

Aus dem Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

D I S S E R T A T I O N

Untersuchung der Zellzyklusaktivität
immediate early exprimierter Proteine
des Zytomegalievirus der Maus

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Herrn Linus B. Grabenhenrich
aus Aachen

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Chr. Hagemeyer
2. Prof. Dr. med. N. Suttorp
3. Prof. Dr. B. Plachter

Datum der Promotion: 20. April 2009

für die Miriam

Abstract

The influence on the cell cycle of the infected cell through the proteins M82, M83, M69, IE1, IE2 and IE3 of the murine Cytomegalovirus is characterized with corresponding eukaryotic expression vectors. The data provided demonstrate an arresting effect of IE3 and – less pronounced – of M69, which inhibits G-S-phase transition of transfected cells. Analysis of the system of cyclin-dependent kinases showed decreased cyclin-A-associated activity for IE3-transfected cells. The area responsible for these effects was localized between amino acids 100–360 on the IE3 Protein.

Keywords:

Murine Cytomegalovirus, Immediate Early Proteins, Cell cycle, Cyclin-dependent Kinases

Zusammenfassung

Es wurden für die Proteine M82, M83, M69, IE1, IE2 und IE3 des Zytomegalievirus der Maus mit Hilfe von eukaryontischen Expressionsvektoren deren Einfluss auf den Zellzyklus der Wirtszellen untersucht. Für IE3 und in geringerem Maße für M69 konnte eine arretierende Funktion gezeigt werden, welche Zellen vor Erreichen der S-Phase in der Zyklusprogression einschränkt. Die Analyse des Zyklinkinasesystems zeigte für IE3 eine verminderte Zyklin-A-assoziierte Kinaseaktivität. Die beschriebene Funktion von IE3 konnte auf dem Bereich zwischen Aminosäuren 100–360 lokalisiert werden.

Schlagwörter:

Murines Zytomegalievirus, Immediate Early Proteine, Zellzyklus, Zyklinkinasen

Danksagung

Ich danke zuerst Christian und Lüder für das Angebot, unter ihrer Leitung im Labor für Pädiatrische Molekularbiologie der Charité Berlin meine Forschung zur Erlangung des Dokortitels durchgeführt haben zu dürfen. Daneben danke ich natürlich allen Laborkollegen, ohne diese kein Experiment und keine Seite dieser Arbeit zustande gekommen wäre. Miriam und Robert neben mir an der Bench, Ralf für die tatkräftige Unterstützung bei vielen Experimenten und an den Computern, Christina und Uschi für entspannte Pausengespräche, Matthias für die Hilfe bei der siRNA und Sebastian bei den Viren.

Und Anke für die exzellente Vorarbeit, Grundlage meiner Dissertation, und David, der nach mir meine liebgewonnene Sonnenbench weitergeführt hat.

Und den Beastie Boys, und Joey und der Madness, dem Laborfrust Kit deluxe®, dem Mercedes unter den Entfrustern, sicher, ohne all die alles ziemlich non-random geworden wäre. Wäre schade gewesen.

Und Jana fürs viele Fragendürfen, meinen Jungs für die Geduld beim Tippen. Und Doris und Jens natürlich fürs Nachbohren und Rückenfreihalten. Allen lieben Leuten drumherum.

