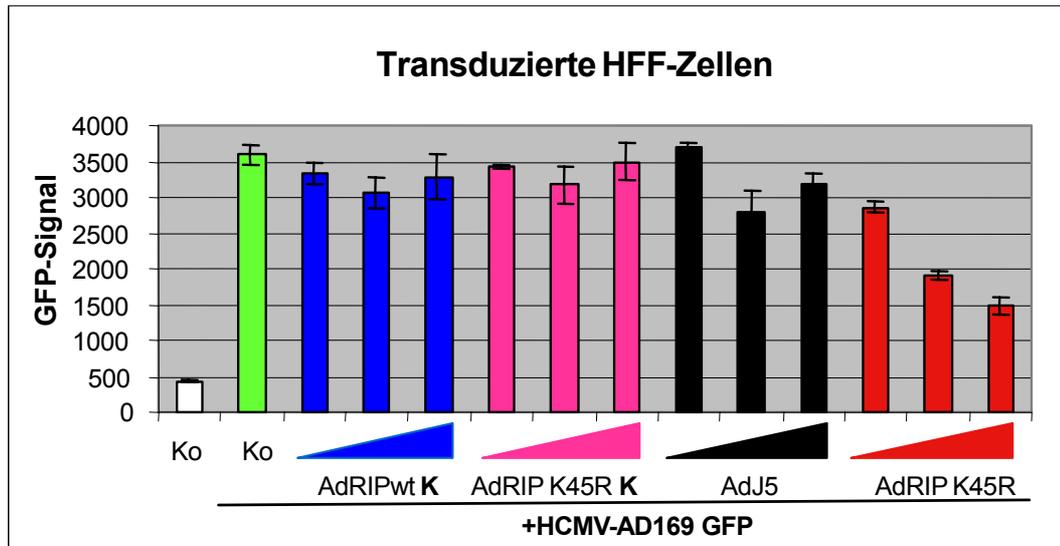
1.3 Effekt der Kinasedomäne von RIP1 auf die HCMV-Replikation

Da die Kinase-Aktivität der RIP1-Kinase notwendig für die HCMV-Replikation zu sein schien, wurde im folgenden Experiment untersucht, ob die Expression der mutierten Kinasedomäne alleine ausreichend für eine Supprimierung der HCMV-Replikation sein könnte.

Dazu wurden replikations-defiziente rekombinante Adenoviren hergestellt, die die Kinasedomänen von RIPwt (Ad RIPwt **K**) oder RIP K45R (Ad RIP K45R **K**) exprimierten (II, 12). Diese wurden in HCMV-Replikations-Tests eingesetzt, die wie im vorherigen Kapitel beschrieben, durchgeführt wurden (IV, 1.2). Die Kinasedomäne von RIP K45R (RIP K45R **K**) alleine konnte die HCMV-Replikation im Gegensatz zu RIP K45R in voller Länge (RIP K45R) nicht hemmen (Abb. 12A). Die Expression der mit Strep-tag versehenen RIP1-Mutanten wurde parallel in einer Western Blot-Analyse kontrolliert (Abb. 12B).

Dieses Ergebnis liess vermuten, dass nicht alleine die Kinase-Aktivität von RIP1, und die damit verbundene Phosphorylierung möglicher viraler oder zellulärer Substrate, sondern wahrscheinlich auch die Bindung dieser Substrate an die Intermediär- und/oder die *Death*domäne, wichtig für die HCMV-Replikation waren. Aus bislang nicht geklärten Gründen, gelang es leider nicht, weitere RIP1-Konstrukte als rekombinante Adenoviren herzustellen (aufgeführt in II, 12.).

A



B

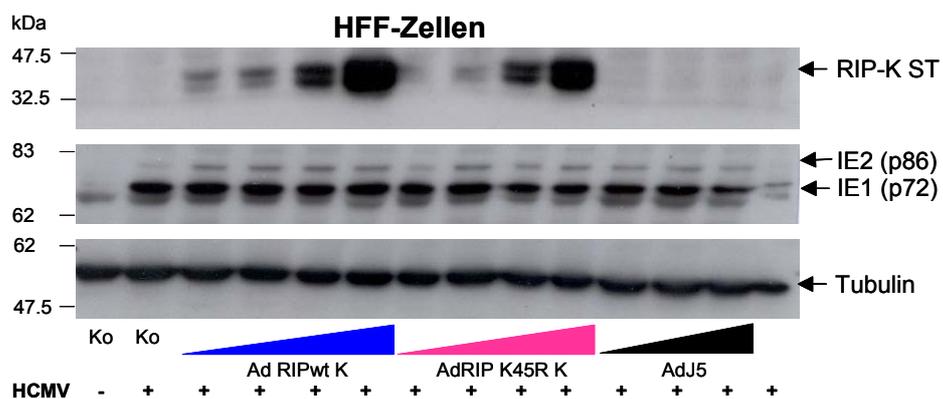


Abb. 12: Effekt der RIP1-Kinasedomäne auf die HCMV-Replikation

HFF-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (AdRIPwt **K**, AdRIP K45R **K** und AdJ5) transduziert. Als Kontrolle für den supprimierenden Effekt auf die HCMV-Replikation, wurde volle Länge AdRIP K45R parallel transduziert. Für den Replikations-Test wurden 333, 1000 und 3000 Partikel pro Zelle eingesetzt. 24h nach Transduktion wurden die Zellen mit HCMV-Ad169 GFP (MOI 0,02) überinfiziert.

A: Sieben Tage nach HCMV-Überinfektion wurde die GFP-Expression als Maß für die Virus-Produktion gemessen (III, 2.9; Marschall *et al.*, 2000). Als Kontrolle wurden unbehandelte (Ko) und nur mit HCMV infizierte Zellen (Ko, grüner Balken) mitgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten eines repräsentativen Tests.

B: Jeweils 50µg der Proteinextrakte wurden in der Western Blot-Analyse eingesetzt (III, 1.9). Die überexprimierte RIP1-Kinasedomäne (RIP-K-ST) wurde mit einem StrepTactin®-Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle der HCMV-Infektion wurde die PVDF-Membran erst mit einem HCMV-IE1/2-Antikörper und zur Kontrolle der Proteinmengen mit einem spezifischen Tubulin-Antikörper inkubiert (ca. 5% Schwankungen). Die Positionen und molekularen Massen des Proteinstandards (kDa) sind angegeben.

1.4 Expression von RIP1 nach HCMV-Infektion von U373-Zellen

Da HCMV *in vivo* neben Fibroblasten auch andere Zelltypen infizieren kann, sollte in einem weiteren Zellmodell untersucht werden, ob RIP1 notwendig für die HCMV-Replikation ist. Dazu wurden die HCMV-Infektions- und Replikations-Tests, die in IV, 1.1 und 1.2 beschrieben wurden, parallel in der humanen Astrozytenzelllinie U373 durchgeführt. U373-Zellen sind semi-permissiv für die HCMV-Infektion und lassen sich wesentlich effizienter transient mit DNA transfizieren (ca. 50-60% Transfektionseffizienz) als HFF-Zellen (Mocarski and Courcelle, 2001).

U373-Zellen wurden so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Infektion zu einem semi-konfluenten Zellrasen gewachsen waren. Damit das Maß der HCMV-Infektion in U373-Zellen vergleichbar mit dem in HFF-Zellen war, mussten die für HCMV semi-permissiven U373-Zellen mit einer zehnfach höheren MOI infiziert werden (Mocarski and Courcelle, 2001). 6-72h Stunden nach der Infektion wurde Gesamt-RNA extrahiert, die mittels Northern Blot-Analyse untersucht wurde. Verglichen mit nicht infizierten U373-Zellen (0hpl), war die RIP1-mRNA bereits 6h nach der HCMV-Infektion (6hpl) gut nachweisbar (Abb. 13). Western Blot-Analysen zeigten eine Hochregulation von RIP1 auch auf Proteinebene (nicht gezeigt). Die Hochregulation der Expression der RIP1-Kinase nach einer HCMV-Infektion schien nicht zelltypspezifisch für Fibroblasten zu sein.

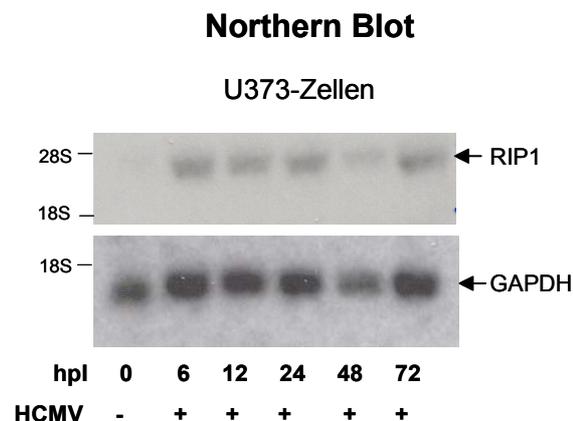


Abb. 13: Expression von RIP1 nach HCMV-Infektion in U373-Zellen

U373-Zellen wurden mit HCMV-AD169wt mit einer MOI von 0,2 infiziert und Gesamt-RNA 6, 12, 24, 48 und 72h nach Infektion (hpl) aus den Zellen extrahiert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (0hpl).

Die Northern Blot-Analyse wurde parallel zu der in Abb. 11 beschriebenen Northern Blot-Analyse durchgeführt. Obere Autoradiographie: Hybridisierung mit einer ^{32}P -markierten RIP1-cDNA-Sonde. Zum Nachweis konstanter RNA-Mengen wurde die Membran anschliessend mit einer ^{32}P -markierten GAPDH-Sonde hybridisiert (untere Autoradiographie).

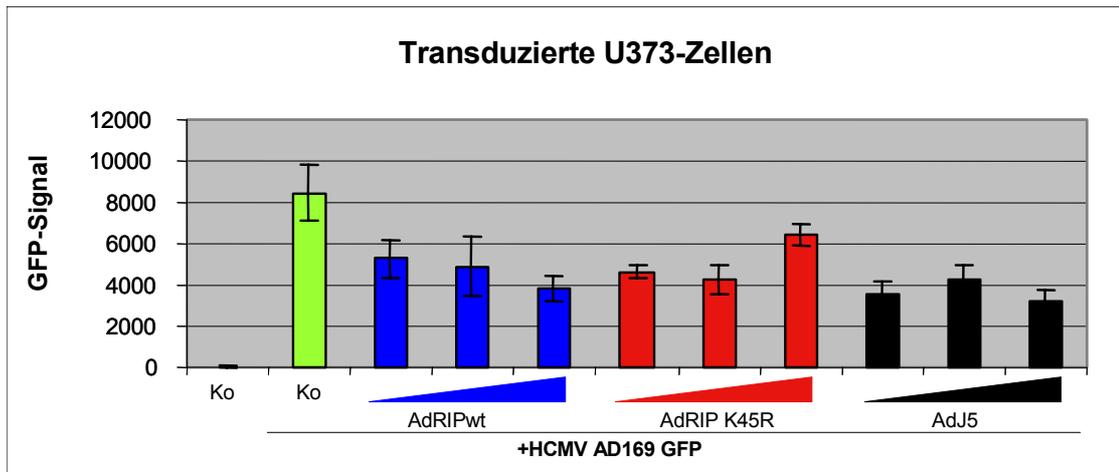
1.5 Effekt von RIP1 auf die HCMV-Replikation in U373-Zellen

Ob es sich eventuell um ein allgemein gültiges Konzept bei der HCMV-Infektion handeln könnte, wurde in verschiedenen Zellen, die sich mit HCMV infizieren lassen, anhand des Einflusses der RIP1-Mutante auf die HCMV-Replikation untersucht.

U373-Zellen, die zum Zeitpunkt der Transduktion 50% konfluent waren, wurden mit rekombinanten Adenoviren transduziert (IV, 1.2). 24h nach der Adenovirus-Transduktion wurden die Zellen mit HCMV-AD169 GFP infiziert. Sieben Tage nach der HCMV-Infektion wurde die GFP-Fluoreszenz als Maß für die Virus-Produktion gemessen. Im Gegensatz zu HFF-Zellen, konnte die Kinase-inaktive RIP-Mutante RIP K45R die HCMV-Replikation in U373-Zellen nicht hemmen. Die HCMV-Replikation wurde in U373-Zellen durch die adenovirale Transduktion *per se* inhibiert. Die rekombinanten Adenoviren waren bei höheren Konzentrationen (3000 Partikel pro Zelle) toxisch für die U373-Zellen (Abb. 14A). In einer parallel durchgeführten Western Blot-Analyse wurde überexprimiertes RIP1 mit einem spezifischen HA-Antikörper nachgewiesen (Abb. 14B).

Auch zusätzlich durchgeführte HCMV-Replikations-Tests in transient transfizierten U373-Zellen zeigten, dass RIP1 in Astrozyten nicht notwendig für die HCMV-Replikation war. Damit schien RIP1 nur zelltypspezifisch in HFF-Zellen wichtig für die HCMV-Replikation zu sein. Es gibt nur wenige Zellkultursysteme, in denen eine produktive HCMV-Replikation möglich ist, und damit sind die bisher gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Bedeutung von RIP1 für die HCMV-Produktion schwierig zu beurteilen.

A



B

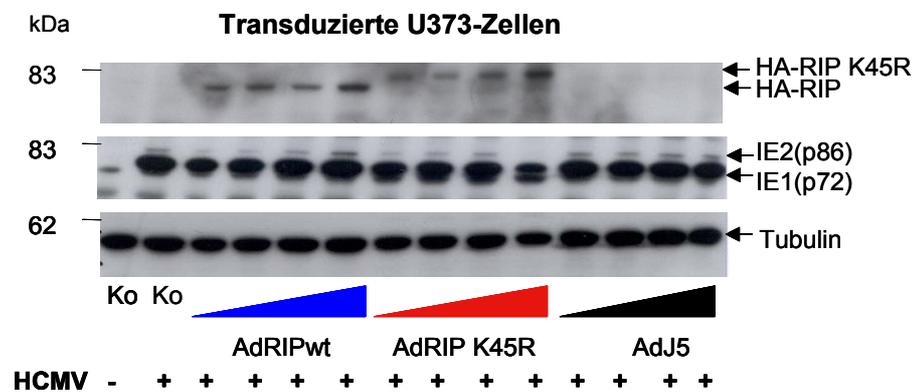


Abb. 14: HCMV-Replikations-Test mit überexprimiertem RIP1 in U373-Zellen

U373-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (AdRIPwt, AdRIP K45R und Adj5) transduziert. Für den HCMV-Replikations-Test wurden 333, 1000 und 3000 Partikel pro Zelle verwendet.

A: 24h nach Transduktion wurden die Zellen mit HCMV-Ad169 GFP mit einer MOI von 0,2 überinfiziert. Sieben Tage nach der HCMV-Überinfektion wurde die GFP-Expression als Maß für die Virus-Produktion gemessen (III, 2.9). Als Kontrolle wurden unbehandelte (Ko) und nur mit HCMV infizierte Zellen (Ko, grüner Balken) mitgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Duplikaten eines repräsentativen Tests von insgesamt 3 Tests.

B: 24h nach der HCMV-Infektion wurden die Zellen lysiert. Jeweils 50µg der erhaltenen Proteinextrakte wurden in der Western Blot-Analyse eingesetzt (III, 1.9). Überexprimiertes RIP1 wurde mittels eines HA-Antikörpers nachgewiesen. Die PVDF-Membran wurde erst mit einem HCMV-IE1/2-Antikörper zur Kontrolle der HCMV-Infektion und anschließend mit einem spezifischen Tubulin-Antikörper zur Kontrolle der Proteinmengen inkubiert (III, 1.9). Die Positionen und molekularen Massen des Proteinstandards (kDa) sind angegeben.

2. Chemische Validierung von RIP1

Welche Bedeutung die RIP1-Kinase für die HCMV-Infektion hat, wurde nicht nur genetisch durch den Einsatz einer Kinase-inaktiven RIP1-Mutante, sondern auch mit Hilfe von RIP1-Kinase-Inhibitoren untersucht.

Dazu wurden die folgenden vier RIP1-Kinase-Inhibitoren¹ für die Replikation von HCMV getestet: BIRB 796-Derivat 1², BIRB 796-Derivat 2³, BIRB 796, ein Pyrazol-Harnstoff von Boehringer Ingelheim und SB203580, ein Pyridinyl-Imidazol (Lee *et al.*, 1994; Abb. 15A). Als Positivkontrolle für eine Inhibierung der HCMV-Replikation wurde Ganciclovir (GCV) verwendet (I, 1.3.3). HFF-Zellen, die zu 90% konfluent waren, wurden mit HCMV AD169 GFP infiziert und 2h nach der Infektion mit den jeweiligen Konzentrationen der Inhibitoren für sieben Tage inkubiert. Als Maß für die HCMV-Produktion wurde die GFP-Expression der lysierten Zellen gemessen und quantifiziert (Abb. 15B).

Die HCMV-Replikation konnte bereits bei einer Konzentration von 1,1µM durch das BIRB-Derivat 1 um ca. 50% gehemmt werden. Mit einer Konzentration von 1,1µM des Inhibitors SB203580 konnte eine ca. 40%ige Hemmung der HCMV-Replikation erreicht werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Hemmung der RIP1-Kinase-Aktivität durch Kinase-Inhibitoren mit der Supprimierung der HCMV-Replikation durch eine Kinase-inaktive RIP1-Mutante in HFF-Zellen korrelierte. In weiteren Experimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass die hier verwendeten RIP1-Kinase-Inhibitoren sowohl die RIP1-Kinase-Aktivität als auch die MAP Kinase p38 hemmen konnten⁴. Für eine spezifische Hemmung der RIP1-Kinase-Aktivität konnten diese Inhibitoren nicht verwendet werden.

Parallel zur HCMV-Replikation wurde die Vitalität der Zellen bestimmt, um mögliche toxische Effekte der Inhibitoren auszuschliessen. HFF-Zellen wurden ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Behandlung mit den Inhibitoren zu 90% konfluent waren. Einen Tag nach der Aussaat wurden die Zellen mit maximal 10µM der Inhibitoren, gelöst in 1% DMSO, für fünf Tage inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde anhand der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität mittels

¹ Zur Verfügung gestellt von T. Herget und H. Mett, Axxima Pharmaceuticals AG

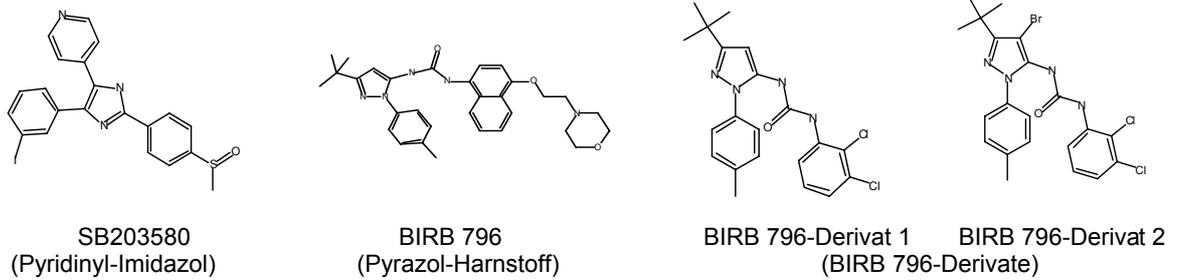
² BIRB 796-Derivat 1 = 1-(5-tert-Butyl-2-p-tolyl-2H-pyrazol-3-yl)-3-(2,3-di-chlorophenyl)-Harnstoff

³ BIRB 796-Derivat 2 = 1-(4-Bromo-5-tert-butyl-2-p-tolyl-2H-pyrazol-3-yl)-3-(2,3-dichloro-phenyl)-Harnstoff

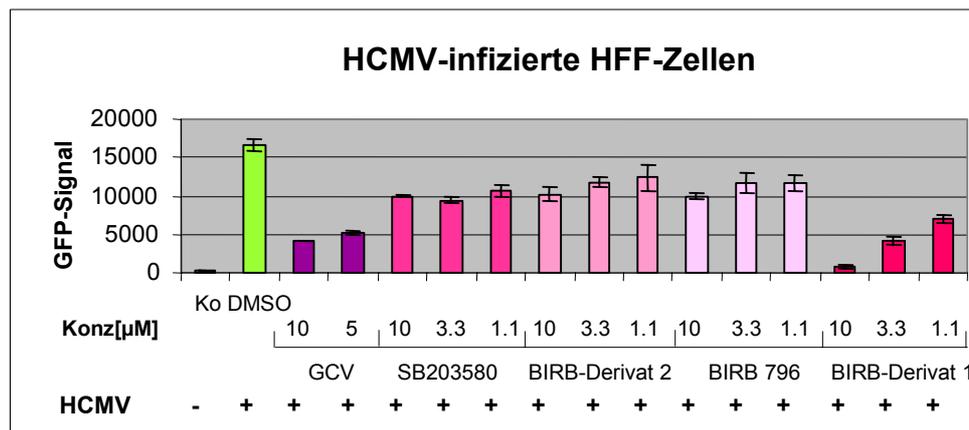
⁴ D. Hafenbradl, Axxima Pharmaceuticals AG

einer Farbreaktion gemessen (III, 2.13). Bei Konzentrationen von 1,1 μ M waren sowohl der Inhibitor SB203580 als auch das BIRB-Derivat 1 nicht toxisch für die HFF-Zellen (Abb. 15C).