Und Helga und Heinz Bernd, meinen Eltern. Ich wäre ja garnicht der, und auch nicht dort wo ich gerade bin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinische Aspekte der Zytomegalie-Infektion	1
1.1.1	Verlaufsformen	2
1.1.2	Therapieansätze	3
1.2	Biologie der Zytomegalieviren	4
1.2.1	Aufbau	5
1.2.2	Der Infektions-Zyklus	6
1.2.3	Persistenz und Latenz	7
1.3	Der eukaryontische Zellzyklus	8
1.3.1	Regulation auf molekularer Ebene: Die Zykline	8
1.3.2	Kontrollpunkte im Zellzyklus	11
1.4	Einfluss von Zytomegalieviren auf den Zellzyklus	12
1.4.1	Zellzyklusregulation durch HCMV	12
1.4.2	Zellzyklus-Aktivität einzelner HCMV-Proteine	13
1.4.3	Einfluss auf den Zellzyklus durch andere CMV-Spezies	16
1.5	Zielsetzung	18
2	Methoden und Material	19
2.1	Plasmide	19
2.1.1	Die Vorlage der Sequenzen	20
2.1.2	PCR	22
2.1.3	Ligation	23
2.1.4	Elektroporation und Präparation	24
2.1.5	Restriktionsverdau	25
2.1.6	Sequenzierung	26
2.1.7	Präparation der Plasmide	28
2.1.8	Sonstige Plasmide	29
2.2	Zellen	29
2.2.1	Zellkultur	29
2.2.2	Kalzium-Phosphat-Transfektion	30
2.2.3	Transfektionskontrolle	31
2.2.4	MACS-Sortierung	32
2.2.5	Extrakte und Protein-Quantifizierung	34

2.3	Analyse-Verfahren	35
2.3.1	In-vitro-Expression	35
2.3.2	SDS-Page	35
2.3.3	Western Blot (Immunoblot)	36
2.3.4	Kinase-Essay	37
2.3.5	Zellzyklusanalyse im FACS	37
2.4	RNA-Interferenz	39
2.5	Lösungen	41
2.6	Software	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Struktur der Experimente	43
3.2	Vorauswahl der Kandidatengene	45
3.3	Nachweis der Protein-Expression	48
3.3.1	In-vitro Nachweis	49
3.3.2	Nachweis der Expression in NIH-3T3-Zellen	51
3.4	Analyse der Zellzyklusprogression von transfizierten Zellen im FACS	52
3.4.1	Grundlagen	52
3.4.2	Zellzyklusanalyse in 3T3-Zellen	55
3.4.3	Nocodazol-Arrest	57
3.4.4	Zellzyklusanalyse anderer Zelllinien	59
3.5	Der Einfluss von IE3 auf das Zyklinkinasesystem	64
3.5.1	Zyclin E – Expression und Kinaseaktivität	64
3.5.2	Zyclin A – Expression und Kinaseaktivität	65
3.5.3	Zyclin B – Expression und Kinaseaktivität	66
3.6	RNAi als Werkzeug für zukünftige Analysen	67
3.7	Deletionsanalyse von IE3	69
4	Diskussion	72
4.1	IE3 und M69 bewirken Zellzyklusarrest	73
4.2	Mechanismen des Zellzyklusarrestes	75
4.3	Die Bedeutung für den Infektions-Zyklus	77
4.4	Ein Tiermodell für die CMV-Infektion	77
4.5	Ausblick	78
5	Zusammenfassung	80
	Literaturverzeichnis	81
	Eidesstattliche Erklärung	93
	Lebenslauf	95

Kapitel 1

Einleitung

Von jährlich ca. 750.000 in Deutschland geborenen Kindern werden während der Schwangerschaft etwa 2000 über die Mutter durch das Zytomegalievirus infiziert (Prävalenz 0.2–0.5%, [1]). Von diesen tragen 200 Kinder auf Grund kongenital erworbener Infektion deutliche Folgeschäden in ihr beginnendes Leben, häufig Taubheit und eine verzögerte geistige, oft auch körperliche Entwicklung. Eine etablierte Therapie steht weiterhin aus.

1.1 Klinische Aspekte der Zytomegalie-Infektion

Primäre Zytomegalievirus (CMV)-Infektionen zeigen sich nur in einer geringen Zahl der Fälle durch eine symptomatische Erkrankung. Ist das Immunsystem des Infizierten zeitweilig oder dauerhaft geschwächt, sei es *in utero* wo es noch nicht vollständig ausgereift ist, bei medikamentöser Immunsuppression in der Transplantationsmedizin oder im Rahmen einer HIV-Infektion, so kann es bei Neuinfektion zur klinisch manifesten Erkrankung verschiedener Organe kommen. Darüber hinaus ist CMV nach asymptomatischer Latenz in der Lage bei neu aufgetretener Schwäche des Immunsystems reaktiviert entsprechende Organschäden zu verursachen.

Das Zytomegalievirus kann sich auch bei subklinischer Persistenz replizieren, so werden infektiöse Virus-Partikel oft über einen langen Zeitraum nach dem erstmaligen Kontakt in Körperflüssigkeiten wie Urin oder Speichel gefunden. Nicht zuletzt durch diese Fähigkeit des Virus ist die allgemeine Verbreitung sehr hoch, in einigen Regionen nahezu vollständig. Mit

zunehmendem Alter findet sich ein immer höherer Anteil CMV-seropositiver Personen, bei einer jährlichen Neuinfektionsrate in Deutschland von durchschnittlich etwa 2% [2]; jedoch findet ein Großteil der Erstkontakte bereits im Kindesalter statt. Auch die sozioökonomische Situation hat einen deutlichen Einfluss auf die Verbreitung des Zytomegalievirus, wobei in ärmeren und schlechter versorgten Gebieten die höchsten Infektionsraten beobachtet werden.

1.1.1 Verlaufsformen

Eine der wichtigsten klinischen Erscheinungsformen der symptomatischen CMV-Infektion ist die kongenitale Infektion [1,3,4]. Bei Erstinfektion der Mutter während der Schwangerschaft muss mit einer Koinfektion von bis zu 40% gerechnet werden [5], bei Seropositivität für CMV bereits vor Beginn der Schwangerschaft ist die kongenitale Infektion ein seltenes Ereignis, auch ist der klinische Verlauf oft deutlich milder.

Ein Großteil (etwa 90%, [4,6]) kongenital infizierter Neugeborener bleibt ohne klinisch-symptomatisch fassbare Erkrankung, auch der häufig initial milde Verlauf ist oft nicht eindeutig zu diagnostizieren und zeigt sich erst mit den ersten Lebensjahren z. B. in Form von Schwerhörigkeit und Entwicklungsverzögerung [7,8]. Etwa 5% der Kinder zeigen schon nach der Geburt irreversible neurologische Schäden und Zeichen intrauteriner Wachstumsverzögerung, oft sind auch Leber und die Hämatopoese (Thrombozytopenie) beteiligt. Sind diese Komplikationen in der Regel reversibel, kommt es mit den Fehlentwicklungen des Zentralnervensystems oft zu einer lebenslang gestörten psychomotorischen Entwicklung, Krampfleiden und schweren Hörverlusten.

Nachdem die Virus-Replikation bei gesundem Immunstatus eines asymptomatisch infizierten Erwachsenen in der Regel mit einer sehr geringen Rate verläuft, kann diese bei lang andauernder Immunsuppression unkontrolliert ansteigen und zu Erkrankungen verschiedener Organe führen [2,8]. Bei der allogenen Organtransplantation eines CMV-seropositiven Spenders an einen bisher nicht infizierten Empfänger besteht, unterstützt durch die gleichzeitige immunsuppressive Therapie, ein beträchtliches Risiko für eine symptomatische CMV-Reaktivierung. Für den Fall der Nierentransplantation findet man diese bei etwa 25% [9]. Primär ist hier das transplantierte Organ betroffen, womit es häufiger zur Abstoßungsreaktion kommt.

Auch bei der Knochenmarktransplantation spielt der Serostatus für CMV von Spender und Empfänger eine große Rolle. Neben der Reaktivierung bei bereits früher stattge-

fundener Infektion des Empfängers kann es auch bei positiver Serologie des Spenders zur symptomatischen CMV-Erkrankung des Empfängers kommen (Inzidenz 17%, [10]). Die besonders hier auftretende schwerwiegende CMV-Pneumonitis geht mit einer Mortalität von 70–80% [11] einher.