A



B



C

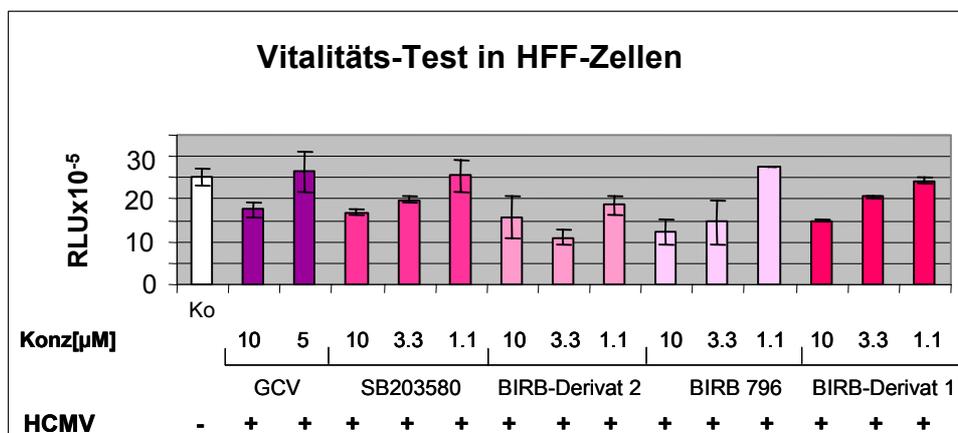


Abb. 15: Effekt von 4 RIP1-Inhibitoren auf die HCMV-Replikation

A: Dargestellt sind die Strukturformeln der in den HCMV-Replikations-Tests verwendeten Inhibitoren.

B: HCMV-Replikations-Tests in Gegenwart von 4 Inhibitoren: HFF-Zellen wurden mit HCMV AD169 GFP (MOI von 0,02) infiziert. 2h nach der Infektion wurden die Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben und 7d inkubiert. Anschliessend wurde die GFP-Fluoreszenz als Maß für die HCMV-Replikation gemessen (III, 2.9). Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen (Ko), mit 1% DMSO (Lösungsmittel für Inhibitoren) behandelte Zellen (DMSO) und mit Ganciclovir behandelte Zellen (GCV). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Duplikaten eines repräsentativen Tests von insgesamt 4 Tests.

C: Vitalitäts-Tests in Gegenwart von 4 Inhibitoren: HFF-Zellen wurden einen Tag nach Aussaat mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren für 5d inkubiert. Anschliessend wurde die mitochondriale Aktivität der Zellen, angezeigt durch die Farbreaktion des Alamar Blue Reagenzes, gemessen (III, 2.13). Als Kontrolle wurden mit 1% DMSO behandelte Zellen mitgeführt (Ko). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Duplikaten eines repräsentativen Tests von insgesamt 4 Tests.

3. Interaktion von RIP1 mit viralen Proteinen

3.1 Interaktion von RIP1 mit einem HCMV-Phosphoprotein

Für einige virale Proteine konnte bereits gezeigt werden, dass sie zelluläre Proteinkinasen phosphorylieren und über diese Phosphorylierung zelluläre Signalkaskaden beeinflussen können (Mocarski and Courcelle, 2001; Muranyi *et al.*, 2002). Neben zellulären Proteinen, die durch RIP1 phosphoryliert werden, könnten möglicherweise auch HCMV-Proteine phosphoryliert werden, deren Phosphorylierung essentiell für die HCMV-Replikation ist (I, 2.3.2). Das wäre eine mögliche Erklärung für die Hemmung der HCMV-Virusproduktion durch Kinase-inaktives RIP K435R. Zunächst wurde *in vitro* untersucht, ob die aus *E.coli* aufgereinigte RIP1-Kinasedomäne (RIPwt K-GST)⁵ spezifisch HCMV-Proteine phosphorylieren könnte (III, 3.3). In aufgereinigten HCMV-Virionen konnte eine verstärkte Phosphorylierung der Bande, die in Höhe der molekularen Masse des HCMV-Tegumentproteins pp65 lief, beobachtet werden. Um zu zeigen, dass HCMV-pp65 ein Substrat von RIP1 sein könnte, wurde pp65 mit Hilfe des QIAExpressionist-Systems (Qiagen) in *E.coli* exprimiert und über den Strep-tag aufgereinigt (III, 3.1). Anschliessend wurde das aufgereinigte pp65 gemeinsam mit RIP1 *in vitro* in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert (Abb. 16A). Zur Kontrolle der pp65-Proteinmengen wurde eine

⁵ Zur Verfügung gestellt von K. Stegmüller, Axxima Pharmaceuticals AG.

Western Blot-Analyse mit einem spezifischen pp65-Antikörper durchgeführt (Abb. 16B).

In der Autoradiographie konnte die RIPwt-Autophosphorylierung (Spur 1), die Phosphorylierung des RIP1-Substrats *Myelin Basic Protein* (MBP; Spur 2) und die Phosphorylierung des HCMV-pp65 gezeigt werden (Spur 4). Kinase-inaktives RIP K45R K-GST wurde als Negativkontrolle mitgeführt (Spur 3). Die Autophosphorylierung von pp65, die in der Literatur kontrovers diskutiert wird, konnte in diesem Versuch nicht festgestellt werden (Spur 7; Gallina *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2001). Das HCMV-Tegumentprotein pp65 konnte anhand dieser Ergebnisse als *in vitro*-Substrat für RIP1 identifiziert werden. *In vivo*-Markierungen von transient transfizierten Zellen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen (III, 3.12).

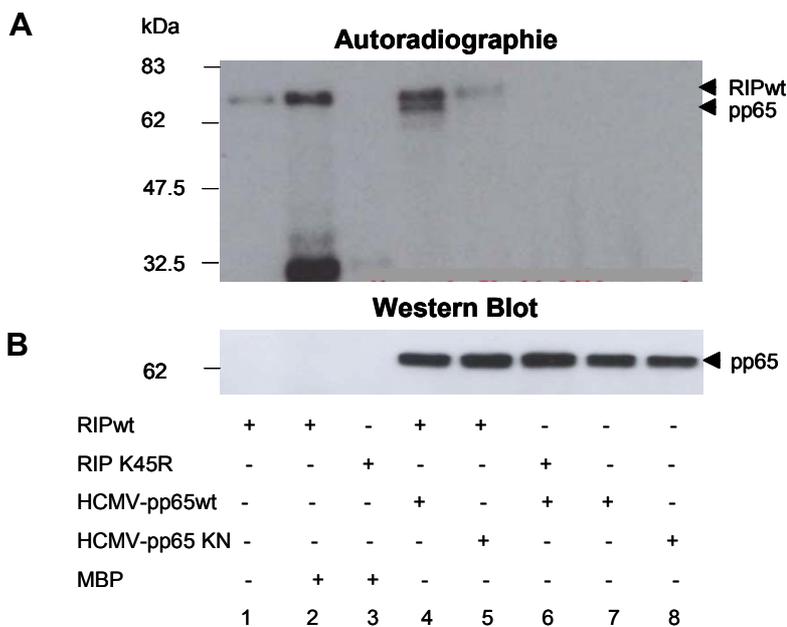


Abb. 16: *In vitro*-Phosphorylierung des HCMV-Tegumentproteins pp65 durch RIP1

A: pp65wt und pp65 K436N, die an StrepTactin-Macrobeads gebunden waren, wurden mit je 2µg RIPwt K-GST oder RIP K45R K-GST in einem RIP-Kinase-Assay-Puffer (II, 8.6) mit je 1µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP für 1h bei 37°C inkubiert (III, 3.1 und 3.3). Die Proteinphosphorylierung wurde in einer Autoradiographie nachgewiesen.

B: Zum Nachweis gleicher Proteinmengen von pp65wt und pp65 K436N wurde eine Western Blot-Analyse mit einem spezifischen pp65-Antikörper durchgeführt (III, 1.9). Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind links angegeben.

3.2 Einfluss von RIP1 auf den HCMV-Promotor in HFF-Zellen

RIP1 schien notwendig für die Aktivierung der HCMV-Proteine IE1 und 2 zu sein (IV, 1.2; Abb. 11B). Um zu prüfen, ob RIP1 die HCMV-IE1- und IE2-Proteine über ihren gemeinsamen Promotor aktivieren konnte, wurden Reporteragen-Analysen mit dem HCMV-IE1/2-Promotor durchgeführt. Dazu wurden semi-konfluente HFF-Zellen transient mit dem Expressionsplasmid pHM287, in dem die Expression der *firefly* *Luziferase* durch den HCMV-IE1/2-Promotor reguliert wurde, und den Plasmiden für RIPwt oder RIP K45R kotransfiziert (II, 12; III, 2.3). Zwei Tage nach der Transfektion wurde die Expression der Luziferase quantifiziert. Aufgrund der hohen Sensitivität des Luziferase-Nachweises konnte dieses Experiment in HFF-Zellen durchgeführt werden (III, 2.10).

Sowohl RIPwt als auch Kinase-inaktives RIP K45R konnten den HCMV-IE1/2-Promotor dosisabhängig maximal um das Vierfache der Kontrolle (-TNF α) aktivieren. Die Promotoraktivität konnte durch hohe Mengen der RIP1-Kinase gehemmt werden (Abb. 17). Damit konnte die Hemmung des HCMV-Promotors als Ursache für die Supprimierung der HCMV-Replikation durch RIP K45R ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse konnten in HeLa-Zellen bestätigt werden (nicht gezeigt).

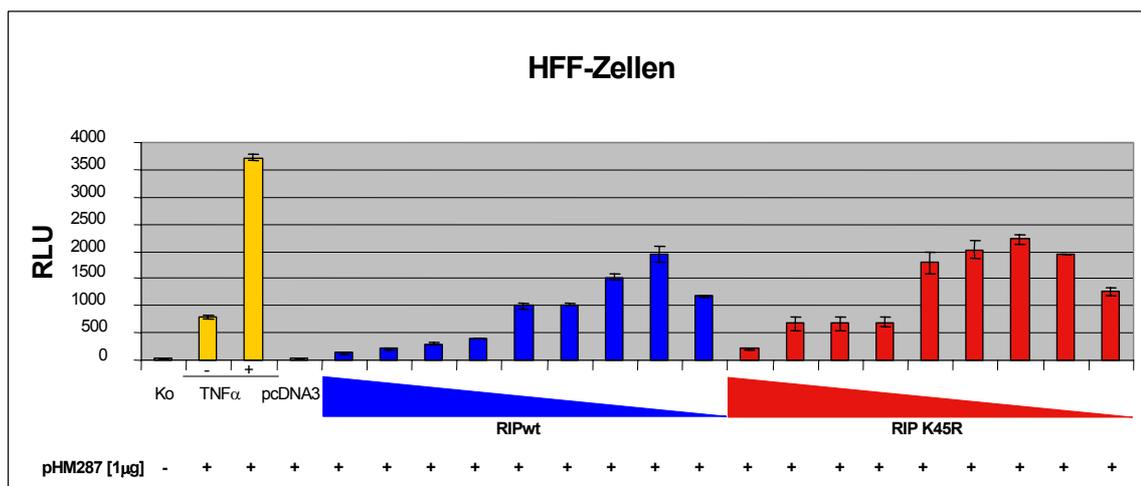


Abb. 17: Effekt von RIP1 auf den HCMV-Promotor

HFF-Zellen wurden mit je 1 μ g DNA von pHM287 (Expressionsplasmid für den HCMV-IE1/2-Promotor); 0,5 μ g DNA von pPM7-CrmA und absteigenden Mengen (0,1 μ g-0,0002 μ g DNA) an pcDNA3.1-RIPwt-HA bzw. pcDNA3.1-RIP K45R-HA transient transfiziert (II, 12; III, 2.3). Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen (Ko) und mit

pcDNA3.1 transfizierte Zellen. Die maximale Induzierbarkeit des Luziferase-Reporterplasmids pHM287 wurde durch die Stimulierung mit 20ng/ml TNF α (EK) für 24h kontrolliert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Überstände der lysierten Zellen wurden wie in III, 2.10 beschrieben behandelt. Anschliessend wurde die Chemilumineszenz gemessen und quantifiziert (III, 2.10). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Tests von insgesamt 3 Tests.

4. Effekt von RIP K45R auf einige wesentliche Zellfunktionen

Da RIP1 an der Induktion der TNF-vermittelten Apoptose beteiligt ist, sollte untersucht werden, ob Kinase-inaktives RIP K45R die physiologischen Eigenschaften der Zelle wie Wachstum und Apoptose beeinflussen konnte (Stanger *et al.*, 1995; Santoro *et al.*, 2003). Parallel dazu sollte die intrazelluläre Lokalisation des RIP1-Wildtyps und der Kinase-inaktiven RIP-Mutante untersucht werden.

4.1 Zellwachstum und Apoptose

Für die Wachstumskurven wurden HFF-Zellen ausgesät und 24h nach Aussaat mit rekombinanten RIP-Adenoviren transduziert. Einen Tag nach der Transduktion wurden die Zellen mit HCMV-AD169 GFP überinfiziert (III, 2.9). Ein, drei, fünf und sieben Tage nach der HCMV-Infektion wurden die Zellen abgelöst und in einem Coulter Counter gezählt (II, 1). Die absolute Zellzahl wurde gegen die Zeit in Tagen (d) aufgetragen (Abb. 18).

Die Wachstumskurven der Zellen, die RIPwt oder RIP K45R exprimierten, waren nahezu identisch, so dass verändertes Zellwachstum nicht der Grund für die Hemmung der HCMV-Replikation durch Kinase-inaktives RIP sein konnte (Abb. 18).

Apoptose kann in Zellen u.a. durch erhöhte Caspase-Aktivität nachgewiesen werden (Wajant *et al.*, 2003). Vorläufige Ergebnisse aus Caspase-Glo™ 3/7-Tests zeigten keine veränderte Caspase-Aktivität in RIP K45R transduzierten HFF-Zellen (III, 2.14; Daten nicht gezeigt). Um eine differenziertere Aussage treffen zu können, müssten die Ergebnisse zur Apoptose auf Einzelzellebene (z.B. TUNEL™, Roche) verifiziert werden.

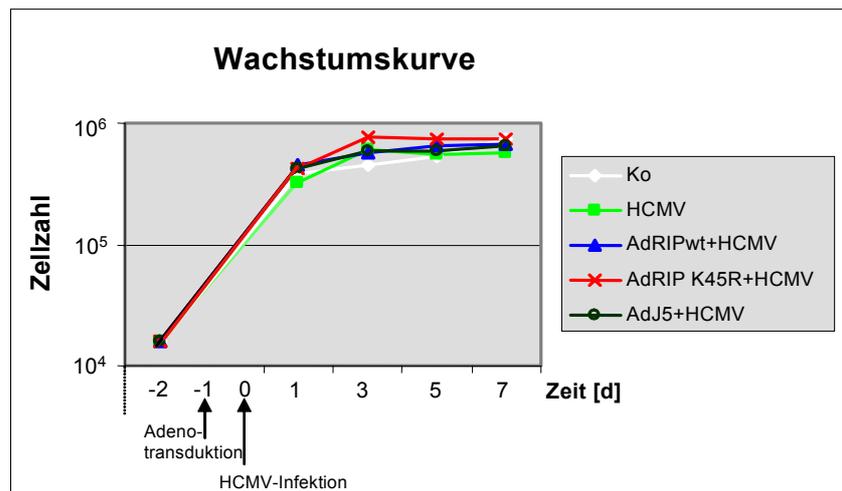


Abb. 18: Wachstumskurven von transduzierten HFF-Zellen

HFF-Zellen wurden in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen mit einer Zellzahl von $1,6 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung ausgesät. 24h nach der Aussaat wurden sie mit rekombinanten Adenoviren (siehe Legende; II, 12) mit jeweils 1000 Partikeln pro Zelle transduziert (d-1). 24h nach der Adenotransduktion wurden die Zellen mit HCMV-AD169 GFP mit einer MOI von 0,02 infiziert (d0). Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (Ko), mit AdJ5 transduzierte Zellen und nur mit HCMV-AD169 GFP infizierte HFF-Zellen (HCMV). Am 1., 3., 5. und 7. Tag nach der HCMV-Infektion wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, in 1ml PBS aufgenommen und gezählt. Die absolute Zellzahl wurde logarithmisch gegen die Zeit in Tagen (d) aufgetragen. Gezeigt ist eine repräsentative Kurve aus 3 unabhängigen Experimenten.

4.2 Lokalisation von RIP1

Die intrazelluläre Lokalisation von RIPwt und RIP K45R wurde in indirekten Immunfluoreszenz-Analysen in HFF-Zellen untersucht. Dazu wurden HFF-Zellen, die zu 90% konfluent auf Glasplättchen gewachsen waren, mit rekombinanten Adenoviren transduziert und einen Tag nach Transduktion mit HCMV-AD169 GFP infiziert (III, 2.9). 24h nach der HCMV-Infektion wurden die Zellen fixiert, mit spezifischen Antikörpern gegen RIP gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert (II, 12; III, 2.11). Sowohl RIPwt als auch RIP K45R konnten diffus verteilt im Zytoplasma der Zellen gefunden werden. Deutlich zu erkennen waren die Aussparungen der Zellkerne (Abb. 19, Spalte 2). Um gesicherte Aussagen über die subzelluläre Lokalisation von RIPwt und RIP K45R machen zu können, müssten Kolo-kalisationsexperimente durchgeführt werden. Aus den vorliegenden Daten konnte keine abschliessende Aussage zur Lokalisation der Kinase-inaktiven RIP-Mutante getroffen werden.

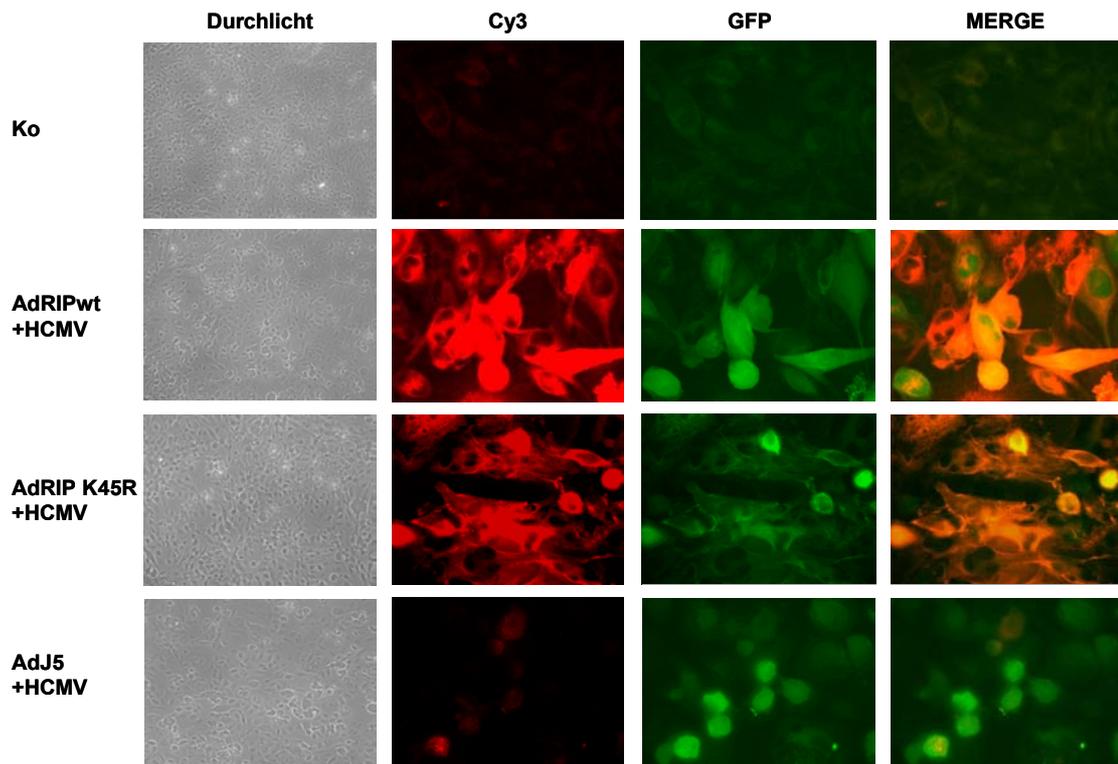


Abb. 19: Lokalisation von überexprimiertem RIP1 in HFF-Zellen

HFF-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (AdRIPwt, AdRIP K45R und AdJ5) mit je 1000 Partikeln pro Zelle transduziert. 24h nach der Transduktion wurden die Zellen mit HCMV-AD169 GFP (MOI 1) infiziert (III, 2.9). Einen Tag nach HCMV-Überinfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert (III, 2.11). Anschliessend wurden die Zellen mit einem spezifischen HA-Antikörper und einem Cy3-konjugierten Zweitantikörper gefärbt (III, 2.11). Die Zellen wurden dann in einer 100fachen Vergrößerung (Durchlicht) oder in einer 630fachen Vergrößerung (Cy3, GFP und MERGE = Überlagerung der Cy3 und GFP-Fluoreszenzen) an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Zeiss) untersucht. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (Ko). Der Nachweis der überexprimierten RIP-HA-Konstrukte erfolgte über Cy3 (rot). Die GFP-Expression (grün) konnte in allen Zellen, die mit HCMV infiziert waren, beobachtet werden (Spalte 3). In Spalte 4 ist die Überlagerung (MERGE) der GFP-Fluoreszenz mit der Cy3-Fluoreszenz gezeigt.

5. Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der Kinase-inaktiven RIP-Mutante

Die RIP K45R vermittelte Supprimierung der HCMV-Virus-Produktion konnte auch durch Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von RIP K45R mit endogenem RIP1 hervorgerufen werden. Um diese These zu prüfen, wurden HEK293-Zellen mit RIPwt mit C-terminalen Hämagglutinin-tag (HA-tag) und RIP-Konstrukten mit C-terminalen Strep-tag transient kotransfiziert (III, 2.3). Anschliessend wurden Ko-Immünpräzipitationen, wie in III, 3.2 beschrieben, durchgeführt. Der Nachweis der gebundenen Proteine erfolgte in einer Western Blot-Analyse mit einem spezifischen HA-Antikörper (III, 1.9).