Davon abweichend findet sich bei Immundefizienz durch HIV-Infektion ein anderes Erscheinungsbild der klinischen CMV-Infektion. Ohne intensivierte antiretrovirale Therapie (sog. HAART) erkranken etwa 25% an einer hämorrhagischen CMV-Retinitis [12], Enzephalopathie und der symptomatische Befall der Spinalwurzeln sind deutlich seltener.

In wenigen Fällen kommt es auch bei normalem Immunstatus zu einer Erkrankung durch die primäre CMV-Infektion. Diese verläuft ähnlich wie die in der Regel durch Epstein-Barr-Virus (EBV) verursachte Mononukleose. Kommt es zwar zu Fieber (2–3 Wochen) und einer reaktiven Beteiligung der Lymphknoten, findet sich nur selten die typische Tonsillopharyngitis und Splenomegalie. Darüber hinaus ist der subklinische Verlauf einer CMV-Infektion mit dem Guillain-Barré-Syndrom und der Entstehung der Artherosklerose [13] assoziiert worden, beides konnte jedoch bisher nicht sicher belegt werden.

1.1.2 Therapieansätze

Besonders bei kongenitaler Infektion sowie durch die stetig steigende Anzahl von Organ- und Knochenmarktransplantationen wird die Frage nach einer effektiven therapeutischen Intervention oder einer Strategie zur Prophylaxe immer deutlicher. Bisher sind präemptiv und nach Ausbruch der CMV-Erkrankung direkte und indirekte DNA-Polymerase-Inhibitoren eingesetzt worden [8, 14]. Die umfangreichste klinische Erfahrung gibt es für den Einsatz von Ganciclovir (GCV, und dem Prodrug Valganciclovir für die orale Applikation, [4, 15]), auch Cidofovir (CDV) und Foscarnet (FOS) werden bei CMV-assoziierten Erkrankungen eingesetzt. Insgesamt ist der Erfolg mit allen genannten Wirkstoffen unbefriedigend, zusätzlich limitieren die toxischen Effekte (z. B. Myelodepression und Gonadotoxizität von Ganciclovir) und bereits beschriebene Resistenzentwicklung [16] besonders die prophylaktische Anwendung dieser Stoffe.

Die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien gegen das Zytomegalievirus basiert in vielen Fällen auf den immer tiefgreifenderen Erkenntnissen über die molekularen Zusammenhänge seiner Pathogenese. Bisher als einzige Substanz in diesem Sinne wird Fomiviren gegen die bei HIV-Infektion häufig beobachtete CMV-Retinitis eingesetzt [17]. Fomiviren ist

ein 21 Basenpaare langes, einer viralen mRNA komplementäres Oligonukleotid, und soll die Expression des für die Pathogenität des Virus essenziellen Zielproteins IE2 [18–20] inhibieren. Bei intravitrealer Applikation zeigt sich praktisch nebenwirkungsfrei eine vielversprechende Verbesserung der lokalen Organschädigung. Bei mangelndem Absatz wurde Fomivirsen jedoch 2002 vom europäischen Markt genommen.

Zytomegalieviren stehen in einer engen Symbiose mit ihren Wirtszellen (Kapitel 1.2), durch welche sie zu einer spezifischen Anpassung an diese gelangt sind. So haben sich für eine große Anzahl verschiedener Spezies unterschiedliche Zytomegalieviren entwickelt, die zwar deutliche Ähnlichkeiten für viele allgemeine Charakteristika teilen, jedoch treten bei der detaillierten Betrachtung einzelner funktioneller Proteine profunde Unterschiede in Struktur und Wirkungsweise zutage [2]. Auf Grund dieser Speziespezifität konnte bisher für humanes CMV (HCMV) kein Tiermodell entwickelt werden. Bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe (wie am Beispiel von Fomivirsen) ist die Übertragung der bei anderen CMV-Spezies gewonnenen Ergebnisse auf HCMV nicht möglich, solange keine ausreichenden Daten über die Vergleichbarkeit der entsprechenden Zielstrukturen einer solchen Therapie vorliegen.