RIPwt-HA konnte sowohl in RIPwt-ST- als auch in RIP K45R-ST-Präzipitaten nachgewiesen werden (Abb. 20; obere Western-Blot-Analyse: Spuren 5 und 8). Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl RIPwt als auch RIP K45R Dimere bzw. Oligomere bilden konnten. Für die Dimerisierung oder Oligomerisierung der RIP-Proteine schien die Deathdomäne nicht notwendig zu sein, da auch RIP-Konstrukte, die nur die Kinase- und die Intermediärdomäne enthielten (RIP-KI-ST-Konstrukte) RIPwt binden konnten (Abb. 20; untere Western Blot-Analyse: Spuren 11 und 14). Für Schlussfolgerungen hinsichtlich der Bedeutung der Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von RIP K45R mit endogenem RIP1 für die Supprimierung der HCMV-Infektion müssten Ko-Immünpräzipitations- und Infektionsversuche gekoppelt werden.

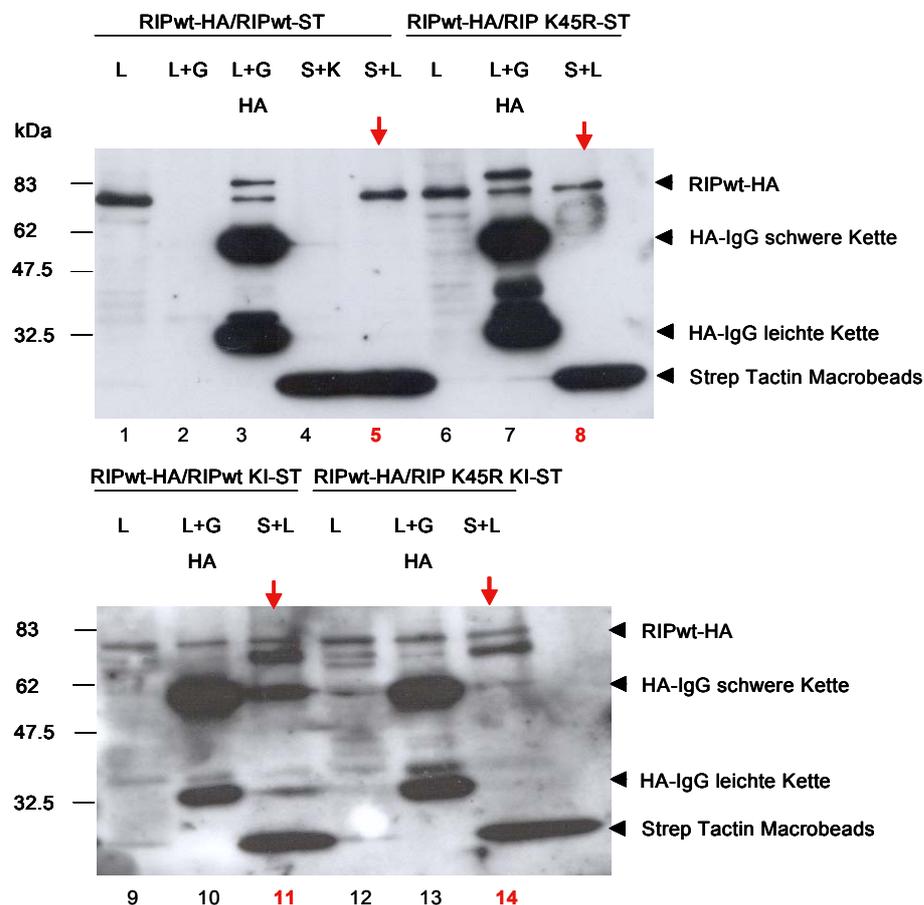


Abb. 20: Ko-Immünpräzipitationen von RIP-Konstrukten

HEK293-Zellen wurden mit RIPwt-HA und RIPwt-ST, RIPwt KI-ST und den dazugehörigen Kinase-inaktiven K45R-Konstrukten transient transfiziert (II, 12; III, 2.3). 48h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Die Lysate (L) in den Spuren 1, 6, 9 und 12 wurden mit Protein-G-Sepharose (G) und einem spezifischen HA-Antikörper (HA; Spuren 3, 7, 10 und 13) oder mit Strep Tactin Macrobeads (S; Spuren 5, 8, 11 und 14) präzipitiert (III, 3.1.2 und 3.2). Kontrollen: Unspezifische Bindungen an die Protein-G-Sepharose wurden in Lysaten, die nur mit Sepharose inkubiert wurden, kontrolliert (L+G; Spur 2). Zur Kontrolle der unspezifischen Bindung an

StrepTactin Macrobeads, wurden diese mit einem Kontroll-Lysat (S+K; Spur 4) inkubiert. Dabei fiel eine unspezifische starke Bande auf der Höhe von ca. 25kDa auf (Spuren 4, 5, 8, 11 und 14). Präzipitiertes RIPwt-HA, das über die RIP-Konstrukte mit Strep-tag an StrepTactin-Macrobeads gebunden war, wurde mit einem HA-Antikörper nachgewiesen (Spuren 5, 8, 11 und 14). Die Positionen und molekularen Massen des Proteinstandards sind links angegeben.

6. Effekt von RIP1 auf zelluläre Signaltransduktionswege während der HCMV-Infektion

RIP1 ist an wichtigen, zellulären Signaltransduktionswegen, wie dem NF κ B-Signalweg und den MAP Kinase-Signalwegen beteiligt (siehe I, 2.3.2). Dadurch lag die Vermutung nahe, dass durch die Kinase-inaktive RIP-Mutante ein oder mehrere für die HCMV-Replikation wichtige zelluläre Signalwege gehemmt werden könnten (I, 2).

6.1 MAP Kinase-Signalwege

In Western Blot-Analysen mit phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern gegen die drei zellulären MAP Kinasen ERK1/2, c-Jun und p38, sollte gezeigt werden, dass RIP K45R eine oder mehrere MAP Kinasen nicht phosphorylieren konnte. Die Ergebnisse der Versuche zeigten allerdings, dass die hier untersuchten MAP Kinase Signalwege für die RIP K45R vermittelte Hemmung der HCMV-Replikation nicht relevant waren (Daten nicht gezeigt).

6.2 NF κ B-Signalweg

Wie die Aktivierung der MAP Kinase-Signalwege, konnte auch die Aktivierung von NF κ B durch die Phosphorylierung des Inhibitors von NF κ B - I κ B - mittels phosphorylierungs-spezifischer Antikörper in Western Blot-Analysen nachgewiesen werden. Dazu wurden HFF-Zellen mit rekombinanten Adenoviren transduziert und zwei Tage nach der Transduktion für 15min mit HCMV infiziert. Um eine möglichst niedrige Hintergrund-Phosphorylierung zu erhalten, wurden die Zellen 24h vor der Infektion in serumfreien Medium inkubiert (III, 2.8). Da die Phosphorylierung und die dadurch ausgelöste Degradierung von I κ B ein sehr schneller Prozess ist, wurden die Zellen vor der HCMV-Infektion

mit MG-132, einem Proteasom-Inhibitor, inkubiert, um den schnellen Abbau von I κ B zu verhindern (I, 2.3.2). Es konnte kein Unterschied der I κ B-Phosphorylierung in Zellen, die RIPwt oder RIP K45R exprimierten, festgestellt werden (Abb. 21A, Spuren 3, 4, 5 und 6, 7, 8). In infizierten HFF-Zellen, die mit RIP K45R transduziert waren, konnte eine dosisabhängige Zunahme der I κ B-Phosphorylierung beobachtet werden, obwohl die Bande von phosphoryliertem I κ B nicht signifikant abnahm. Dieses Phänomen könnte durch Proteinneusynthese erklärt werden (Abb. 21A, Spuren 6, 7 und 8). Erstaunlicherweise konnte RIP K45R die I κ B-Phosphorylierung in nicht infizierten Zellen dosisabhängig „induzieren“ (Abb. 21B, Spuren 6, 7 und 8). Parallel wurden Western Blot-Analysen mit nicht stimulierten Zellen durchgeführt (Abb. 21B).

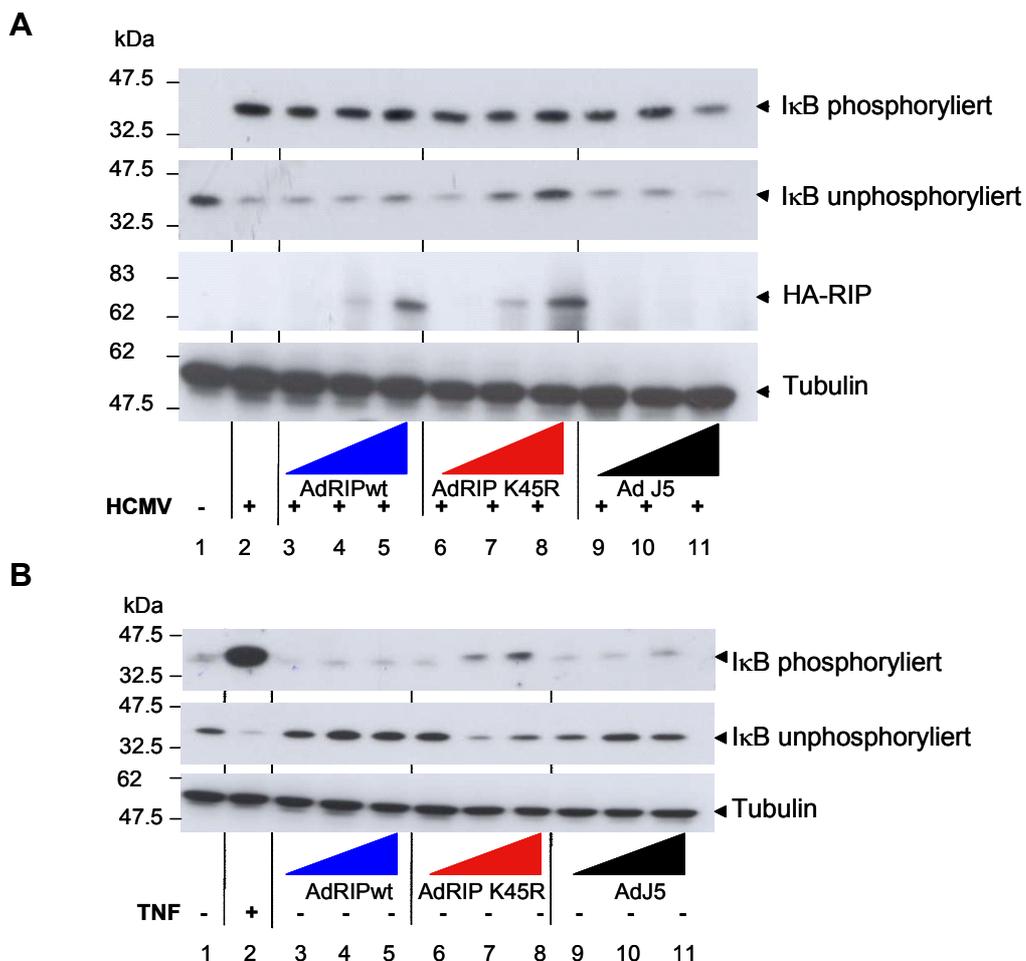


Abb. 21: Effekt von RIP K45R auf die Aktivierung von NF κ B

HFF-Zellen (90% konfluent) wurden mit AdRIPwt, AdRIP K45R und AdJ5 mit je 333, 1000 und 3000 Partikel pro Zelle transduziert und 48h nach Transduktion für 30min mit MG-132 (2.5mM) inkubiert.

A: Anschliessend wurden die Zellen mit HCMV-AD169wt (MOI 5) für 15min infiziert (III, 2.8).

B: Ein Ansatz wurde für 3min mit $\text{TNF}\alpha$ (20ng/ml) stimuliert. Die restlichen Zellen blieben unbehandelt. Alle Zellen wurden wie in III, 2.7 beschrieben lysiert. Die $\text{I}\kappa\text{B}$ -Phosphorylierung wurde in einer Western Blot-Analyse mit einem phosphorylierungs-spezifischen Antikörper (III, 1.9; II, 6) nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde die Membran mit einem spezifischen $\text{I}\kappa\text{B}$ -Antikörper inkubiert, der nur die nicht phosphorylierte Form von $\text{I}\kappa\text{B}$ erkannte. Der Nachweis von überexprimiertem RIP erfolgte über einen spezifischen HA-Antikörper. Die Proteinmengen wurden mit einem spezifischen Tubulin-Antikörper kontrolliert (ca. 20% Schwankungen). Die Positionen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind links angegeben.

Die geringe aber reproduzierbar nachweisbare Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}$ durch die RIP K45R-Mutante könnte Teil des Mechanismus der Hemmung der HCMV-Replikation sein. Um dieser Frage nachzugehen, wurden HCMV-Replikations-Tests durchgeführt, in denen die $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung durch die Überexpression einer S32A/S26A-Mutante von $\text{I}\kappa\text{B}$ ($\text{I}\kappa\text{B}\Delta^6$) blockiert wurde. HFF-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren transduziert und einen Tag nach Transduktion mit HCMV-AD169 GFP überinfiziert. Sieben Tage nach der HCMV-Infektion wurde die GFP-Expression gemessen und quantifiziert (III, 2.9).

Wie bereits beschrieben, hatte die Hemmung des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalwegs keinen Einfluss auf die HCMV-Replikation (Eickhoff *et al.*, 2003; Abb. 22, blauer Balken). Anders als für RICK, für das beschrieben wurde, dass die durch RICKwt verursachte Supprimierung der Virus-Produktion über die Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ vermittelt wird (Eickhoff *et al.*, 2003), konnte dies für RIP K45R nicht gezeigt werden (Abb. 22, rote Balken).

⁶ $\text{I}\kappa\text{B}\Delta$ ist eine dominant-negative Mutante von $\text{I}\kappa\text{B}$, die nicht mehr phosphoryliert und damit nicht mehr degradiert werden kann, was zur Blockierung der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung führt (Brown *et al.*, 1995; Traencker *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2000; Habib *et al.*, 2001).

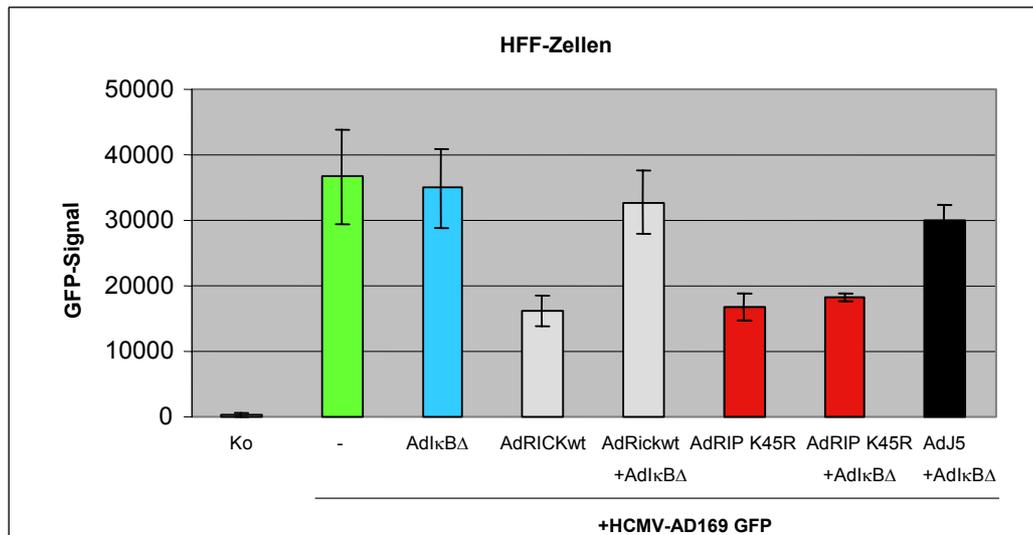


Abb. 22: Einfluss von $\text{IkB}\Delta$ auf die RIP K45R vermittelte Hemmung der HCMV-Replikation

HFF-Zellen (90% konfluent) wurden mit AdRIP K45R, AdRICKwt und AdJ5 alleine oder zusammen mit $\text{AdIkB}\Delta$ mit je 3000 Partikeln pro Zelle transduziert. 24h nach der Transduktion wurden die Zellen mit HCMV-Ad169 GFP (MOI 0,02) infiziert. 7d nach der HCMV-Infektion wurden die Zellen lysiert. Als Maß für die HCMV-Replikation wurde die GFP-Expression gemessen und quantifiziert (III, 2.9). Unbehandelte (Ko) und nur mit HCMV-AD169 GFP (grüner Balken) infizierte Zellen dienten als Kontrollen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten eines repräsentativen Tests von 4 voneinander unabhängigen Experimenten.

7. Antivirale Eigenschaften von RIP K45R

Überexprimiertes RICK induziert die Sekretion des Zytokins Interferon β , das in HFF-Zellen die HCMV-Replikation um ca. 50-60% hemmen kann (Eickhoff *et al.*, 2003). Da die Hemmung der HCMV-Replikation durch die Kinase-inaktive RIP-Mutante bislang nicht erklärt werden konnte, sollte überprüft werden, ob die Überexpression von RIP K45R ebenfalls zu einer Sekretion antiviral wirkender Faktoren führen könnte.

7.1 Effekt von RIP K45R auf die Sekretion von antiviralen Faktoren

Zur Beantwortung dieser Frage, wurden Sekretions-Experimente durchgeführt. Die Versuchsdurchführung des Sekretions-Experiments ist in Abb. 23A schematisch dargestellt. Donor-HFF-Zellen sind Zellen, deren Überstand verwendet wurde und Akzeptor-HFF-Zellen sind Zellen, die mit dem Überstand der Donor-Zellen inkubiert wurden. Die Donor-HFF-Zellen wurden mit

rekombinanten Adenoviren transduziert. Einen Tag nach der Transduktion wurden die Donor-Zellen mit HCMV-AD169wt infiziert. Der Überstand der Donor-HFF-Zellen wurde 8h nach der HCMV-Infektion auf bereits mit HCMV-AD169 GFP infizierte Akzeptor-HFF-Zellen transferiert. Der Zeitraum wurde entsprechend der Literaturangaben für die Hochregulation vieler antiviral wirkender Gene gewählt (Browne *et al.*, 2001). Mit den Akzeptor-HFF-Zellen wurde ein HCMV-Replikations-Test durchgeführt (III, 2.9).

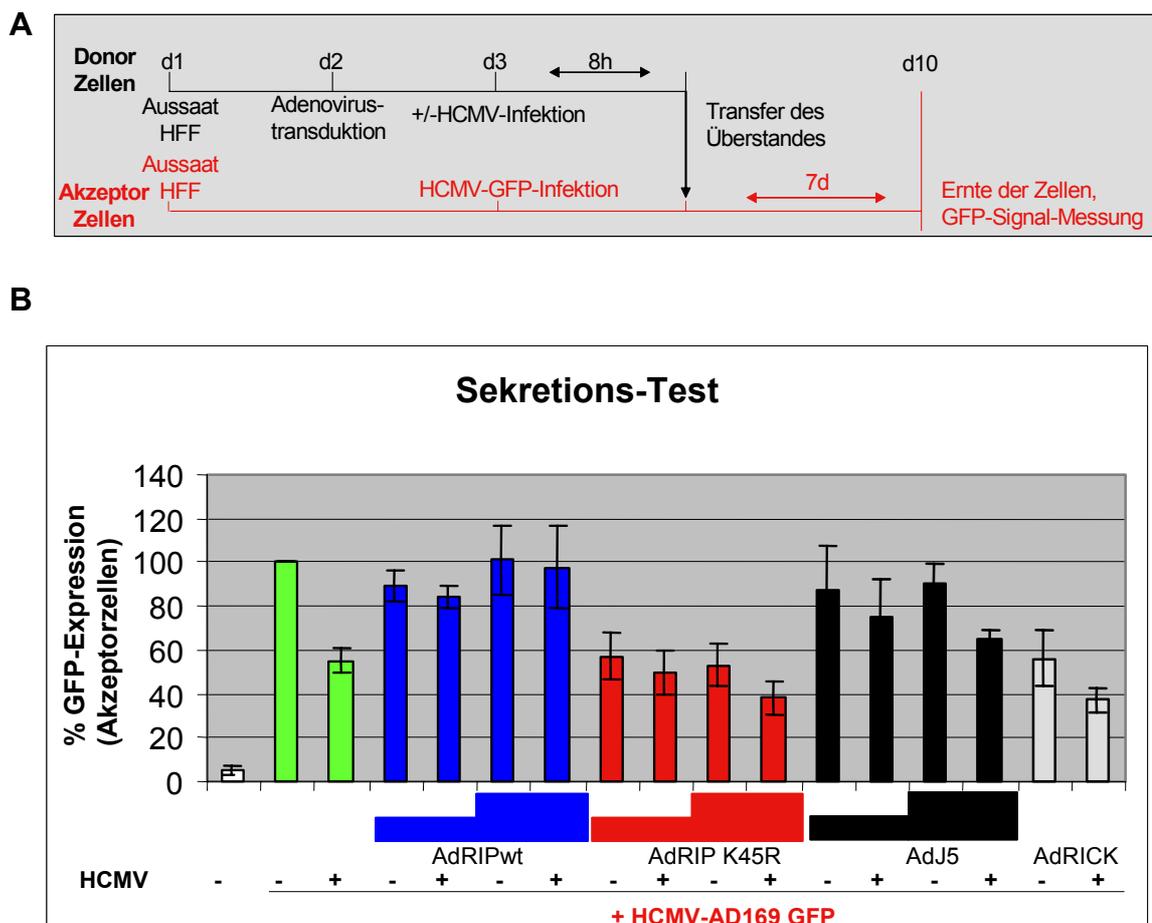


Abb. 23: Sekretions-Test

A: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung

An Tag 1 (d1) wurden Donor-HFF-Zellen (schwarz) und Akzeptor-HFF-Zellen (rot) so ausgesät, dass sie zu 90% konfluent waren. Die Donor-HFF-Zellen wurden einen Tag später (d2) mit rekombinanten Adenoviren (AdRIPwt, AdRIP K45R, AdRICKwt und AdJ5) mit je 1000 und 3000 Partikeln pro Zelle transduziert. 24h nach der Transduktion (d3) wurden die Donor-Zellen mit HCMV-AD169wt (MOI 0,03) infiziert. Der Überstand der Donor-HFF-Zellen wurde 8h nach HCMV-Infektion auf bereits mit HCMV-AD169 GFP (MOI 0,02) infizierte Akzeptor-HFF-Zellen (rot) in Duplikaten transferiert. 7d nach dem Transfer wurden die Akzeptor-Zellen lysiert. Anschliessend wurde das GFP-Signal als Maß für die HCMV-Replikation gemessen und quantifiziert (III, 2.9).

B: Der Sekretions-Assay wurde wie in A beschrieben durchgeführt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Akzeptor-Zellen (weißer Balken), nur mit HCMV-AD169 GFP

infizierte Akzeptor-Zellen (grüner Balken) und mit RICKwt transduzierte Zellen (grauer Balken). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Tests. Angegeben ist die GFP-Expression als % GFP-Expression. Dabei entsprechen die nur mit HCMV-AD169 GFP infizierten Zellen (grüner Balken) 100% GFP-Expression.

Die Überstände der mit RIP K45R transduzierten Zellen konnten die HCMV-Replikation um ca. 50% supprimieren, wobei dieser Effekt kaum dosisabhängig war. Die Hemmung der HCMV-Replikation war unabhängig von der HCMV-Überinfektion der Donor-Zellen (Abb. 23B, rote Balken). Die Überstände der mit RIPwt transduzierten Donor-Zellen konnten die HCMV-Replikation nicht hemmen (Abb. 23B, blaue Balken). Die HCMV-Infektion induzierte *per se* die Sekretion antiviraler Faktoren (Abb. 23B, grüne Balken).

Dies war ein erster Hinweis dafür, dass RIP1 die zelluläre, antivirale Immunantwort nach einer HCMV-Infektion durch die Hemmung der Sekretion antiviraler Faktoren beeinflussen könnte.

7.2 Identifizierung von potentiell antiviral wirkenden Faktoren

Mögliche antivirale Faktoren, die durch RIP1 gehemmt werden könnten, sollten in einem sogenannten „cDNA-Array“ gefunden werden. In einem „cDNA-Array“ konnte die Regulation vieler verschiedener Gene, deren cDNAs auf Filter aufgetragen waren, gleichzeitig untersucht werden⁷. Unter den auf den Filtern aufgetragenen cDNAs, befanden sich cDNAs, die für Zytokine, Metalloproteasen (MMP), zelluläre Kinasen und Transkriptionsfaktoren kodieren (III, 1.7). Für die Hybridisierungsproben wurde Gesamt-RNA aus HFF-Zellen isoliert, die mit rekombinanten Adenoviren (AdRIPwt, AdRIP K45R und AdJ5) transduziert worden waren. Die Gesamt-RNA wurde mittels reverser Transkription in Anwesenheit von radioaktiv markiertem $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP in cDNA umgeschrieben (III, 1.5). Die Filter wurden mit den radioaktiv markierten cDNA-Proben hybridisiert und die Schwärzung der einzelnen *Spots* wurde anschliessend im Phosphor Imager gemessen und quantitativ mit der Array Vision-Software (Imaging Research) ausgewertet (III, 1.7).

Die Tab. 24 zeigt eine Auswahl der Gene, die durch die Kinase-inaktive RIP-Mutante nicht aber durch RIPwt auf transkriptioneller Ebene reguliert wurden.

⁷ Zur Verfügung gestellt von S. Müller, Axxima Pharmaceuticals AG.

Auffallend war, dass besonders viele Zytokine (z.B. Interleukin-6 und Interleukin-8), deren antivirale Wirkung bereits beschrieben wurde, durch RIP K45R hochreguliert wurden (Murayama *et al.*, 1997; Bodaghi *et al.*, 1998; Saederup and Mocarski, 2002).

AdRIPwt		AdRIP K45R	
Gen	Regulation (x-fach)	Gen	Regulation (x-fach)
RIP1	18,1	MMP-1	76,0
IL-8	2,5	IL-8	54,3
PAK5	1,9	GRO-1	51,2
MCP-1	1,8	IL-1 β	24,7
		MMP-3	17,8
		MCP-1	15,1
		IL-6	13,0
		MMP-10	12,6
		MMP-12	8,8
		G-SCF	7,8
		fos	7,3
		RIP1	6,7
		COX2	4,2
		Inhibin β	4,1
		MMP-7	3,3
		CDC2	3,0
		PLK-1	2,7
		ASK-1/MEKK5	2,5
		MMP-9	2,3
		IL1R α	2,1
		Aurora Kinase	2,1
		Annexin	-2,1
		Ezrin	-2,2
		RSK3	-2,2
		TAP-2	-2,3
		ROCK2	-2,3
		Elongationsfaktor II	-2,4
		Mnk2	-2,7
		MLCK	-4,3

Tab. 24: „cDNA-Array“

Auf den verwendeten cDNA-Filtern⁸ waren ca. 1000 verschiedene cDNAs (Zytokine, zelluläre Kinasen, Metalloproteasen, Transkriptionsfaktoren) immobilisiert. Für die Hybridisierungsproben wurden HFF-Zellen mit AdRIPwt, AdRIP K45R und AdJ5 mit je 2000 Partikeln pro Zelle transduziert. 24h nach der Transduktion wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Jeweils 5 μ g Gesamt-RNA wurden in Anwesenheit von radioaktivem α^{33} P-dATP mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (III, 1.5). Die radioaktiv markierten cDNA-Sonden wurden wie in III, 1.7 beschrieben mit den cDNA-Filtern hybridisiert. Dargestellt ist die x-fache Regulation der Gene durch RIPwt oder RIP K45R bezogen auf die Regulation durch den Kontroll-Adenovirus AdJ5.

⁸ hergestellt von S. Müller, Axxima Pharmaceuticals AG

Erstaunlicherweise konnte die Kinase-inaktive RIP-Mutante sehr viele Zytokine transkriptionell hochregulieren, während RIPwt deren Transkription zu inhibieren schien. Deshalb sollte in ELISA-Tests auf Proteinebene untersucht werden, ob die hochregulierten Zytokine auch sezerniert wurden. Um möglichst viele Zytokine auf einmal testen zu können, wurde ein „Zytokin-Antikörper-Array“ durchgeführt. Mit Hilfe des „TranSignal™ Human Antibody Array“ (Biocat) konnten sechsunddreißig Zytokine gleichzeitig in einem ELISA-Test untersucht werden (III, 2.16). Die Anordnung der Antikörper auf dem Filter ist in Abb. 25B dargestellt. Die Zellkulturüberstände von HFF-Zellen, die wie in III, 2.7 beschrieben, mit rekombinanten Adenoviren transduziert und mit HCMV überinfiziert waren, wurden unverdünnt in den ELISA-Test eingesetzt (III, 2.16). Der Nachweis der sezernierten Zytokine erfolgte über Chemilumineszenz (Abb. 25C), die qualitativ ausgewertet wurde (Abb. 25D). In einer Western Blot-Analyse wurde vor dem ELISA-Test geprüft, welche Zellen äquivalente Mengen RIPwt und RIP K45R exprimierten (Abb. 25A).

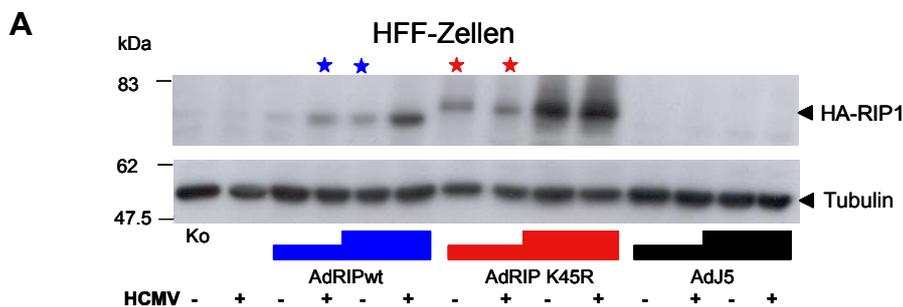


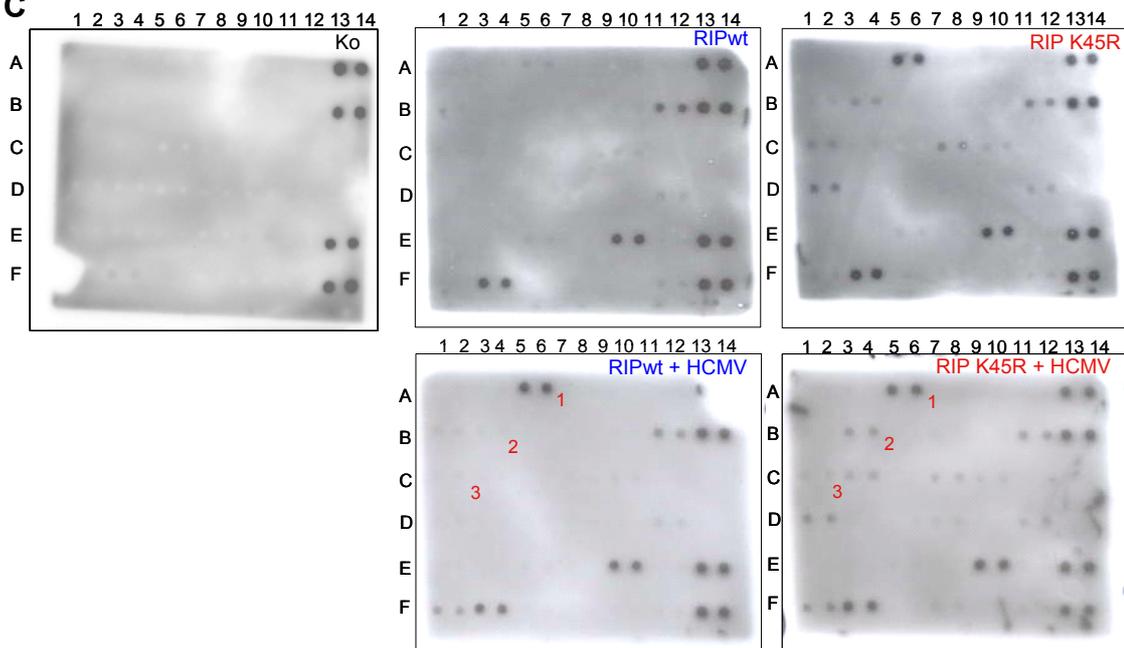
Abb. 25: Zytokin-ELISA („TranSignal™ Human Cytokine Antibody Array“)

A: Expressionskontrolle: Die Überstände der Proteinextrakte aus Abb. 25C wurden in einer Western Blot-Analyse eingesetzt (III, 1.9). Die Überexpression von RIPwt oder RIP K45R wurde mit einem HA-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Grössen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind links angegeben. Die Überstände der Proben, deren RIP-Expression gleich war (blaue Sterne = RIPwt; rote Sterne = RIP K45R), wurden in den Zytokin-ELISA eingesetzt.

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	Apol/Fas		Leptin		Rantes		ICAMP-1		IL-2		IL-7		pos	
B	CTLA		MIP1 α		TGF β		VCAMP-1		IL-3		IL-8		pos	
C	Eotaxin		MIP1 β		IFN γ		VEGF		IL-4		IL-10		neg	
D	GM-CSF		MIP4		TNF α		IL-1 α		IL-5		IL-12/p40		neg	
E	EGF		MIP5		TNFR1		IL-1β		IL-6		IL-15		pos	
F	IP-10		MMP3		TNFR2		IL-1Rα		IL-6R		IL-17		pos	

C



D

	pos	neg	1	2	3									
			Rantes	MIP1 α	IL-4	VEGF	MIP1 β	Eotaxin	GM-CSF	IL-12	IL-6	IP-10	MMP3	IL-17
Ko	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
RIPwt	+++	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+++	-	+++	-
RIP K45R	+++	-	+++	++	+	++	-	++	++	+	+++	+	+++	-
RIPwt+HCMV	+++	-	+++	-	+	-	-	-	-	+	+++	++	+++	-
RIPK45R+HCMV	+++	-	+++	++	+	++	++	++	++	+	+++	++	+++	-

+++ = > 20000 Pixel
++ = 15000 - 20000 Pixel
+ = 10000 - 15000 Pixel
- = 0 - 10000 Pixel

B: Anordnung der Zytokin-Antikörper auf den Filtern

Die Zytokin-Antikörper waren in Duplikaten nebeneinander aufgetragen. Rechts oben war zur Markierung ein Antikörper gegen Notch (= *house keeping* Gen) aufgetragen. Die Positivkontrollen (pos) bestanden aus an Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Streptavidin. Die Zytokine, die auf den cDNA-Filtern hochreguliert wurden, sind fett gedruckt (IV, 7.2; Tab. 24)

C: Zytokin-ELISA: HFF-Zellen wurden in Duplikaten mit rekombinanten Adenoviren (AdRIPwt, AdRIP K45R und AdJ5) mit je 1000 und 3000 Partikeln pro Zelle transduziert. 24h nach Transduktion wurde jeweils ein Ansatz mit HCMV-AD169wt

(MOI 0,02) infiziert. Einen Tag nach der HCMV-Infektion wurde das konditionierte Kulturmedium abgenommen und 2ml des Überstandes wurden unverdünnt auf die Filter gegeben (III, 2.16). Der Nachweis der gebundenen Zytokine erfolgte über Chemilumineszenz, die auf ECL-Hyperfilmen nachgewiesen wurde. Als Kontrolle wurde ein Filter mit dem Überstand von unbehandelten Zellen inkubiert (Ko). Die Zytokine RANTES (1), MIP-1 α (2) und Eotaxin (3) waren Beispiele für den Vergleich der Zytokin-Sekretion durch RIPwt und RIP K45R.

D: Qualitative Auswertung der Zytokin-Antikörper-Filter: Die Intensität der Schwärzung der Filter, die durch die unterschiedlich starke Chemilumineszenz der Zytokin-Antikörper verursacht wurde, wurde in vier Stufen eingeteilt. Die Schwärzung der Zytokin-Antikörper wurde dieser Einteilung zugeordnet. Die Zytokine, deren Antikörper die stärkste Schwärzung verursachten, wurden tabellarisch zusammengefasst.

Die Sekretion der Zytokine RANTES („Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted“; 1), MIP-1 α (Makrophagen-inflammtorisches Protein 1 α ; 2), und Eotaxin (3) konnte nur in Überständen RIP K45R exprimierender Zellen nicht aber in Überständen RIPwt exprimierender Zellen nachgewiesen werden (Abb. 25C und D). Die Sekretion von MIP-1 α und Eotaxin in RIP K45R-Überständen war unabhängig von der HCMV-Überinfektion (Abb. 25D). Wie bereits beschrieben, wurde die RANTES-Sekretion durch die HCMV-Infektion *per se* induziert (Michelson *et al.*, 1997; Bodaghi *et al.*, 1998; Cheeran *et al.*, 2001).

Für die weiteren Untersuchungen wurde eine Auswahl der Zytokine getroffen, für die bereits antivirale Wirkungen beschrieben wurden: MIP-1 α , RANTES, Eotaxin, Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) (Salazar-Mather *et al.*, 1998; Burns *et al.*, 1999; Mahalingam and Karupiah, 1999; Cheeran *et al.*, 2001; Randolph-Habecker *et al.*, 2002).

In Zytokin-spezifischen ELISA-Tests konnten die Ergebnisse des „Zytokin-Filter-Arrays“ für die Zytokine IL-6, MIP-1 α und RANTES bestätigt werden (III, 2.15; Tab. 26). Die Sekretion von IL-8 korrelierte mit der Hochregulation von IL-8 auf RNA-Ebene (IV, 7.2, Tab. 24 und Tab. 26).

Für die Zytokine RANTES und IL-8 konnten die Ergebnisse zusätzlich in einer TaqMan-PCR reproduziert werden⁹.

⁹ Die Ergebnisse der TaqMan-PCR wurden von S. Müller und M. Weber, Axxima Pharmaceuticals AG zur Verfügung gestellt.

Zytokin	Ko	+HCMV	AdRIPwt	AdRIPwt+HCMV	AdRIP K45R	AdRIP K45R+HCMV	AdJ5	AdJ5+HCMV
IL-6	265	567	51	718	1116	1121	64	289
IL-8	744	1397	591	2414	13466	12851	1218	374
MIP-1 α	10	33	10	100	1549	1690	11	12
RANTES	1	1970	6	2194	2619	2653	5	1938

Tab. 26: Zytokin-ELISA: RIPK45R vermittelte Sekretion von Zytokinen

HFF-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren (AdRIPwt, AdRIP K45R und AdJ5) in Duplikaten mit je 2000 Partikeln pro Zelle transduziert. 24h nach der Transduktion wurde je ein Ansatz mit HCMV-AD169wt (MOI 0,02) infiziert. 24h nach der HCMV-Infektion wurden die Überstände der Zellen abgenommen und zehnfach verdünnt in die Quantikine[®]-ELISA-Assays eingesetzt (III, 2.15). Zur Kontrolle wurde eine Verdünnungsreihe eines Zytokin-Standards mitgeführt, die die Zytokin-Konzentration in pg/ml einer bestimmten optischen Dichte zuordnete. Für die Auswertung wurden anhand der Standardkurve die Konzentrationen der Zytokine bestimmt. Dargestellt wurde die Konzentration der sezernierten Zytokine (in pg/ml) bezogen auf die Konzentration der Zytokine in unbehandelten Zellen (Ko)

7.3 Effekt von RIP K45R auf die transkriptionelle Regulation von Zytokinen

Die Expression von Zytokinen kann über die Aktivierung ihrer Promotoren und/oder die Stabilisierung ihrer mRNA reguliert werden (Holtmann *et al.*, 1999 und 2001; Winzen *et al.*, 1999). Um zu zeigen, dass RIP1 möglicherweise die Expression der Zytokine MIP-1 α , RANTES, Eotaxin, IL-6 und IL-8 über diese Mechanismen hemmen könnte, wurden Reporter-Experimente mit Zytokin-Promotoren und AU-reichen Regionen der Zytokine durchgeführt. Als Modell für die Untersuchung der Promotoraktivierung wurde der IL-8-Promotor¹⁰ aufgrund seiner guten Induktionseigenschaften ausgewählt. Die Reporter-Experimente wurden mit dem *firefly* Luziferase-Gen als Reporter in HFF-Zellen durchgeführt. Die sehr geringe Transfektionseffizienz in HFF-Zellen war dabei für den sensitiven Luziferase-Nachweis ausreichend. Sowohl der IL-8-Promotor-Wildtyp als auch Promotormutanten für die Bindestellen der Transkriptionsfaktoren NF κ B, AP-1 und NF-IL6 wurden getestet.

HFF-Zellen wurden mit dem IL-8-Reporterplasmid und Plasmiden für RIPwt oder RIP K45R transient transfiziert (III, 2.3). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Die Luziferase-Expression in den Überständen der

¹⁰ Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Kracht, Medizinische Hochschule, Hannover.

dem „Steadylite HTS Luminescence Reporter Gene Assay System“ eingesetzt (III, 2.10). Gezeigt wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Luziferase-Expression aus Duplikaten eines repräsentativen Experimentes von insgesamt 3 unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Ko).

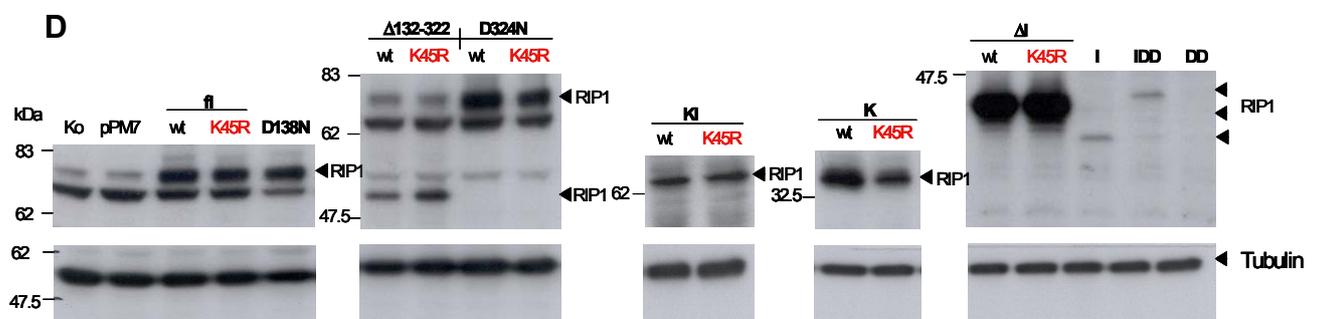
Die Domäne(n) von RIP1, die für die IL-8-Promotor-Aktivierung essentiell waren, sollten in Reporter-Experimenten mit verschiedenen RIP-Konstrukten gefunden werden. Eine Übersicht über die verwendeten RIP-Konstrukte, die jeweils als RIPwt- und als RIP K45R-Version getestet wurden, zeigt die Abb. 28A. HFF-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid für den IL-8-Promotor und den jeweiligen RIP-Konstrukten transient transfiziert (III, 2.3). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Überstände der Proteinextrakte in dem „Steadylite HTS Luminescence Reporter Gene Assay System“ eingesetzt. Anschliessend wurde die Luziferase-Expression gemessen und quantifiziert (III, 2.10; Abb. 28B). Eine qualitative Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abb. 28C dargestellt. Um sicherzustellen, dass die verschiedenen RIP-Konstrukte in äquivalenten Mengen exprimiert wurden, wurden Western Blot-Analysen mit einem RIP-Antikörper durchgeführt (III, 1.9) (Abb. 28D).