Ein häufig verwendetes Modell für die Entwicklung neuer Medikamente und potenzieller Impfstoffe in diesem Zusammenhang ist das Zytomegalievirus der Maus (MCMV, [21, 22]), es soll im Rahmen dieser Arbeit vergleichend zu HCMV besprochen werden.

1.2 Biologie der Zytomegalieviren

In der Familie der Herpesviridae lässt sich die Gruppe der Zytomegalieviren abgrenzen, dessen Eigenständigkeit im allgemeinen Aufbau des Virion-Partikels sowie in der gemeinsamen Fähigkeit eine persistierende Infektion zu erreichen deutlich wird [2]. Mehr noch teilt die Unterfamilie der β -Herpesvirinae die strenge Speziespezifität sowie das für Zytomegalieviren typische ballonierende Größenwachstum infizierter Wirtszellen, den sog. zytopathischen Effekt (engl. *cytopathic effect*, *CPE*). Die Eigenständigkeit dieser Unterfamilie zeigt sich auch in der großen Homologie von etwa 70–80 offenen Leserastern (engl. *open reading frame*, *ORF*), hauptsächlich kodierend für Proteine der DNA-Replikation und für Virion-Strukturproteine [23–25].

1.2.1 Aufbau

Das Genom der Zytomegalieviren besteht aus einer einzelnen linear angeordneten Doppelstrang-DNA. Mit einer Länge von 200-240 kb (MCMV Stamm *Smith* mit 230.278 bp, [25]) gehören CMV zu den größten bisher beschriebenen Viren und zeichnen sich gegenüber Herpes-Simplex-Viren (HSV) entsprechend durch eine dichtere DNA-Kompaktierung im Virion aus. Für das Zytomegalievirus der Maus sind 170 ORFs (nach Start-Codon ≥ 300 bp ohne Stop) beschrieben (208 für HCMV Labor-Stamm *AD169*, [24, 26–28]). Das gesamte MCMV-Genom ist sequenziert (*National Center for Biotechnology Information* 004065), jedoch ist bisher nur ein kleiner Teil der darin kodierten Proteine funktionell näher beschrieben.

Das virale Genom wird von einer Nukleokapsid-Hülle in der Form eines Ikosaeders gefasst (Abbildung 1.1), welche aus sieben in der Herpes-Familie stark konservierten Strukturprotein-Typen aufgebaut wird. Darum lagert sich eine amorphe Matrix (sog. Tegument) aus mindestens 25 für die β -Herpesvirinae spezifischen Proteinen, die meisten Phosphoproteine. Nach Aufnahme des Virus-Partikels in die Wirtszelle werden diese Tegument-Proteine direkt freigesetzt. Für pUL69 und pp71 (HCMV) ist z. B. eine Funktionalität beschrieben, welche transkriptionell aktivieren kann [29].

Das gesamte Virus umgibt eine für die Herpes-Familie typische Doppel-Lipidmembran (engl. *Envelope*), in welcher eine Reihe von virus-kodierten Glykoproteinkomplexen eingelagert ist. Diese spielen bei der Aufnahme in die Wirtszelle, vor allem aber bei der Immunreaktion eine große Rolle [30, 31].