In HFF-Zellen waren die Kinase- und die Intermediärdomäne von RIP1 essentiell für die Aktivierung des IL-8-Promotors. Die maximale Aktivierung des IL-8-Promotors wurde durch die beiden Kinase-inaktiven RIP-Mutanten RIP K45R (volle Länge) und RIP D138N erreicht (Lee *et al.*, 2004; Abb. 28B und C). Allerdings konnte die Induktion von IL-8 durch RIP K45R nicht nur durch die Promotoraktivierung alleine erklärt werden, da IL-8 im „cDNA-Array“ um das 25fache hochreguliert wurde, während hier nur eine 3fache Hochregulation gezeigt werden konnte (IV, 7.2; Tab. 24). Zusätzlich zur transkriptionellen Regulation kann die Expression von Zytokinen auch durch die Stabilisierung ihrer mRNA über p38 reguliert werden (Holtmann *et al.*, 1999; Winzen *et al.*, 1999; Hoffmann *et al.*, 2002; Frevel *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob ein Teil der Induktion der IL-8-Expression durch RIP K45R durch mRNA-Stabilisierung verursacht wurde. Reporter-Analysen mit der nicht-translatierten 3'UTR-Region der IL-8-mRNA konnten allerdings zeigen, dass RIP K45R die IL-8-mRNA nicht stabilisierte (Daten nicht gezeigt).

C

RIP-Konstrukt	wt	K45R
fl	+	+++
K	-	-
KI	++	++
I	++	nd
IDD	+	nd
DD	-	nd
ΔI	-	-
$\Delta 132-322$	-	-
D324N	-	-
D138N	+++	nd

+++ = starke Induktion des IL-8-Promoters (> zweifach)
 ++ = moderate Induktion des IL-8-Promoters (ein- bis zweifach)
 - = keine Induktion des IL-8-Promoters



C: Qualitative Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Tabelle zeigt die qualitative Auswertung der Induktion des IL-8-Promoters durch die jeweiligen RIP-Konstrukte aufgeteilt in RIPwt- und RIP K45R-Konstrukte. Abkürzungen: nd = nicht determinierbar (Konstrukte die keine Kinasedomäne haben)

D: Expressionskontrolle: HEK293-Zellen wurden mit je 4µg DNA des jeweiligen RIP-Konstrukts (siehe A) und 1µg DNA von pPM7-CrmA transient transfiziert (III, 2.3). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde ein Ansatz mit 0,5µg DNA des GFP-Plasmids EGFP-N2 transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteinextrakte in einer Western Blot-Analyse eingesetzt (III, 1.9). Die RIP-Konstrukte wurden mit dem StrepTactin-Antikörper oder dem RIP1-Antikörper spezifisch nachgewiesen. Die Grössen und molekularen Massen (kDa) des Proteinstandards sind links angegeben. RIP DD konnte auch nach Immunpräzipitation nicht detektiert werden.

7.4 Effekt von IL-8, MIP-1α und RANTES auf die HCMV-Replikation

Am Modell des IL-8-Promoters konnte gezeigt werden, dass die Expression und Sekretion der Zytokine MIP-1α, RANTES, IL-6 und IL-8 möglicherweise über die Interaktion der RIP1-Kinase- und Intermediärdomäne mit Zytokin-Promotoren gehemmt werden könnte. Für einige inflammatorische Zytokine wie TNFα, Interferon γ (IFNγ) und IL-1β war bereits gezeigt, dass sie die HCMV-

Replikation hemmen (Miller *et al.*, 1999; Cheeran *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2000). Die Zytokine MIP-1 α , RANTES, IL-6 und IL-8 sollten in HCMV-Replikations-Experimenten getestet werden, ob sie die HCMV-Replikation *per se* hemmen konnten. Die Replikations-Tests wurden in Anwesenheit von rekombinanten Zytokinen durchgeführt (III, 2.9). Dazu wurden HFF-Zellen 24h vor der HCMV-Infektion mit verschiedenen Konzentrationen rekombinanter Zytokine inkubiert. Die Konzentrationen der rekombinanten Zytokine wurden so gewählt, dass die sezernierten Mengen der Zytokine aus den spezifischen ELISA-Tests (IV, 7.2; Tab. 26) mit eingeschlossen waren. Sieben Tage nach der HCMV-Infektion wurde die GFP-Fluoreszenz, die mit der HCMV-Replikation korrelierte, gemessen und quantitativ ausgewertet (III, 2.9).

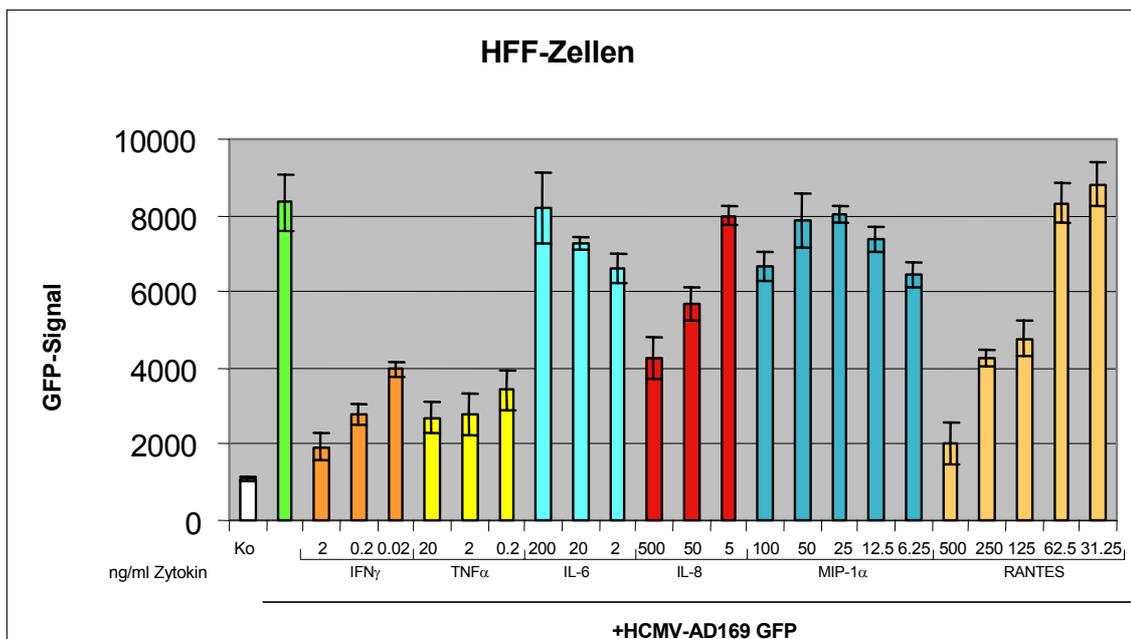


Abb. 29: Effekt von rekombinanten Zytokinen auf die HCMV-Replikation

24h vor der HCMV-Infektion mit HCMV-AD169 GFP (MOI 0,02) wurden HFF-Zellen mit rekombinanten, humanen Zytokinen in verschiedenen Konzentrationen (angegeben in ng/ml) präinkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit IFN γ und TNF α präinkubiert (Cheeran *et al.*, 2000). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (Ko). Zur Kontrolle der maximalen HCMV-Replikation wurden Zellen mit HCMV infiziert (grüner Balken). Sieben Tage nach der HCMV-Infektion wurden die Zellen lysiert. Die GFP-Expression wurde gemessen und quantifiziert (III, 2.9). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus Duplikaten eines repräsentativen Replikations-Experiments von 3 unabhängigen Experimenten.

Wie bereits beschrieben, konnten IFN γ und TNF α die HCMV-Replikation dosisabhängig hemmen (Miller *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2000; Cheeran *et al.*,

2000 and 2001). Während die HCMV-Replikation durch IL-6 und MIP-1 α nicht gehemmt werden konnte, konnten rekombinantes IL-8 und RANTES die HCMV-Replikation dosisabhängig supprimieren (Abb. 29).

Dieses Ergebnis liess vermuten, dass RIP1 die Expression und Sekretion von RANTES und IL-8 während der HCMV-Replikation eventuell über die Bindung an deren Promotoren hemmen könnte.

V Diskussion

Die aktuell verwendeten Medikamente gegen HCMV wie Ganciclovir, Cidofovir, Foscarnet und Fomivirsen, können aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen nicht bei allen Patientengruppen eingesetzt werden. Ausserdem hat die stete Zunahme an immunsupprimierten Patienten, die eine anti- β -herpesvirale Langzeittherapie benötigen, die Bildung resistenter HCMV-Stämme begünstigt (Villareal, 2003). Daher ist die Entwicklung neuer antiviraler Therapien, die nicht zur Selektion resistenter Viren beitragen, dringend notwendig. Die Idee der vorliegenden Arbeit basierte auf dem Ansatz, zelluläre Proteinkinasen zu hemmen, die essentiell für eine produktive HCMV-Infektion sind (Emery and Hassan-Walker, 2002; Cohen, 2002, Coen and Schaffer, 2003). Für die Proteinkinase RIP2, auch bekannt als RICK, ein Mitglied der zellulären RIP-Proteinkinase-Familie, konnte bereits gezeigt werden, dass dessen Hochregulation nach der HCMV-Infektion Teil eines neuen NF κ B und Interferon- β abhängigen antiviralen Signalwegs ist (Eickhoff *at al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von RIP1, einem weiteren Mitglied der RIP-Familie, für die HCMV-Infektion verifiziert. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind in der Tab. 30 zusammengefasst und werden im Folgenden diskutiert.

Effekt auf	durch	
	RIPwt	RIP K45R
HCMV-Replikation (HFF)	-	++
NF κ B - HCMV	-	+
Sekretion antiviraler Faktoren	-	++
Transkription von IL-8 - HCMV	-	++
Transkription von IL-8 + HCMV	-	++
Sekretion von IL-8 - HCMV	+	+++
Sekretion von IL-8 + HCMV	++	+++
IL-8-Promotor	+	+++
Transkription von RANTES -HCMV	-	+
Transkription von RANTES +HCMV	+	+++
Sekretion von RANTES - HCMV	-	+++
Sekretion von RANTES + HCMV	+++	+++

Tab. 30: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit
 In der Tab. 30 sind nur die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefasst, bei denen unterschiedliche Effekte von RIPwt und Kinase-inaktivem RIP K45R gezeigt werden konnten. Die Effekte werden im folgenden Text (V, 1-3) diskutiert.
 Zeichenerklärung: - = kein Effekt; + = geringer Effekt; ++ = starker Effekt; +++ = sehr starker Effekt

1. Eine Kinase-inaktive RIP1-Mutante hemmt die HCMV-Replikation

Die bereits in der Literatur beschriebene Hochregulation der Expression der RIP1-Kinase nach der HCMV-Infektion, konnte sowohl in HFF- und als auch in U373-Zellen bestätigt werden (Browne *et al.*, 2001; IV, 1.1, Abb. 10 und 1.4, Abb. 13). In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Kinase-Aktivität von RIP1 für die HCMV-Replikation in HFF-Zellen notwendig sein könnte, da die Überexpression der Kinase-inaktiven RIP1-Mutante RIP K45R in HCMV-Replikations-Tests zur Hemmung der HCMV-Replikation führte (IV, 1.2, Abb. 11A). Die Frage, warum die Überexpression von RIPwt nicht zu einer vermehrten HCMV-Produktion führte, konnte bislang nicht beantwortet werden. Parallel durchgeführte HCMV-Replikations-Tests in U373-Zellen zeigten, dass RIP1 in Astrozyten nicht notwendig für die HCMV-Replikation war (IV, 1.5, Abb. 14A). Damit schien RIP1 nur zelltypspezifisch in HFF-Zellen

wichtig für die HCMV-Replikation zu sein. Für die HCMV-Infektion ist bereits bekannt, dass in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Effekte ausgelöst werden können, z.B. durch unterschiedliche Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Mocarski and Courcelle, 2001). Das gilt wahrscheinlich auch für den Effekt von RIP1 auf die HCMV-Replikation.

In HFF-Zellen konnte gezeigt werden, dass anscheinend die Kinase-Aktivität von RIP1 für die Aktivierung der HCMV-IE-Proteine notwendig ist (IV, 1.2, Abb. 11B). Da die HCMV-IE-Proteine essentiell für die Aktivierung der viralen Gentranskription und DNA-Replikation sind, könnte dies eine mögliche Erklärung für die Hemmung der HCMV-Replikation durch RIP K45R sein (Mocarski and Courcelle, 2001). Allerdings konnte anhand von Reporteranalysen mit dem HCMV-IE-Promotor in verschiedenen Zellsystemen (HFF, U373, HeLa) gezeigt werden, dass sowohl der Wildtyp von RIP1 als auch Kinase-inaktives RIP1 den HCMV-IE-Promotor aktivieren konnten (IV, 3.2, Abb. 17). Damit konnte die Hemmung des HCMV-Promotors als Ursache für die Supprimierung der HCMV-Replikation durch RIP K45R ausgeschlossen werden.

Da der Unterschied zwischen der Kinase-inaktiven Mutante und dem Wildtyp von RIP1 nur in einer Punktmutation K→R in der Kinasedomäne bestand, wurde vermutet, dass die Kinasedomäne ausreichend für die Hemmung der HCMV-Replikation durch RIP K45R sein könnte. In HCMV-Replikations-Tests konnte die Kinasedomäne von RIP K45R alleine die HCMV-Replikation im Gegensatz zu RIP K45R in voller Länge nicht hemmen (IV, 1.2, Abb. 12A).

Dieses Ergebnis liess vermuten, dass nicht alleine die Kinase-Aktivität von RIP1, und die damit verbundene Phosphorylierung möglicher viraler oder zellulärer Substrate, sondern wahrscheinlich auch die Bindung dieser Substrate an die Intermediär- und/oder die *Death*domäne, wichtig für die HCMV-Replikation sein könnte. Aus bislang nicht geklärten Gründen, gelang es leider nicht, weitere RIP1-Konstrukte als rekombinante Adenoviren herzustellen und in HCMV-Replikations-Tests einzusetzen (aufgeführt in II, 12.).

Die Bedeutung von RIP1 für die HCMV-Infektion konnte nicht nur genetisch durch den Einsatz einer Kinase-inaktiven RIP1-Mutante, sondern auch chemisch mit Hilfe von RIP1-Kinase-Inhibitoren gezeigt werden (IV, 2, Abb. 15B). In weiteren Experimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass die

hier verwendeten „RIP1-Inhibitoren“ sowohl die RIP1-Kinase-Aktivität als auch die MAP Kinase p38 aufgrund der Grösse und Struktur ihrer ATP-Bindungstaschen hemmen konnten¹. Deshalb eigneten sie sich nicht als spezifische RIP1-Inhibitoren. Es lohnt sich allerdings, weitere spezifischere RIP1-Kinase-Inhibitoren zu entwickeln, da die HCMV-Replikation gerade von den Inhibitoren gehemmt wurde, die nicht besonders spezifisch die MAP Kinase p38 inhibieren konnten¹.

2. RIP1 hat keinen Einfluss auf einige wesentliche Zellfunktionen und zelluläre Signaltransduktionswege während der HCMV-Infektion

HCMV hat zahlreiche Strategien entwickelt, um den Ablauf des Apoptose-Programms in infizierten Zellen zu inhibieren (Goldmacher *et al.*, 1999; Mocarski and Courcelle, 2001). Da RIP1 relevant für die Induktion von Apoptose und für den nekrotischen Zelltod ist, wurde vermutet, dass Kinase-inaktives RIP1 die physiologischen Eigenschaften der Zelle wie Wachstum und Apoptose beeinflussen konnte (Stanger *et al.*, 1995; Santoro *et al.*, 2003). Vorläufige Ergebnisse der Apoptose-Tests zeigten allerdings keine veränderte Caspase-Aktivität in RIP K45R transduzierten HFF-Zellen. Um eine differenziertere Aussage treffen zu können, müssten die Ergebnisse zur Apoptose auf Einzelzellebene verifiziert werden. Die Wachstumskurven der Zellen, die RIPwt oder RIP K45R exprimierten, waren nahezu identisch, so dass verändertes Zellwachstum und damit prinzipiell auch Apoptose und Nekrose als Grund für die Hemmung der HCMV-Replikation durch Kinase-inaktives RIP weitgehend ausgeschlossen werden konnten (IV, 4.1, Abb. 18). Die Phosphorylierung einer zellulären Kinase kann essentiell für deren korrekte Faltung und Lokalisation sein (Papa *et al.*, 2003). Für RIP1 würde das bedeuten, dass die Kinase-inaktive RIP-Mutante falsch gefaltet oder lokalisiert sein könnte. In Ko-Immünpräzipitationen mit verschiedenen RIP-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass sowohl RIPwt als auch RIP K45R Dimere bzw. Oligomere bilden konnten. Für die Dimerisierung oder Oligomerisierung der RIP-Proteine schien die Deathdomäne nicht notwendig zu sein (IV, 5, Abb. 20). Über die Faltung von RIP K45R liess sich mit diesen Ergebnissen

¹ D. Hafenbradl, Axxima Pharmaceuticals AG

allerdings keine Aussage treffen. Möglich wäre aber, dass RIP K45R unterschiedlich gefaltet ist, da sich die apparente molekulare Masse in Western Blot-Analysen um ca. 5-10kDa von der des Wildtyps unterschied (IV, 1.2, Abb. 11B und 1.5, Abb. 14B).

Vorläufige Ergebnisse zur intrazellulären Lokalisation von RIP1 zeigten, dass sowohl RIPwt und als auch RIP K45R diffus im Zytoplasma verteilt sind (IV, 4.2, Abb. 19). Für eine genaue subzelluläre Lokalisation müssten noch Kolokalisationsexperimente mit Markerproteinen für die einzelnen Zellkompartimente durchgeführt werden. Aus den vorliegenden Daten konnte keine abschliessende Aussage zur Lokalisation der Kinase-inaktiven RIP-Mutante getroffen werden.

Da für RIP1 beschrieben ist, dass es an wichtigen, zellulären Signaltransduktionswegen, wie dem NF κ B-Signalweg und den MAP Kinase-Signalwegen beteiligt ist (siehe I, 2.3.2), wurde vermutet, dass durch die Kinase-inaktive RIP-Mutante für die HCMV-Replikation wichtige zelluläre Signalwege gehemmt werden könnten (I, 2). In Western Blot-Analysen mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gegen die drei zellulären MAP Kinasen ERK1 und ERK2, c-Jun und p38, konnte aber gezeigt werden, dass die untersuchten MAP Kinase Signalwege für die RIP K45R vermittelte Hemmung der HCMV-Replikation nicht relevant sind (IV, 6.1).

Anders als für RIP2 (RICK), für das beschrieben wurde, dass die durch RICK verursachte Supprimierung der HCMV-Produktion über die Aktivierung von NF κ B vermittelt wird (Eickhoff *et al.*, 2003), konnte dies für RIP K45R nicht gezeigt werden (IV, 6.2, Abb. 21 und 22). Eine mögliche Erklärung für diese zur bestehenden Literatur konträren Ergebnisse könnten einerseits die unterschiedlichen Zellsysteme, die verwendet wurden, sein (primäre HFF-Zellen versus RIP^{-/-} MEF). Andererseits könnte auch der Gebrauch verschiedener Versuchsmethoden Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse sein (Adenovirus-Transduktion versus stabile Transfektion) (Kelliher *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; Devin *et al.*, 2003).

Nach wie vor besteht die Möglichkeit, dass andere zelluläre Signalwege, die essentiell für die HCMV-Replikation sind, z.B. der PKC-vermittelte Signalweg, der PI3-Signalweg, die Aktivierung von NF κ B über radikale Sauerstoffspezies

oder der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, durch RIP K45R gehemmt werden können (Fortunato *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001b; Santoro *et al.*, 2003). Neueren Publikationen zufolge ist RIP1 über die Bindung an TLR-3 und TLR-4 für die zelluläre Immunantwort essentiell (Vivarelli *et al.*, 2004; Meylan *et al.*, 2004). Die Funktion von RIP1 für die antivirale zelluläre Immunantwort wurde allerdings nicht diskutiert. Da die TLR-induzierten Signalwege nahezu alle in der Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ münden und für RIP1 gezeigt wurde, dass die Hemmung der HCMV-Replikation $\text{NF}\kappa\text{B}$ -unabhängig ist, ist es unwahrscheinlich, dass die Aktivierung antiviraler Faktoren über die Induktion der TLR-Signalwege erfolgt (Compton *et al.*, 2003; Meylan *et al.*, 2004; Vivarelli *et al.*, 2004; IV, 6.2, Abb. 21 und 22).

3. RIP1 hemmt die Induktion inflammatorischer Zytokine

Überexprimiertes RICK induziert die Sekretion des Zytokins Interferon- β , das in HFF-Zellen die HCMV-Replikation um ca. 50-60% hemmen kann (Eickhoff *et al.*, 2003). Da die Hemmung der HCMV-Replikation durch die Kinase-inaktive RIP-Mutante bislang nicht erklärt werden konnte, wurde vermutet, dass die Überexpression von RIP K45R ebenfalls zu einer Sekretion antiviral wirkender Faktoren führen könnte. In Sekretions-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Überstände der mit RIP K45R transduzierten Zellen die HCMV-Replikation um ca. 50% hemmen konnten. Die Überstände von RIPwt transduzierten Zellen schienen die Virus-Produktion sogar in geringem Maß zu induzieren (IV, 7.1, Abb. 23B). Dies war der erste Hinweis darauf, dass RIP1 die antivirale zelluläre Immunantwort nach einer HCMV-Infektion durch die Hemmung der Sekretion antiviraler Faktoren beeinflussen könnte.

Mit Hilfe eines so genannten „cDNA-Array“ konnten viele inflammatorische zelluläre Gene gefunden werden, die auf transkriptioneller Ebene durch RIPwt und RIP K45R reguliert wurden. Erstaunlicherweise konnte die Kinase-inaktive RIP-Mutante sehr viel mehr Gene transkriptionell „hochregulieren“, während RIPwt deren Transkription zu inhibieren schien (IV, 7.2, Tab. 24). Auffallend war ausserdem, dass besonders viele Zytokine, deren antivirale Wirkung bereits beschrieben wurde, durch RIP K45R „induziert“ wurden (Murayama *et al.*, 1997; Bodaghi *et al.*, 1998; Saederup and Mocarski, 2002). In Zytokin-

ELISA-Tests konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass die Sekretion der Zytokine RANTES, MIP-1 α , IL-6, IL-8 und Eotaxin nur in Überständen RIP K45R exprimierender Zellen nachgewiesen werden konnte (IV, 7.2, Abb. 25C und D und Tab. 26). Dies war ein weiterer Hinweis dafür, dass RIP1 möglicherweise die zelluläre Immunantwort auf die HCMV-Infektion durch die Hemmung der Induktion antiviraler Zytokine unterdrücken kann.

Die weiteren Experimente wurden mit Zytokinen durchgeführt, für die bereits antivirale Wirkungen beschrieben wurden: MIP-1 α , RANTES, Eotaxin, IL-6 und IL-8 (Burns *et al.*, 1999; Randolph-Habecker *et al.*, 2002). MIP-1 α beispielsweise ist in MCMV infizierten Mäusen sowohl für die protektive als auch für die inflammatorische Antwort der Leber zuständig (Salazar-Mather *et al.*, 1998). RANTES kann als natürlicher Ligand des HIV-Ko-Rezeptors CCR5 die Bindung des HI-Virus an CD4⁺-Zellen kompetitiv hemmen (Cocchi *et al.*, 1995, Schols, 2004; Mills and DeMartino, 2004). In Astrozyten konnte IL-8 im Zusammenhang mit HCMV bislang nicht mit antiviraler Aktivität in Verbindung gebracht werden (Cheeran *et al.*, 2001). Es wurde sogar gezeigt, dass IL-8 als Gegenspieler der IFN α -vermittelten zellulären Immunantwort wirken kann (Mahalingham and Karupiah, 1999).

3.1 RIP1 hemmt die Induktion des IL-8-Promotors

Obwohl IL-8 in anderen Zellsystemen bislang nicht in Zusammenhang mit antiviraler Aktivität gegen HCMV gebracht werden konnte (Cheeran *et al.*, 2001), war IL-8 eines der Zytokine, die durch RIP K45R sehr stark „induziert“ wurden (IV, 7.2, Tab. 24 und Tab. 26). Die Expression von Zytokinen kann über die Aktivierung ihrer Promotoren und/oder die Stabilisierung ihrer mRNA reguliert werden (Holtmann *et al.*, 1999 und 2001; Winzen *et al.*, 1999). Am Modell des IL-8-Promotors² konnte gezeigt werden, dass die Expression und Sekretion der Zytokine MIP-1 α , RANTES, IL-6 und IL-8 möglicherweise über die Interaktion der RIP1-Kinase- und Intermediärdomäne mit Zytokin-Promotoren gehemmt werden könnte (IV, 7.3, Abb. 27). Reporter-Experimente, die mit IL-8-Promotorplasmiden durchgeführt wurden, in denen

² Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Kracht, Medizinische Hochschule, Hannover.

die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mutiert waren³, konnten ausserdem zeigen, dass die NF κ B- und die AP-1-Bindestellen essentiell für die IL-8-Promotor-Aktivierung in HFF-Zellen waren. Der Effekt von RIP K45R auf die IL-8-Promotor-Aktivierung schien zelltypspezifisch für HFF-Zellen zu sein. In allen anderen getesteten Zellsystemen (U373-, HEK293- und HeLa-Zellen) konnte kein Unterschied in der Aktivierung des IL-8-Promotors gezeigt werden. Möglicherweise konnte RIP1 die Aktivierung der IL-8-Transkription und die damit verbundene Aktivierung der antiviralen zellulären Immunantwort ausschliesslich in HFF-Zellen hemmen. Da noch viele weitere Zytokine durch RIP K45R „aktiviert“ werden konnten (siehe IV, 7.2, Tab. 24), bleibt zu prüfen, ob auch die anderen Zytokinpromotoren durch RIP1 gehemmt werden können.

3.2 IL-8 und RANTES supprimieren die HCMV-Replikation

Für einige inflammatorische Zytokine wie TNF α , Interferon γ (IFN γ) und IL-1 β wurde bereits gezeigt, dass sie die HCMV-Replikation hemmen (Miller *et al.*, 1999; Cheeran *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2000). Anhand von HCMV-Replikations-Tests in Anwesenheit von rekombinanten Zytokinen (MIP-1 α , RANTES, IL-8 und IL-6) konnte gezeigt werden, dass sowohl rekombinantes IL-8 als auch rekombinantes RANTES die HCMV-Replikation dosisabhängig supprimierten (IV, 7.4, Abb. 29). Dieses Ergebnis bestätigte wiederum die These, dass RIP1 die Induktion antiviral wirkender Zytokine wie z.B. RANTES und IL-8 hemmen könnte und so eine Aktivierung der antiviralen Immunantwort verhindern könnte. RANTES konnte die HCMV-Infektion wesentlich stärker hemmen als IL-8 (IV, 7.4, Abb. 29). Dies Ergebnis liess auf eine Kombination mehrerer Zytokine schliessen, welche die HCMV-Replikation supprimieren können. Vorläufige Ergebnisse aus Experimenten, in denen die Prä-Inkubation mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-8 und RANTES nicht zu einer Revertierung der RIP K45R vermittelten Hemmung der HCMV-Replikation führte, scheinen diese These zu bestätigen.

³ freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Kracht, Medizinische Hochschule, Hannover (II,12)

4. Vorläufiges Modell der Rolle der RIP1-Kinase für die HCMV-Replikation

Die Abb. 30 zeigt ein vorläufiges Modell für die Rolle von RIP1 während der HCMV-Replikation, das im Folgenden erläutert wird. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten deuteten darauf hin, dass die Hochregulation von RIP1 während der HCMV-Infektion, die antivirale Immunantwort durch die Hemmung der Transkription und Sekretion einiger Zytokine, wie z.B. RANTES und IL-8, beeinflussen könnte (IV, 7.3, Abb. 27 und 28b). Die Expression der Kinase-inaktiven RIP-Mutante RIP K45R führte wahrscheinlich über einen „dominant-negativen“ Effekt auf endogenes RIP1 über einen bislang nicht geklärten Signalweg zu einer „Aktivierung“ der Expression antiviraler Zytokine (IV, 5, Abb. 20). Es müssten weitere zelluläre Substrate von RIP1 identifiziert werden, um herauszufinden, an welchen anderen Signalwegen RIP1 beteiligt ist. Die Transkription und Sekretion der antiviralen Zytokine wie z.B. IL-8, RANTES und MIP-1 α führte wahrscheinlich über die Hemmung der HCMV-Proteine IE1/2 zu einer Hemmung der HCMV-Replikation (IV, 1.2, Abb. 11b; V, 4, Abb. 30). Vorläufige Daten aus Experimenten mit RIP^{-/-}-Mausfibroblasten (MEF) stützten diese Theorie. Auch wenn HCMV nur an MEF-Zellen andocken und sich in ihnen nicht replizieren konnte, so führte allein die Bindung von HCMV zu einer Hochregulation von RIP1 (Mocarski and Courcelle, 2001). In murinen Kontrollfibroblasten führte die HCMV-Infektion zu einer deutlichen Hemmung der Sekretion des Zytokins RANTES, während in RIP^{-/-}-MEF eine dosisabhängige Induktion beobachtet wurde. Es bleibt zu prüfen, ob die Komplementierung der RIP^{-/-}-MEF mit RIP^wt zu einer Hemmung der RANTES-Sekretion führt. RANTES gehört zur Zytokin-Subfamilie der Chemokine und wird direkt nach der HCMV-Infektion induziert. Im Verlauf der Infektion wird es durch einen viral kodierten Chemokin-Rezeptor HCMV-US28 neutralisiert, der CC-Chemokine wie RANTES bindet. HCMV-US28 aktiviert den PLC- und den NF κ B-Signalweg, um eine Feinmodulation der zellulären Immunantwort zu induzieren, die für die Virus-Replikation notwendig ist (Michelson *et al.*, 1997; Bodaghi *et al.*, 1998; Casarosa *et al.*, 2001 and 2003; V, 4, Abb. 30). In HCMV-Replikations-Tests mit einem Δ US28-Virus bleibt zu prüfen, ob RIP1 die Bindung von RANTES an HCMV-US28 beeinflussen kann (Casarosa *et al.*,

2003). Vorläufige Ergebnisse aus Versuchen mit U373-Zellen, die den zellulären RANTES-Rezeptor CCR5 konstitutiv überexprimierten (U373 Magi CCR5), zeigten, dass die Expression von RIP K45R zu einer dosisabhängigen Hemmung der HCMV-Replikation führte, während die Expression von RIPwt keinen Effekt auf die Replikation hatte. Der Rezeptor CCR5 könnte also mit RIP1 interagieren und an der Hemmung der Induktion von Zytokinen z.B. RANTES und IL-8 während der HCMV-Infektion beteiligt sein (V, 4, Abb. 30).

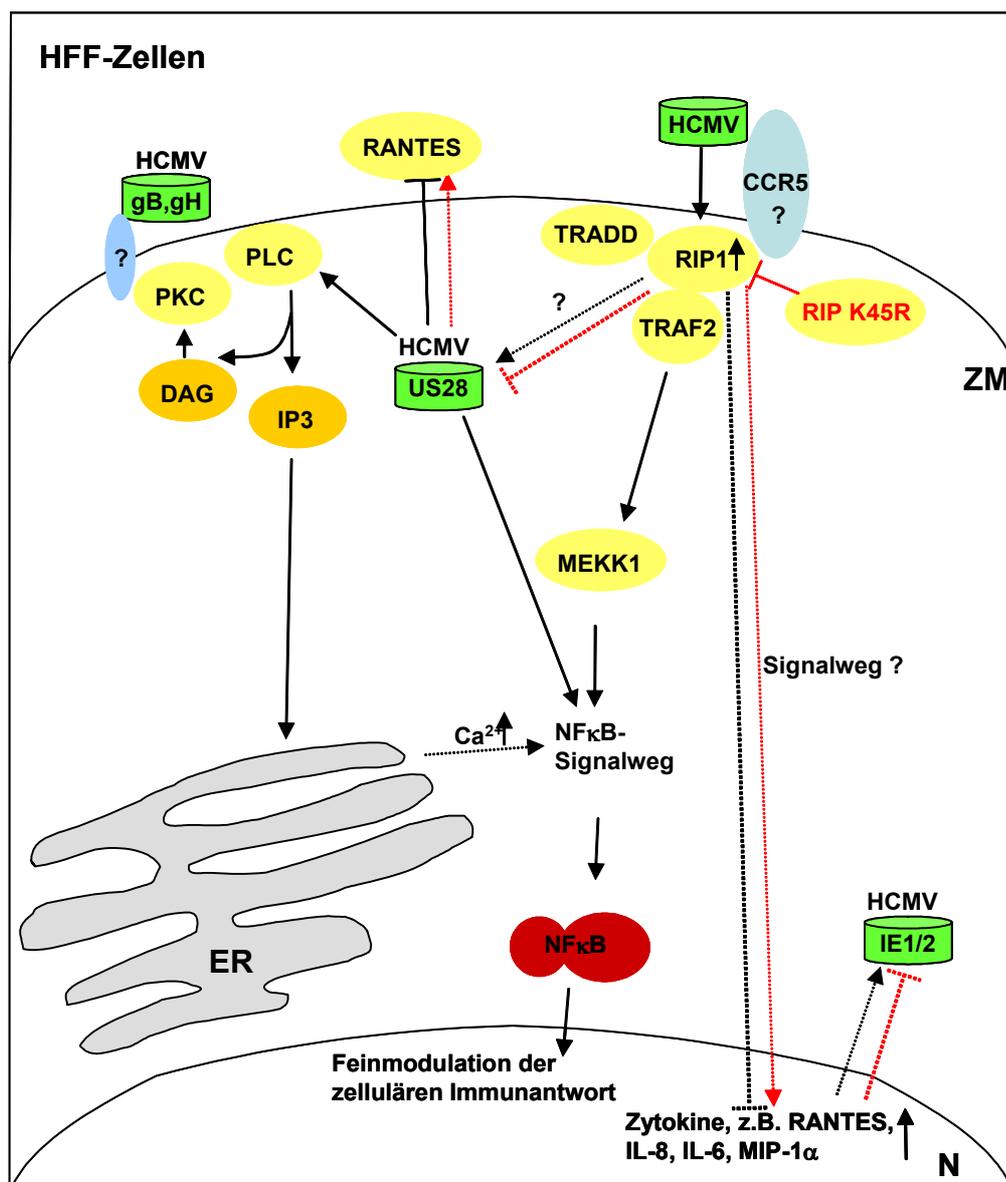


Abb. 30: Vorläufiges Modell der Rolle der RIP1-Kinase für die HCMV-Infektion

In HFF-Zellen führt die HCMV-Infektion zu einer Hochregulation der RIP1-Kinase. Die Überexpression von RIP1 führt über einen bislang nicht bekannten Signalweg zur Hemmung der Transkription und Sekretion von antiviralen Zytokinen, u.a. IL-8, RANTES und MIP-1 α . Eventuell ist an dieser Hemmung der Chemokinrezeptor CCR5

beteiligt. Die schwarzen Pfeile und Blockierungszeichen zeigen mögliche Wege, wie RIP1 auf die Transkription antiviraler Zytokine Einfluss nehmen könnte. Die Expression von RIP K45R führt wahrscheinlich über einen „dominant-negativen“ Effekt auf endogenes RIP1 zu einer „Aktivierung“ der Expression antiviraler Zytokine. Die Transkription und Sekretion der antiviralen Zytokine, u.a. RANTES und IL-8, führt möglicherweise über die Hemmung der Expression der HCMV-IE-Proteine zu einer Hemmung der HCMV-Replikation. Die roten Pfeile und Blockierungszeichen zeigen die Hemmung oder Aktivierung durch RIP K45R. Das Chemokin RANTES wird direkt nach der HCMV-Infektion induziert. Im Verlauf der Infektion wird es durch den viral kodierten Chemokin-Rezeptor HCMV-US28 neutralisiert, der CC-Chemokine wie RANTES bindet. HCMV-US28 aktiviert den PLC- und den NF κ B-Signalweg, um eine Feinmodulation der zellulären Immunantwort zu induzieren, die für die Virus-Replikation notwendig ist (Michelson *et al.*, 1997). Alle Abkürzungen ausser den folgenden sind im Kapitel I in der Abb. 5 erklärt: HFF = Humane Vorhautfibroblasten, CCR5 = Chemokinrezeptor 5, US28 = HCMV-Protein auf dem 28. Leserahmen des U_S-Segments, IE = „Immediate Early“ HCMV-Proteine, IL = Interleukin, RANTES = „Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted“, MIP-1 α = Makrophagen-inflammtorisches Protein 1 α .

Das Zusammenspiel zwischen HCMV und der Zelle ist sehr komplex und bislang immer noch nicht vollständig verstanden, denn HCMV greift an vielen Punkten in die zellulären Abläufe ein (Fortunato *et al.*, 2000). Einerseits kann die Hemmung von zellulären Kinasen wie RIP1 unerwünschte Nebenwirkungen zur Folge haben. Andererseits haben Inhibitoren gegen zelluläre Kinasen den Vorteil, dass sie auch gegen therapieresistente HCMV-Stämme wirksam sein können. Es gibt heute bereits zahlreiche potente Medikamente, die gegen zelluläre Kinasen gerichtet sind (siehe I, 1.3.3; Cohen, 2002; Coen and Schaffer, 2003). Auch wenn die in dieser Arbeit verwendeten „RIP1-Inhibitoren“ sowohl die RIP1-Kinase-Aktivität als auch die MAP Kinase p38 hemmen konnten⁴, konnte gezeigt werden, dass diese Inhibitoren die HCMV-Replikation effizient inhibierten (IV, 2, 15B). Es lohnt sich auf jeden Fall weitere Kinase-Inhibitoren zu entwickeln, da auch für andere Viren die Problematik der Therapieresistenzentwicklung gilt. Die Situation von HCMV-infizierten Neugeborenen, die aufgrund gravierender Nebenwirkungen nicht mit Ganciclovir behandelt werden können, ebenso wie die Situation von AIDS- und Transplantations-Patienten, die zunehmend Ganciclovir-Resistenzen entwickeln, verlangt nach neuen, effizienten und besser verträglichen Medikamenten gegen HCMV.

⁴ D. Hafenbradl, Axxima Pharmaceuticals AG

VI Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der zellulären Serin/Threonin-Kinase RIP1 für die HCMV-Infektion verifiziert. Die bereits in der Literatur beschriebene Hochregulation der Expression von RIP1 während der HCMV-Infektion, konnte auch in HFF-Zellen gezeigt werden.

Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Kinase-Aktivität von RIP1 für die HCMV-Replikation in HFF-Zellen notwendig war, da die Überexpression der Kinase-inaktiven RIP1-Mutante RIP K45R in HCMV-Replikations-Tests die Virusproduktion hemmen konnte. Weitere HCMV-Replikations-Tests mit RIP-Konstrukten zeigten, dass nicht alleine die Kinase-Aktivität von RIP1, und die damit verbundene Phosphorylierung möglicher viraler oder zellulärer Substrate, sondern wahrscheinlich auch die Bindung dieser Substrate an die Intermediär- und/oder die *Death*domäne, wichtig für die HCMV-Replikation war. Allerdings schien RIP1 nur zelltypspezifisch in HFF-Zellen notwendig für die HCMV-Replikation zu sein. Die Bedeutung von RIP1 für die HCMV-Infektion konnte nicht nur genetisch durch den Einsatz einer Kinase-inaktiven RIP1-Mutante, sondern auch chemisch mit Hilfe von RIP1-Kinase-Inhibitoren validiert werden. Interaktionen mit HCMV-viralen Proteinen, Effekte auf physiologische Zellfunktionen oder auf die Aktivierung von zellulären Signalwegen (z.B. MAP Kinase- und NFκB-Signalwege) konnten als Ursachen für die Hemmung der HCMV-Replikation durch die Expression von RIP K45R weitgehend ausgeschlossen werden.

Anhand von Sekretions-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Überstände der mit RIP K45R transduzierten Zellen die HCMV-Replikation um ca. 50% hemmen konnten. In „cDNA-Arrays“, PCR-Analysen und Zytokin-ELISA-Tests konnten vor allen Dingen antivirale Zytokine wie z.B. MIP-1 α , RANTES, Eotaxin, IL-6 und IL-8 identifiziert werden, deren Transkription und Sekretion durch RIP1 gehemmt wurde. Von den identifizierten Zytokinen konnten IL-8 und RANTES die HCMV-Replikation *per se* supprimieren. Am Modell des IL-8-Promotors¹ konnte gezeigt werden, dass die Expression und Sekretion der Zytokine IL-8 und RANTES möglicherweise über die Interaktion der RIP1-Kinase- und Intermediärdomäne mit ihren Promotoren gehemmt werden

¹ Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Kracht, Medizinische Hochschule, Hannover.

könnte. Als These wurde diskutiert, dass die Expression der Kinase-inaktiven RIP-Mutante RIP K45R wahrscheinlich über einen „dominant-negativen“ Effekt auf endogenes RIP1 über einen bislang nicht geklärten Signalweg die Expression antiviraler Zytokine „aktivieren“ und so die HCMV-Replikation hemmen konnte. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten deuteten darauf hin, dass die Hochregulation von RIP1 während der HCMV-Infektion, die antivirale Immunantwort hemmt. Dieses Ergebnis macht die zelluläre RIP1-Kinase zu einem Kandidaten für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren, die den Vorteil hätten, dass sie nicht zur Resistenzbildung beitragen.

VI Abstract

In this thesis, the importance of the cellular serine/threonine-protein kinase RIP1 was verified during HCMV infection. RIP1 was upregulated during HCMV infection in HFF-cells, as it was already described in literature.

It is demonstrated here that forced expression of RIP K45R - a kinase inactive RIP1 mutant - could potentially block HCMV replication in HFF cells. RIP1 was upregulated during HCMV infection in HFF cells, as it has already been described in literature.

Further HCMV replication assays using different RIP1 constructs show that not only kinase activity but also substrate binding to intermediate- and death domain of RIP1 seem to be essential for HCMV replication. The effect of RIP1 during HCMV replication seem to be cell type specific in HFF cells. Experiments with chemical inhibitors of RIP1 could also demonstrate the importance of RIP1 for the HCMV infection. Other possible explanations of the effect of RIP1, like interactions with other HCMV proteins, effects on physiological cell functions or activation of cellular signaling pathways (e.g. MAP kinase- and NF κ B-signaling pathways) has been excluded.

By secretions-experiments it could be proved that supernatants of the RIP K45R transduced cells suppress the HCMV replication by 50%.

Especially antiviral cytokines such as MIP-1 α , RANTES, Eotaxin, IL-6 and IL8 has been identified by cDNA arrays, PCR-analysis and cytokine EILSA assays. The transcription and secretion of these antiviral cytokines has been impeded by RIP1. IL-8 and RANTES could suppress the HCMV replication *per se*. With the model of the IL-8 promoter it could be demonstrated that expression and suppression of the cytokines might be impeded via interaction of the RIP1 kinase- and intermediate domain with their promoters.