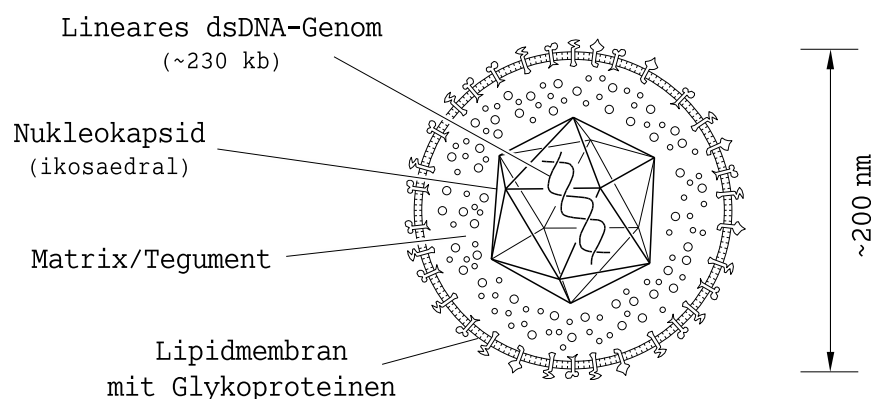


Abbildung 1.1: Allgemeine Struktur eines Zytomegalievirus, z. B. MCMV. Schematisch.

1.2.2 Der Infektions-Zyklus

Nach der Aufnahme des Virus-Partikels in die Wirtszelle wird das Nukleokapsid mit der viralen Genom-DNA im Zellkern gefunden (Abbildung 1.2); dort findet die Transkription der viralen Gene und die DNA-Replikation statt [2].

Die zuerst detektierbare transkriptionelle Aktivität findet hauptsächlich – getriggert durch Proteine der Tegument-Hülle – an einem speziellen Lokus des MCMV-Genoms statt, dem sog. *Major Immediate Early Promotor (MIEP)*. Gene, die ohne vorherige Expression anderer viraler Gene exprimiert werden können, nennt man in diesem Zusammenhang *Immediate Early (IE, α)*, insbesondere sind dies *M122* (IE3, homolog zu HCMV IE2), *m123* (IE1, homolog zu HCMV IE1) und ein nicht-homologes *m128* (IE2) [25]. Ihre Expression beginnt bereits etwa eine Stunde nach der Infektion (engl. *hours post infection, hpi*). Besonders für die IE-Genprodukte von HCMV sind viele unterschiedliche Funktionen beschrieben (im Detail in Kapitel 1.4), neben der Umstellung des Wirtszell-Milieus auf eine effiziente Virus-Replikation ist die Transaktivierung der sog. *Early*-Gene (β) bedeutsam. Deren Expression findet noch vor der viralen DNA-Synthese statt und liefert die dafür notwendigen Proteine.

Sind diese exprimiert, beginnt etwa 14–18 hpi [2] unterstützt von essenziellen zellulären Proteinen die Replikation der viralen DNA. Dafür sind die sechs von HCMV und HSV bekannten und stark konservierten Proteine auch im MCMV-Genom identifiziert worden [25]: DNA-Polymerase und assoziiertes Protein (M54 und M44), ssDNA-bindendes Protein (M57) und der Helikase-Primase-Komplex (M70, M102 und M105). Dem entgegen kodiert das MCMV-Genom ähnlich wie HCMV nicht für eine Reihe zur Nukleotidsynthese nötiger Proteine. Dihydrofolatreduktase, Thymidylatsynthase, Thymidinkinase und Ribonukleotid-reduktase müssen von der Wirtszelle bereitgestellt werden. Deren funktionelle Aktivierung durch die MCMV-Infektion konnte bereits nachgewiesen werden [32, 33].