The assumption has been discussed that RIP K45R probably "activates" the expression of antiviral cytokines via a "dominant-negative" effect on endogenous RIP1 via a so far unexplained signaling pathway. The data collected during the thesis suggest that the up regulation of RIP1 during the HCMV infection impedes the antiviral immune response. These results indicate RIP1 to be a candidate for the development of specific inhibitors, which would be advantageous because they avoid formation of resistance.

VII Literaturverzeichnis

- Ahmed, S.A., Gogal, R.M. and Walsh, J.E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes. *J Immunol Methods*, **170**, 211-224
- Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol*, **2**, 675-680
- Baldick, C.J. and Shenk, T. (1996). Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol*, **70**, 6097-6105
- Baldick, C.J., Marchini, A., Patterson, C.E. and Shenk, T. (1997). Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle. *J Virol*, **71**, 4400-4408
- Betts, J.C., Cheshire, J.K., Akira, S., Kishimoto, T. and Woo, P. (1993). The role of NF- κ B and NF-IL6 transactivating factors in the synergistic activation of human serum amyloid A gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *J Biol Chem*, **268**, 25624-25631
- Biron, K.K. *et al.* (2002). Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole-L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 2365-2372
- Bodaghi, B., Jones, T.R., Zipeto, D., Vita, C., Sun, L., Laurent, L., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.-L. and Michelson, S. (1998). Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J Exp Med*, **188**, 855-866
- Bogner, E., Radsak, K. and Stinski, M.F. (1998). The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J Virol*, **72**, 2259-2264
- Borst, E.M., Hahn, G., Koszinowski, U.H. and Messerle, M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol*, **73**, 8320-8329
- Boyle, K.A., Pietropaolo, R.L. and Compton, T. (1999). Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol Cell Biol*, Vol. 19, 3607-3613
- 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
- Bresnahan, W.A., Boldogh, I., Chi, P., Thompson, E.A. and Albrecht, T. (1997). Inhibition of cellular CDK2 activity blocks human cytomegalovirus replication. *Virology*, **231**, 239-247
- Bresnahan, W. and Shenk, T. (2000). A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science*, **288**, 2373-2376
- Britt, W.J. and Alford, C.A. (1996). Cytomegalovirus. *Fields Virology*, **3**.
Edition, Lippincott Williams and Wilkins
- Britt, W.J., Pass, R.F., Stagno, S. and Alford, C.A. (1991). Pediatric cytomegalovirus infection. *Transplant Proc*, **23**, 115-117

- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G. and Siebenlist, U. (1995). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*, **267**, 1485-1488
- Browne, E.P., Wing, B., Coleman, D. and Shenk, T. (2001). Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol*, **75**, 12319-12330
- Burns, J.M., Lewis, G.K. and DeVico, A.L. (1999). Soluble complexes of regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted (RANTES) and glycosaminoglycans suppress HIV-1 infection but do not induce Ca (2+) signalling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 14499-14504
- Casarosa, P., Bakker, R.A., Verzijl, D., Navis, M., Timmerman, H., Leurs, R. and Smit, M.J. (2001). Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28. *J Biol Chem*, **276**, 1133-1137
- Casarosa, P., Menge, W.M., Minisini, R., Otto, C., van Heteren, J., Jongejan, A., Timmerman, H., Moepps, B., Kirchhoff, F., Mertens, T., Smit, M.J. and Leurs, R. (2003). Identification of the first nonpeptidergic inverse agonist for a constitutively active viral-encoded G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, **278**, 5172-5178
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M. and Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, **266**, 1865-1869
- Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Ditereale, A., Pavirani, A. and Mehtali, M. (1996). Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol*, **70**, 4805-4810
- Chee, M.S., Bankier, A.T.; Beck, S., Bohni, R., Brwon, C.M., Cerny, R., Hornsell, T., Hutchison, C.A., Kouzarides, T., Martignetti, J.A., Preddie, E., Satchwell, S.C., Tomlinson, P., Weston, K.M. and Barell, B.G. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*, **154**, 125-170
- Cheeran, M.C.-J., Hu, S., Gekker, G. and Lokensgard, J.R. (2000). Decreased cytomegalovirus expression following proinflammatory cytokine treatment of primary human astrocytes. *J Immunol*, **164**, 926-933
- Cheeran, M.C.-J., Hu, S., Yager, S.L., Gekker, G., Peterson, P.K. and Lokensgard, J.R. (2001). Cytomegalovirus induces cytokine and chemokine production differentially in microglia and astrocytes: antiviral implications. *J NeuroVirol*, **7**, 135-147
- Chen, D., Li, X., Zhai, Z. and Shu, H.-B. (2002). A novel zinc finger protein interacts with receptor-interacting protein (RIP) and inhibits tumor necrosis factor (TNF)- and IL1-induced NF- κ B activation. *J Biol Chem*, **277**, 15985-15991
- Chung, C.T., Niemela, S.L. and Miller, R.H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci*, **86**, 2172-2175
- Cobb, M.H. and Robinson, M.J. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 180-186
- Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C. and Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T-cells. *Science*, **274**, 1393-1395

- Coen, D.M. and Schaffer, P.A. (2003). Antiherpesvirus drugs: A promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nature*, **2**, 278-288
- Cohen, P. (2002). Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Drug Discovery*, **1**, 309-315
- Compton, T., Nepumoceno, R.R. and Nowlin, D.M. (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology*, **191**, 834-841
- Compton, T., Nowlin, D.M. and Cooper, N.R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, **193**, 834-841
- Compton, T., Kurt-Jones, E.A., Boehme, K.W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D.T. and Finberg, R.W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and toll-like receptor 2. *J Virol*, **77**, 4588-4596
- Cotten, M., Stegmueller, K., Eickhoff, J., Hanke, M., Herzberger, K., Herget, T., Choidas, A., Daub, H. and Godl, K. (2003). Exploiting features of adenovirus replication to support mammalian kinase production. *Nucleic Acids Res*, **31**, e128
- Cranage, M.P., Smith, G.L., Bell, S.E., Hart, H., Brown, C., Bankier, A.T., Tomlinson, P., Barell, B.G. and Minson, T.C. (1988). Identification and expression of a human cytomegalovirus glycoprotein with homology to the Epstein-Barr virus BXLF2 product, varicella-zoster virus gpIII, and herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J Virol*, **62**, 1416-1422
- Devin, A., Lin, Y. and Liu, Z. (2003). The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO reports*, **4**, 623-627
- Dixit, V.M. (1999). RIP's: An emerging family of kinases involved in pro-inflammatory and apoptotic signaling. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **LXIV**, 359-362
- Doerr, H.W. (1987). Cytomegalovirus infection in pregnancy. *J Virol Methods*, **17**, 127-132
- Drew, W.L. (1992). Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*, **5**, 204-210
- Dumas, A.M., Geelen, J.L., Weststrate, M.W., Wertheim, P. and van der Noordaa, J. (1980). XbaI, PstI and BglII restriction enzyme maps of the two orientations of the varicella-zoster virus genome. *J Virol*, **39**, 390-400
- Eggers, M., Metzger, C. and Enders, G. (1998). Differentiation between acute primary and recurrent human cytomegalovirus infection in pregnancy, using a microneutralization assay. *J Med Virol*, **56**, 351-358
- Eickhoff, J., Hanke, M., Stein-Gerlach, M., Kiang, T.P., Herzberger, K., Habenberger, P., Müller, S., Klebl, B., Marschall, M., Stamminger, T. and Cotten, M. (2003). RICK activates a NF κ B-dependent anti-human cytomegalovirus response. *J Biol Chem*, **279**, 9642-9652
- Eickmann, M., Lange, R., Ohlin, M., Reschke, M. and Radsak, K. (1998). Effect of cysteine substitutions on dimerization and interfragment linkage of human cytomegalovirus glycoprotein B (gp UL55). *Arch Virol*, **143**, 1865-1880
- Emery, V.C. and Griffiths, P.D. (2000). Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci*, **97**, 8039-8044

- Emery, V.C. and Hassan-Walker, A.F. (2002). Focus on new drugs in development against human cytomegalovirus. *Drugs*, **62**, 1853-1858
- Enright, H., Haake, R., Weisdorf, D., Ramsay, N., McGlave, P., Kersey, J. Thomas, W., McKenzie, D. and Miller, W. (1993). Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. Risk factors and response to therapy. *Transplantation*, **55**, 1339-1346
- Epstein, M., Henle, W., Aching, B. and Barr, Y. (1965). Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med*, **121**, 761-770
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W. and Vandenabeele, P. (1999). More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, Vol. 18, 7719-7730
- Fish, K.N., Soderberg-Naucler, C., Mills, L.K., Stenglein, S. and Nelson, J.A. (1998). Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *J Virol*, Vol. 72, 5661-5668
- Fitzgerald, K.A., O'Neill, L.A.J. and Gearing, A.J.H. (2001). The cytokine facts book. *Academic Press*. 2nd edition
- Fortunato, E.A., McElroy, A.K., Sanchez, V. And Spector, D.H. (2000). Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends in Microbiology*, **8**, 112-119
- Frenkel, N., Schirmer, E.C., Wyatt, L.S., Katsafanas, G., Roffmann, E., Danovich, R.M. and June, C.H. (1990). Isolation of a new herpesvirus from human CD4⁺-T-cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 748-752
- Frevel, M.A.E., Bakheet, T., Silva, A.M., Hissong, J.G., Khabar, K.S. and Williams, B.R.G. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signalling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Mol Cell Biol*, **23**, 425-436
- Gallina, A., Simoncici, L., Garbelli, S., Percivalle, E., Pedrali-Noy, G., Lee, K.S., Erikson, R.L., Plachter, B., Gerna, G. and Milanesi, G. (1999). Polo-like kinase 1 as a target for human cytomegalovirus pp65 lower matrix protein. *J Virol*, **73**, 1468-1478
- Gibson, W. and Irmieri, A. (1984). Selection of particles and proteins for use as human cytomegalovirus subunit vaccines. *Birth Defects Orig Artic Ser*, **20**, 305-324
- Glotzer, J.B., Michou, A.I., Baker, A., Saltik, M. and Cotton, M. (2001). Microtubule-independent motility and nuclear targeting of adenoviruses with fluorescently labelled genomes. *J Virol*, **75**, 2421-2434
- Goldmacher, V.S., Bartle, L.M., Skaletskaya, A., Dionne, C.A., Kedersha, N.L., Vater, C.A., Han, J.-W., Lutz, R.J., Watanabe, S., McFarland, E.D.C., Kieff, E.D., Mocarski, E.S. and Chittenden, T. (1999). A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci*, **96**, 12536-12541
- Greaves, R.F., Brown, J.M., Vieira, J. and Mocarski, E.S. (1995). Selectable insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome using the Escherichia coli guanosine phosphoribosyl transferase (gpt) gene. *J Gen Virol*, **76**, 2151-2160
- Grundy, J.E., McKeating, J.A., Ward, P.J., Sanderson, A.R. and Griffiths, P.D. (1987). Beta 2 microglobulin enhances the infectivity of cytomegalovirus and when bound to the virus enables class I HLA molecules to be used as a virus receptor. *J Gen Virol*, **68**, 793-803

- Gruter, W. (1924). Das Herpesvirus, seine ätiologische und klinische Bedeutung. *Muench Med Wochenschr*, **71**, 1058-1060
- Habib, A.A., Chatterjee, S., Park, S.-K., Ratan, R.R., Lefebvre, S. and Vartanian, T. (2001). The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)-inducing kinase to activate NF- κ B. *J Biol Chem*, **276**, 8865-8874
- Hahn, G., Jones, R. and Mocarski, E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci*, **95**, 3937-3942
- Hanks, S.K. and Lindberg, R.A. (1991). Use of degenerate oligonucleotide probes to identify clones that encode protein kinases. *Meth Enzymol*, **200**, 525-532
- Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*, **9**, 576-596
- Herget, T., Freitag, M., Morbitzer, M., Kupfer, R., Stamminger, T. and Marschall, M. (2004). Novel chemical class of pUL97 protein kinase-specific inhibitors with strong anticytomegalovirus activity. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 4154-4262
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, B. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, **10**, 413-417
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, **11**, 1026-1030
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol*, **26**, 365-369
- Ho, M. (1990). Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis*, **12**, 701-710
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.-L., Schneider, P., Seed, B. and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8 independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunol*, **6**, 489-495
- Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., Eickemeier, S., Hoffmann, E., Wallach, D., Malinin, N.L., Cooper, J.A., Resch, K. and Kracht, M. (1999). Induction of Interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol*, **19**, 6742-6753
- Holtmann, H., Enninga, J., Kalble, S., Thiefes, A., Dorrie, A., Broemer, M., Winzen, R., Wilhelm, A., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Resch, K. and Kracht, M. (2001). The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both the transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *J Biol Chem*, **276**, 3508-3516
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.-B., Baichwal, V. and Goeddel, D.V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, **4**, 387-396
- Hu, W.-H., Johnson, H. and Shu, H.-B. (2000). Activation of NF- κ B by FADD, Casper, and Caspase-8. *J Biol Chem*, **275**, 10838-10844

- Huber, M.T. and Compton, T. (1998). The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol*, **73**, 8191-8197
- Huber, M.T. and Compton, T. (1999). Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of human cytomegalovirus. *J Virol*, **73**, 3886-3892
- Inohara, N., del Peso, L., Kodeki, T., Chen, S. and Núñez, G. (1998). RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, **273**, 12296-12300
- Inohara, N., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P.C., Chen, F.F., Ogura, Y. and Nunez. (2000). An induced proximity model for NF- κ B activation in the Nod1/RICK and RIP signalling pathways. *J Biol Chem*, **275**, 27823-27831
- Inohara, N. And Nunez, G. (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*, **3**, 371-382
- Johnson, G.L. and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, **298**, 1911-1912
- Johnson, R.A., Ma, X.-L., Yurochko, A.D. and Huang, E.-S. (2001a). The role of MKK1/2 kinase activity in human cytomegalovirus infection. *J Gen Virol*, **82**, 493-497
- Johnson, R.A., Wang, X., Ma, X.-L., Huong, S.-M. and Huang, E.-S. (2001b). Human cytomegalovirus up-regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: Inhibition of PI3-K activity inhibits viral replication and virus-induced signaling. *J Virol*, **75**, 6022-6032
- Kari, B. and Gehrz, R. (1993). Structure, composition and heparin binding properties of a human glycoprotein complex designated gC-II. *J Gen Virol*, **74**, 255-264
- Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF κ B activity. *Annu Rev Immunol*, **18**, 621-663
- Karin, M., Yamamoto, Y. and Wang, Q.M. (2004). The IKK NF κ B-System: A treasure trove for drug development. *Nature Drug Discovery*, **3**, 17-26
- Kasof, G.M., Prosser, J.C., Lorenzi, M.V. and Gomes, B.C. (2000). The RIP-like kinase, RIP3, induces apoptosis and NF κ B nuclear translocation and localizes to mitochondria. *FEBS Lett*, **473**, 285-291
- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z. and Leder, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity*, **8**, 297-303
- Kerr, J., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972). Apoptosis a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **68**, 239-257
- Kim, J.W., Joe, C.O. and Choi, E.-J. (2001). Role of receptor-interacting protein in tumor necrosis factor- α -dependent MEKK1 activation. *J Biol Chem*, **276**, 27064-27070
- Kronschabl, M., Marschall, M. and Stamminger, T. (2002). Efficient and tightly regulated expression systems for the human cytomegalovirus major transactivator protein IE2p86 in permissive cells. *Virus Res*, **83**, 89-102
- Krosky, P.M., Baek, M.C. and Coen, D.M. (2003). Human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target is required at the state of nuclear egress. *J Virol*, **77**, 905-914

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- Lamkanfi, M., D'hondt, K., Vande Walle, L., van Gurp, M., Denecker, G., Demeulemeester, J., Kalai, M., Declercq, W., Saelens, X. and Vandenameele, P. (2005). A novel caspase-2 complex containing TRAF2 and RIP1. *J Biol Chem*, **280**, 6923-6932
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Strickler, J.E., McLaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P.; White, J.R., Adams, J.L. and Young, P.R. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, **372**, 739-746
- Lee, T.H. Huang, Q., Oikemus, S., Shank, J., Ventura, J.-J., Cusson, N., Vaillancourt, R.R., Su, B., Davis, R.J., Kelliher, M.A. (2003). The death domain kinase RIP1 is essential for tumor necrosis factor alpha signalling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, **23**, 8377-8385
- Lee, T.H., Shank, J., Cusson, N. and Kelliher, M.A. (2004). The kinase activity of RIP1 is not required for tumor necrosis factor- α -induced I κ B kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of RIP1 by Traf2. *J Biol Chem*, **279**, 33185-33191
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y. and Liu, Z. (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Develop*, **13**, 2514-2526
- Lindquester, G.J. and Pellet, P.E. (1991). Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G and C content, length and the presence of variable directly repeated terminal sequence elements. *Virology*, **182**, 102-110
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. and Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell*, **87**, 565-576
- Loenen, W.A.M., Bruggeman, C.A. and Wiertz, E.J.H.J. (2001). Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology. *Immunology*, **13**, 41-49
- Mach, M., Kropff, B., Dal Monte, P. and Britt, W. (2000). Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol*, **74**, 11881-11892
- Mahalingham, S. and Karupiah, G. (1999). Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol Cell Biol*, **77**, 469-475
- Mantovani, A. and Dinarello, C. (2000). Pharmacology of cytokines. *Oxford University Press*
- Marschall, M., Freitag, M., Weiler, S., Sorg, G. and Stamminger, T. (2000). Recombinant green fluorescent protein-expressing human cytomegalovirus as a tool for screening antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 1588-1597
- Marschall, M., Stein-Gerlach, M., Freitag, M., Kupfer, R., van den Bogaard, M. and Stamminger, T. (2001). Inhibitors of human cytomegalovirus replication drastically reduce the activity of the viral protein kinase pUL97. *J Gen Virol*, **82**, 1439-1450

- Marschall, M., Stein-Gerlach, M., Freitag, M., Kupfer, R., van den Bogaard, M. and Stamminger, T. (2002). Direct targeting of human cytomegalovirus protein kinase pUL97 by kinase inhibitors is a novel principle for antiviral therapy. *J Gen Virol*, **83**, 1013-1023
- Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T. and Akira, S. (1993). Transcription factors NF-IL6 and NF- κ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 10193-10197
- McVoy, M.A. and Adler, S.P. (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol*, **68**, 1040-1051
- McVoy, M.A., Nixon, D.E., Adler, S.P. and Mocarski, E.S. (1998). Sequences within the herpesvirus-conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J Virol*, **72**, 48-56
- Meijer, L. (2000). Cyclin-dependent kinases inhibitors as potential anticancer, antineurodegenerative, antiviral and antiparasitic agents. *Drug Resist Updat*, **3**, 83-88
- Meylan, E., Martinon, F., Thome, M., Gschwendt, M. and Tschopp, J. (2002). RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF- κ B and is processed during apoptosis. *EMBO reports*, **3**, 1201-1208
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M. and Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- κ B activation. *Nature Immunol*, **5**, 503-507
- Michelson, S., Dal Monte, P., Zipeto, D., Bodaghi, B., Laurent, L., Oberlin, E., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.-L. and Landini, M.P. (1997). Modulation of RANTES production by human cytomegalovirus infection of fibroblasts. *J Virol*, **71**, 6495-6500
- Michou, A.I., Lehrmann, H., Saltik, M. and Cotten, M. (1999). Mutational analysis of the avian adenovirus CELO, which provides a basis for gene delivery vectors. *J Virol*, **73**, 1399-1410
- Miller, D.M., Zhang, Y., Rahill, B.M., Waldman, W.J. and Sedmak, D.D. (1999). Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immuno-regulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J Immunol*, **162**, 6107-6113
- Mills, S.G. and DeMartino, J.A. (2004). Chemokine receptor-directed agents as novel anti-HIV-1 therapies. *Curr Top Med Chem*, **4**, 1017-1033
- Milne, R.S.B., Paterson, D.A. and Booth, J.C. (1998). Human cytomegalovirus glycoprotein H/ glycoprotein L complex modulates fusion-from-without. *J Gen Virol*, **79**, 855-865
- Mocarski, E.S. and Courcelle, C.T. (2001). Cytomegaloviruses and their replication in Knipe, D.M. *et al.*, *Fields Virology*, **4. Edition**, Lippincott Williams and Wilkins
- Mocarski, E.S. (2002). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol*, **10**, 332-339
- Moskowitz, L., Hensley, G.T., Chan, J.C. and Adams, K. (1985). Immediate causes of death in aquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med*, **109**, 735-738