Erst im Verlauf der DNA-Replikation beginnt die Expression der als *Late* (γ) bezeichneten Gene, welche vornehmlich für Hüll- und Strukturproteine kodieren. Auch die vermutlich für die initialen Regulationsvorgänge nach dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle nötigen Tegument-Proteine werden nun exprimiert [2, 34], um den Zusammenbau (engl. *Assembly*) neuer Virus-Partikel zu ermöglichen. Dieser findet selbst auch im Zellkern der Wirtszelle statt. Dabei wird zunächst das Nukleokapsid assembliert und nur in einem kleinen Teil der Fälle [2] findet eine Assoziation mit dem viralen Genom statt, wobei es demnach zu einem deutlichen Überschuss DNA-loser Partikel kommt. Die Lipidhülle des Virus stammt aus der

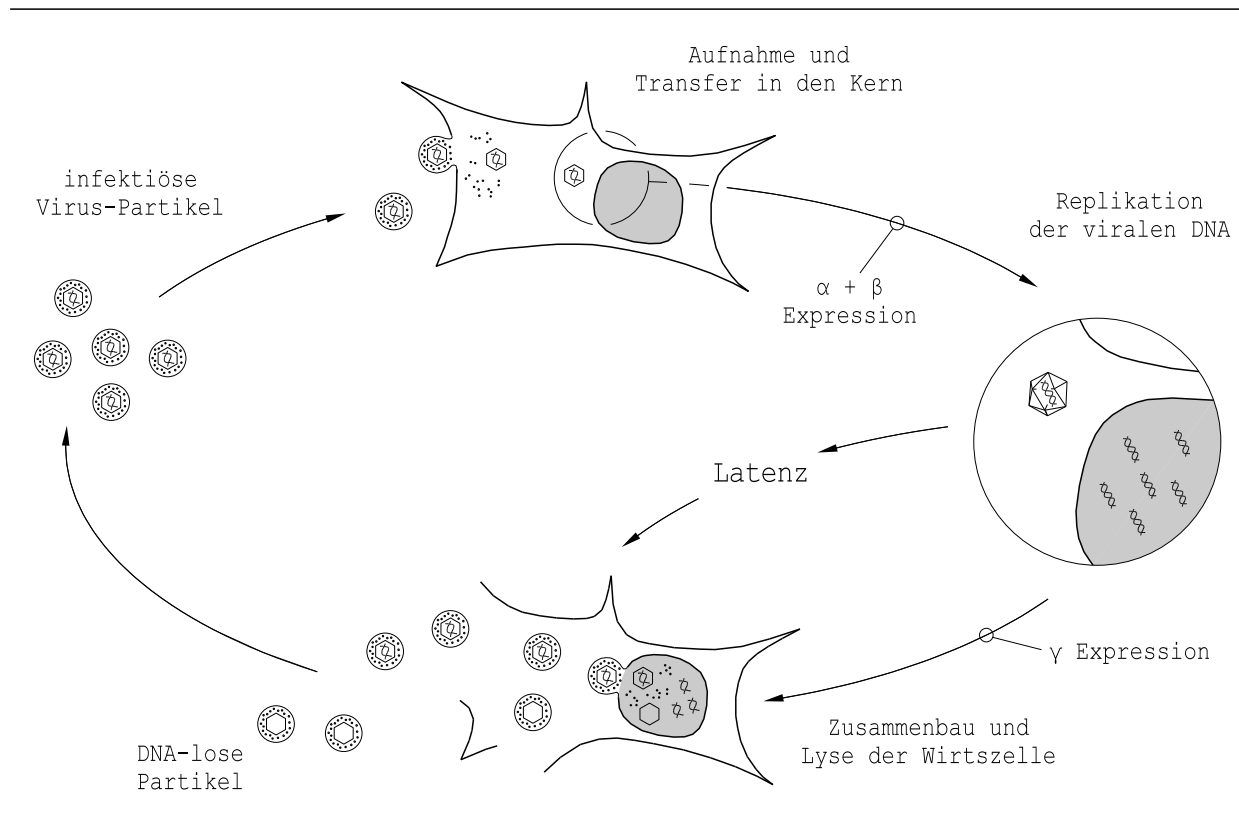


Abbildung 1.2: Der lytische Infektionszyklus der Zytomegalieviren, Erläuterung im Text. Zeitpunkte der Expression verschiedener viraler Proteinklassen (α , β und γ) sind markiert.

inneren Kernmembran der Wirtszelle und schließt neben dem Kapsid auch die Tegument-Proteine und zelluläre mRNA-Moleküle [35] ein, deren Funktion bisher nicht verstanden ist. Werden die Viren anschließend freigesetzt kommt es zur Lyse der Zelle, so bezeichnet man diesen Ablauf als *lytischen Zyklus*. Er dauert bei HCMV *in vitro* etwa drei Tage.