- Mulamba, G.B., Hu, A., Azad, R.F., Anderson, K.P. and Coen, D.M. (1998). Human cytomegalovirus mutant with sequence-dependant resistance to the phosphorothioate oligonucleotide fomiversen (ISIS 2922). *Antimicrob Agents Chemother*, **42**, 971-973
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Ehrlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol*, **51**, 283-273
- Muranyi, W., Haas, J., Wagner, M., Krohne, G. and Koszinowski, U.H. (2002). Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science*, **297**, 854-857
- Murayama, T., Ohara, M., Obuchi, K.S.A., Khabar, H., Higashi, N., Mukaida, N. and Matsushima, K. (1997). Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1 and NF κ B-binding sites of the interleukin-8 gene. *J Virol*, **71**, 5692-5695
- Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U. and Helenius, A. (2000). Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol*, **20**, 4922-4931
- Papa, F.R., Zhang, C., Shokat, K. and Walter, P. (2003). Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science*, **302**, 1533-1537
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 8392-8396
- Perez, J.L. (1997). Resistance to antivirals in human cytomegalovirus: mechanisms and clinical significance. *Microbiologia*, **13**, 343-352
- Plachter, B., Sinzger, C. and Jahn, G. (1996). Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res*, **46**, 195-261
- Prösch, S., Docke, W.D., Reinke, P., Volk, H.D. and Krüger, D.H. (1999). Human cytomegalovirus reactivation in bone-marrow-derived granulocyte/ monocyte progenitor cells and mature monocytes. *Intervirology*, **42**, 308-313
- Radsak, K.D., Brücker, K.H. and Gorgatov, S.D. (1991). Focal nuclear envelope lesions and specific nuclear lamin A/C dephosphorylation during infection with human cytomegalovirus. *Eur J Cell Biol*, **54**, 299-304
- Radsak, K.D., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hubinger, A. and Reschke, M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol*, **141**, 557-572
- Raingaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Dérijard, B. And Davis, R.J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol*, **16**, 1247-1255
- Randolph-Habecker, J., Rahill, B., Torok-Storb, B., Vieira, J., Kolattukudy, P.E., Rovin, B.H. and Sedmak, D.D. (2002). The expression of the cytomegalovirus chemokine receptor homolog US28 sequesters biologically active CC chemokines and alters IL-8 production. *Cytokine*, **19**, 37-46
- Roby, C. and Gibson, W. (1986). Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. *J Virol*, **59**, 714-727

- Rodems, S.M. and Spector, D.H. (1998). Extracellular signal-regulated kinase-activity is sustained early during human cytomegalovirus infection. *J Virol*, **72**, 9173-9180
- Roizman, B., Carmichael, L.E., Deinhardt, F. et al. (1981). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on taxonomy of viruses. *Intervirology*, **16**, 201-217
- Roizman, B., Desroisiers, R.B.F., Lopes, C., Minson, A. and Studdert, M. (1992). The family herpesviridae, an update. *Arch Virol*, **123**, 425-448
- Rowe, W.P., Hartley, J.W., Waterman, S., Turner, H.C. and Huebner, R.J. (1956). Cythopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med*, **92**, 418-424
- Saederup, N. and Mocarski, E.S. (2002). Fatal attraction: cytomegalovirus-encoded chemokine homologs. *Curr Top Microbiol Immunol*, **269**, 235-256
- Salazar-Mather, T.P., Orange, J.S. and Biron, C.A. (1998). Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α)-dependent pathways. *J Exp Med*, **187**, 1-14
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour New York*
- Schneeweis, K.E. (1962). Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther.*, **129**, 29-48
- Schols, D. (2004). HIV co-receptors as targets for antiviral therapy. *Curr Top Med Chem*, **4**, 883-893
- Smith, M.G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, **92**, 224-230
- Sodeik, B., Ebersold, M.W. and Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus capsids to the nucleus. *J Cell Biol*, Vol. 136, 1007-1020
- Soderberg, C., Giugni, T.D., Zaia, J.A., Larsson, S., Wahlberg, J.M. and Moller, E. (1993). CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J Virol*, **67**, 6576-6585
- Soderberg, C., Fish, K.N. and Nelson, J. (1997). Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J Clin Invest*, **100**, 3154-3163
- Soderberg-Naucler, C. and Nelson, J. (1999). Human cytomegalovirus latency and reactivation- a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology*, **42**, 314-321
- Stagno, S. (1986). Cytomegalovirus infection: a pediatrician's perspective. *Curr Probl Pediatr*, **16**, 629-667
- Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.-H., Kim, E. and Seed, B. (1995). RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*, **81**, 513-523

- Stoddart, C.A., Cardin, R.D., Boname, J.M., Manning, W.C., Abenes, G.B. and Mocarski, E.S. (1994). Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J Virol*, **68**, 6243-6253
- Stinski, M.F. (1976). Human cytomegalovirus: glycoproteins associated with virions and dens bodies. *J Virol*, **19**, 594-609
- Stinski, M.F. (1978). Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J Virol*, **26**, 686-701
- Sun, X., Lee, J., Navas, T., Baldwin, D.T., Stewart, T.A. and Dixit, V.M. (1999). RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *J Biol Chem*, **274**, 16871-16875
- Sun, X., Yin, J., Starovasnik, M.A., Fairbrother, W.J. and Dixit, V.M. (2002). Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *J Biol Chem*, **277**, 9505-9511
- Tan, P.K., Michou, A.I., Bergelson, J.M. and Cotton, M. (2001). Defining CAR as a cellular receptor for the avian adenovirus CELO using a genetic analysis of the two viral fibre proteins. *J Gen Virol*, **82**, 1465-1472
- Taylor, G.A., Collazo, C.M., Yap, G.S., Nguyen, K., Gregorio, T.A., Taylor, L., Eagleson, B., Secret, L., Southon, E.A., Reid, S.W., Tessarollo, L., Bray, M., McVicar, D.W., Komschlies, K.L., Young, H.A., Biron, C.A., Sher, A. and Woude, G.F. (2000). Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 751-755
- Ting, A.T., Pimentel-Muiños, F.X. and Seed, B. (1996). RIP mediates tumor necrosis factor receptor-1 activation of NF- κ B but not Fas/APO-1 initiated apoptosis, *EMBO J*, **15**, 6189-6196
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K. and Kern, H. (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol*, **60**, 163-178
- Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S. and Baeuerle, P.A. (1995). Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J*, **14**, 2876-2883
- Villarreal, E.C. (2003). Current and potential therapies for the treatment of herpesvirus infections. *Progress in Drug Research*, **60**. Birkhäuser Verlag, Basel
- Vivarelli, M.S., McDonald, D., Miller, M., Cusson, N., Kelliher, M. and Geha, R.S. (2004). RIP links TLR4 to Akt and is essential for cell survival in response to LPS stimulation. *J Exp Med*, **200**, 399-404
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signalling. *Cell Death Differ*, Vol. 10, 45-65
- Wang, X., Huong, S.-M., Chiu, M.L., Raab-Traub, N. and Huang, E.-S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*, **24**, 456-461
- Wein, G., Rössler, M., Klug, R. and Herget, T. (2003). The 3'-UTR of the mRNA coding for the major protein kinase C substrate MARCKS contains a novel CU-rich element interacting with the mRNA stabilizing factors HuD and HuR. *Eur J Biochem*, **270**, 350-365

- Weston, C.R. and Davis, R.J. (2002). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Gen Develop*, **12**, 14-21
- Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C.-Y.A., Shyu, A.-B., Müller, M., Gaestel, M., Resch, K. and Holtmann, H. (1999). The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J*, **18**, 4969-4980
- Wolf, D.G., Courcelle, C.T., Prichard, M.N. and Mocarski, E.S. (2001). Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proc Natl Acad Sci*, **98**, 1895-1900
- Wright, H.T., Goddheart, C.R. and Lielausis, A. (1964). Human cytomegalovirus Morphology by negative staining. *Virology*, **23**, 419-424
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z. and Su, B. (2001). The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- κ B activation. *Nature Immunol*, **2**, 620-624
- Yao, Z.-Q., Gallez-Hawkins, G., Lomeli, N.A., Li, X., Molinder, K.M., Diamond, D.J. and Zaia, J.A. (2001). Site-directed mutation in a conserved kinase domain of human cytomegalovirus-pp65 with preservation of cytotoxic T lymphocyte targeting. *Vaccine*, **19**, 1628-1635
- Young, P.R., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M.L., McNulty, D., Gallagher, T.F., Fisher, S., McDonnell, P.C., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Seibel, G., Porter, T.G., Livi, G.P., Adams, J.L. and Lee, C.J. (1997). Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAP kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem*, **272**, 12116-12121
- Zhu, H., Cong, P.-J., Mamtora, G., Gingeras, T. and Shenk, T. (1998). Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 14470-14475
- Zhu, H., Cong, P.-J., Yu, D., Bresnahan, W.A. and Shenk, T.E. (2002). Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 3932-3937

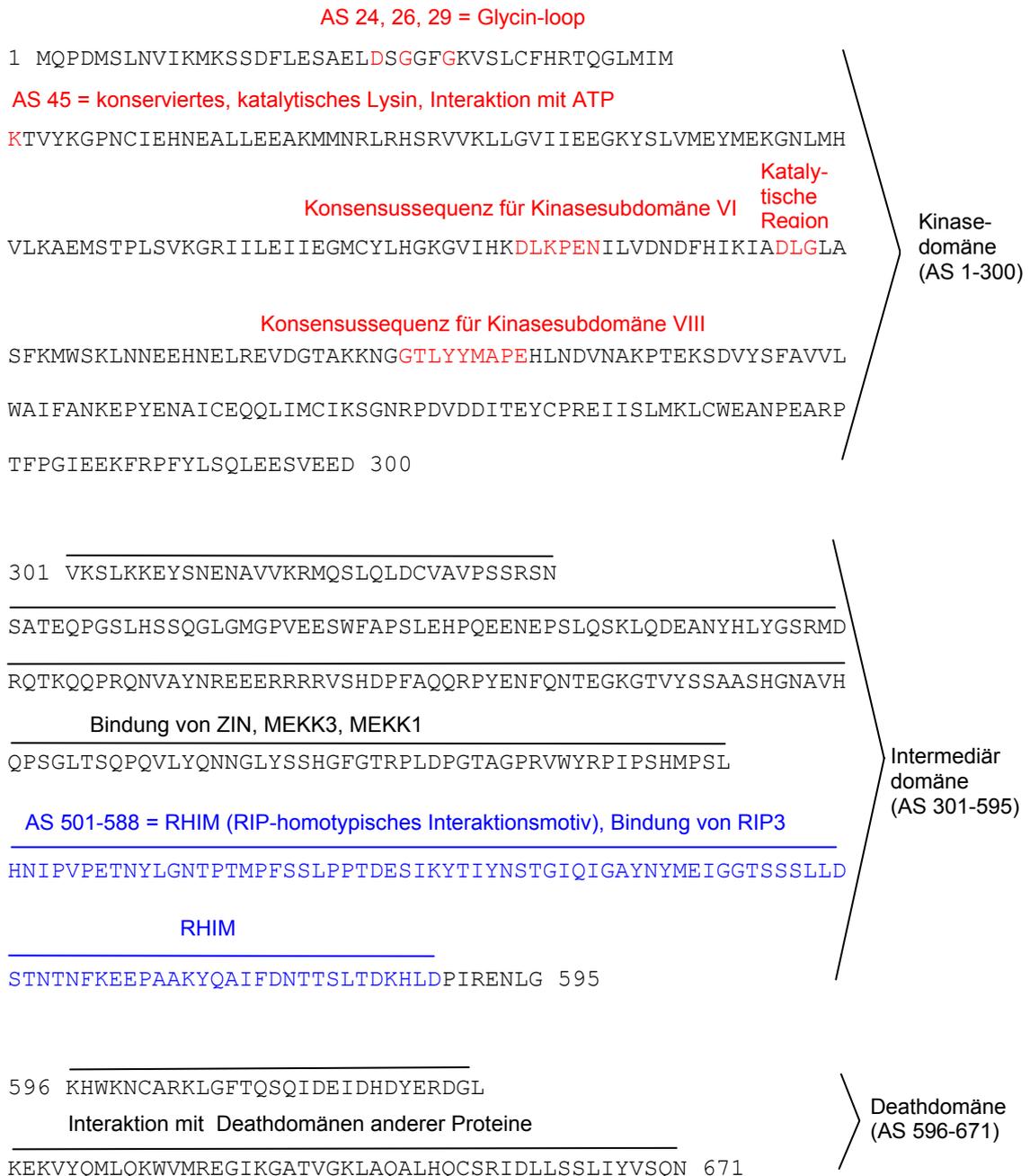
VIII Abkürzungen

Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Ci	<i>Curie</i> (1Ci = 3,7x10 ¹⁰ Bequerel)
cpm	Zählereignis pro Minute
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
Cy3	Indocarbocyanin
Da	<i>Dalton</i>
DD	<i>Death</i> domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle</i> Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	früh (<i>early</i>)
ECL	<i>enhanced</i> Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular signal-regulated</i> Kinase
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung [9,8m/s ²]
gp	Glykoprotein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCV	Ganciclovir
GFP	Grün-Fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HA-tag	Hämagglutinin-tag
HBS	HEPES gepufferte Kochsalzlösung
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HEK	Humane embryonale Nierenepithelzellen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure
HFF	Humane Vorhautfibroblasten
HSV	Herpes-Simplex Virus
I	Intermediärdomäne
IDD	Intermediär- und domäne
IE	unmittelbar früh (<i>immediate early</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

I κ B	Inhibitor des Nukleären Faktors κ B
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRF	<i>Interferone Response Faktor</i>
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
K	Kinasedomäne
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KI	Kinase- und Intermediärdomäne
L	spät (<i>late</i>)
LB	<i>Luria & Bertani-Broth-Medium</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAP Kinasen	<i>Mitogen activated</i> Proteinkinasen
MAPKK	MAP Kinase Kinase
MAPKKK	MAP Kinase Kinase Kinase
MCMV	Murines Cytomegalievirus
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MEM	<i>Minimum Essential</i> Medium
min	Minute(n)
MIP	<i>Macrophage-Inflammatory Protein</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NF κ B	Nukeärer Faktor κ B
NKS	Neugeborenen Kälberserum
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p.a.	zur Analyse (<i>per analysis</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEI	Polyetylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pp	Phosphoprotein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RANTES	<i>Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted</i>
RICK (RIP2)	<i>Receptor interacting protein-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein</i>
RIP1	Rezeptor interagierende Proteinkinase 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Svedbergeinheit
s	Sekunde(n)
SAPK	<i>Stress-activated</i> Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>Standard Saline Citrat</i>
ST	Strep tag

SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethyl-methylen-diamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
ü.N.	über Nacht
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>Unit</i>)
U _L	nicht repetitive Region des langen Genomarms (unique long)
UpM	Umdrehungen pro Minute
U _S	nicht repetitive Region des kurzen Genomarms (unique short)
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VZV	Varizella-Zoster Virus
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp

Anhang

**Abb. 31: Aminosäuresequenz des humanen RIP1**

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des humanen RIP1 (Gen Bank Accession Nummer NM_003804). Wichtige bereits bekannte Konsensussequenzen und Bindestellen für andere Proteine sind in der Sequenz farblich hervorgehoben (Hanks and Lindberg, 1991; Stanger *et al.*, 1995; Hanks and Hunter, 1995; Hsu *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002).

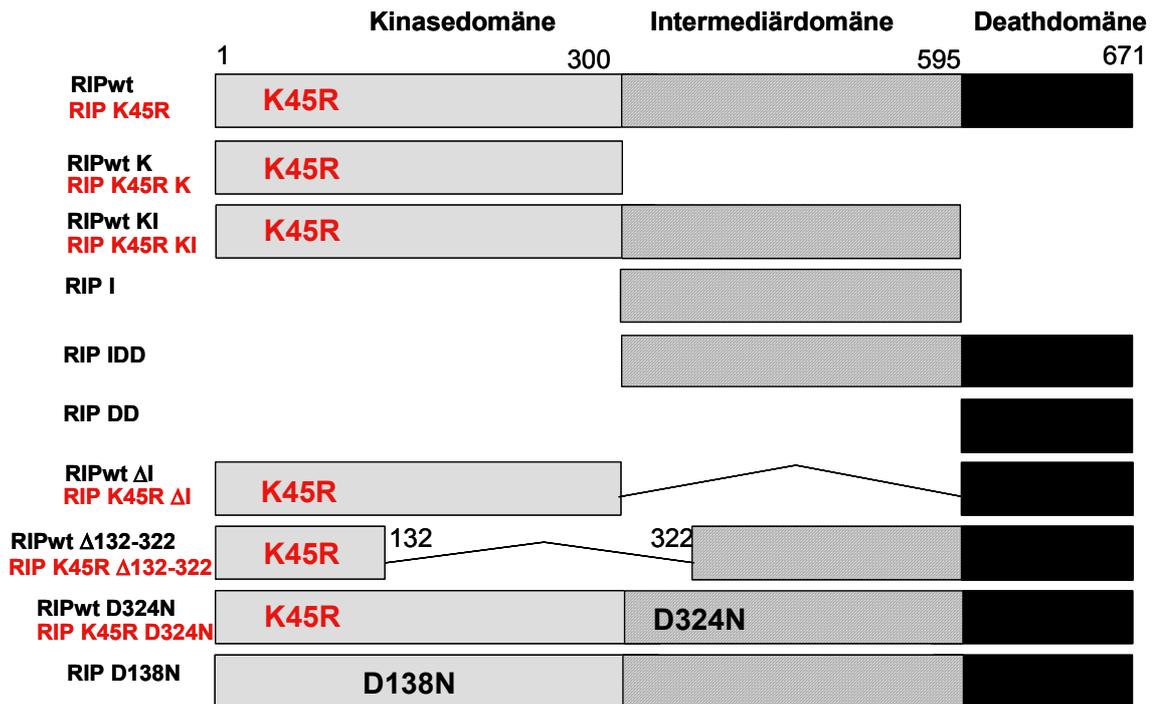


Abb. 32: Schematische Darstellung der einzelnen RIP1-Konstrukte

Alle dargestellten Konstrukte wurden aus dem Ausgangsplasmid pPM7-RIPwt-ST hergestellt und waren mit einem C-terminalen Strep-tag versehen. Die Herstellung und Nomenklatur der Konstrukte ist in dieser Arbeit im Kapitel II, 12 erläutert. Die Konstrukte, die die RIP-Kinasedomäne trugen, wurden als Wildtyp (wt) und Kinase-inaktive (K45R) Mutante hergestellt. Die K45R-Konstrukte wurden nicht gesondert aufgeführt, sondern durch ein rotes K45R in der Kinasedomäne des jeweiligen Konstrukts gekennzeichnet.

Lebenslauf

Name	Hanna Rabia Khan
Geburtsdatum	04.05.1976
Geburtsort	Bochum
Staatsangehörigkeit	deutsch
Ausbildung	
1982 - 1986	Waldschule, Städtische Gemeinschaftsgrundschule, Bochum
1986 -1993	Schiller-Schule, Städtisches Gymnasium , Bochum
1993- 1995	Hildegardis-Schule, Städtisches Gymnasium, Bochum
1995	Allgemeine Hochschulreife
1995 - 1999	Studium des Studienganges Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
1999 - 2000	Diplomarbeit mit dem Titel „Export und Sekretion von Furin“ am Institut für Virologie der Philipps- Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Garten
2000	Diplom mit dem Titel Diplom-Humanbiologe
2000 - 2001	Arbeiten an dem Thema „Adoptive Immuntherapie rezidivierender Cytomegalie- erkrankungen nach allogener Knochen- markstransplantation“ am Max-von-Pettenkofer- Institut für Virologie München unter Leitung von Frau PD Dr. G. Hahn
2001 - 2004	Promotionsarbeit mit dem Thema „Die Rolle der Proteinkinase RIP1 bei Infektionen durch das humane Cytomegalievirus“ bei der Axxima Pharmaceuticals AG München (heute GPC Biotech) unter Leitung von Herrn Prof Dr. T. Herget

seit 01.01.2005

Wissenschaftlicher Aussendienst bei der
Schwarz Pharma Deutschland GmbH

Publikationen und Kongressbeiträge

Hahn G, Khan H, Baldanti F, Koszinowski UH, Revello MG, Gerna G: „The human cytomegalovirus ribonucleotide reductase homologue UL45 is dispensable for growth in endothelial cells, as determined by a BAC-cloned clinical isolate of human cytomegalovirus with preserved wildtype characteristics.“ (J. Virol. 2002)

Herget T: „Proteinkinases as Novel Targets in Infectious Diseases: RIP and Human Cytomegalovirus“(7th STS meeting, Weimar 2003)

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg

Aurich
Barth
Beato
Becker
Brüne
Eickmann
Elsässer
Frenking
Garten
Habermehl
Jungclas
Kirchner
Klenk
Koolmann
Lammel
Lill
Mandrek
Melsheimer
Mutters
Müller
Richter
Röhm
Schäfer
Schulz
Schwee
Seitz
Seitz
Sitter
Steinmetz
Tautz-Kopania
von Löw
Wagner
Westermann

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in München

Cotten
Hahn
Herget
Koszinowski
Müller

Meine akademischen Lehrer waren die Herren in Erlangen

Marschall
Stamminger

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Rolle der Proteinkinase RIP1 bei Infektionen durch das humane Cytomegalievirus“ in der Firma Axxima Pharmaceuticals AG unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Herget mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Wolfgang Garten ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hanhofen im Juni 2007

Hanna Rabia Khan

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Herget für die Überlassung des Themas, die kompetente Betreuung der Arbeit bei der Axxima Pharmaceuticals AG, die kritischen und fruchtbaren Diskussionen und die Korrektur, sowie Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Garten bedanke ich mich ganz besonders für die Vertretung der Arbeit an der Philipps-Universität Marburg und die Korrektur, sowie Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Matthias Baumann danke ich für die geduldige Betreuung und Diskussionsbereitschaft während meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Stamminger und Herrn PD Dr. Manfred Marschall, Herrn Dr. Stefan Müller, Herrn Dr. Jan Eickhoff und Herrn Dr. Matt Cotten danke ich für die Kooperation, die stete Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit.

Monika Morbitzer, Kerstin Stegmüller, Birgit Zech und Birgit Felden de Neumann danke ich für die Hilfsbereitschaft und das kooperative Arbeitsklima.

Allen übrigen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Axxima Pharmaceuticals AG möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre in der Firma danken.

Bei Sarah, Christine und Michael, Jessica, Rebecca, Silvia und Rainer, Andrea und Christian, Angelika und Martin, Uta und Christian, bedanke ich mich für ihre Freundschaft, Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit in München.

Meinen Eltern, Sarah und Nadeem und Peters Eltern möchte ich ganz besonders für ihre seelisch-moralische Unterstützung während meiner Doktorarbeit danken.

Vielen Dank für Alles, lieber Peter.