1.2.3 Persistenz und Latenz

Nach dem initialen Virus-Kontakt des Wirts, welcher z. B. über die Schleimhäute des Respirationstraktes stattfinden kann, kommt es zur raschen Verteilung der Viren in verschiedene Organe [36,37]. Ist die Immunabwehr des Wirts ausreichend kompetent, kommt es dort zwar zur Produktion infektiöser Viren, jedoch zeigt sich keine pathologische Veränderung der betroffenen Organe. Dieser subklinische Zustand mit Virusausscheidung – z. B. über Speichel und Muttermilch – wird als Persistenz bezeichnet [38] und demonstriert die feine Balance zwischen Verbreitung des Virus und Schädigung des Wirts, welche nicht zuletzt durch eine Reihe viraler Mechanismen unterstützt wird, die das Immunsystem des Wirts auf Zellebene modulieren [39,40]. Für HCMV kann diese Persistenz über Monate bis Jahre verlaufen [6].

Findet bei Vorhandensein viraler Genom-DNA im Zellkern keine Virus-Produktion und somit Ausscheidung statt, so spricht man von Latenz [38], der Ablauf des sonst lytischen Infektionszyklus (Abbildung 1.2) ist temporär unterbrochen, bei Immunkompetenz lebenslang. Die hier zugrunde liegenden Mechanismen und die der Reaktivierung eines lytischen Verlaufs bei Veränderung des Immunstatus sind bisher nur sehr unvollständig bekannt.

1.3 Der eukaryontische Zellzyklus

Da im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss einzelner MCMV-Proteine auf den Zellzyklus der Wirtszelle untersucht werden soll, wird im Folgenden hierzu ein Überblick skizziert.

Die Interphase zwischen zwei Mitosen einer eukaryontischen Zelle (Zellteilungszyklus, kurz Zellzyklus) lässt sich in drei Phasen gliedern, basierend auf der jeweils vorliegenden Stoffwechsellage und Ausrichtung der Zellfunktionen (Abbildung 1.3). Nach der erfolgreichen Teilung tritt die Zelle in die sog. G_1 -Phase ein (erste Lücke, engl. *Gap*). Hier finden die zelltypspezifischen RNA- und Protein-Syntheseleistungen statt, gleichzeitig beginnt auch die Vorbereitung auf die Verdopplung der Chromosomen. Mit Beginn der DNA-Replikation tritt die Zelle in die S-Phase ein (Synthese). Nach Verdopplung der DNA durchläuft die Zelle eine G_2 genannte Übergangsphase, die besonders dem weiteren Größenwachstum der Zelle und Kontrollfunktionen dient. Der Zyklus wird mit der eigentlichen Zellteilung (M-Phase, Mitose) abgeschlossen. Diese wird besonders nach morphologischen Aspekten in weitere Unterphasen gegliedert [41]. Bei einem gegebenen Zyklus von 24 Stunden dauern G_1 und die S-Phase jeweils ~ 10 h, $G_2 \sim 4$ h und die Mitose selbst nur $\sim 30'$.

Unter den Laborbedingungen der Zellkultur können Zellen in Abwesenheit adäquater Wachstumsfaktoren oder durch Kontaktinhibition von G_1 in eine als Quieszenz bezeichnete G_0 -Phase übertreten, in welcher sie auf unbestimmte Zeit verharren können. Durch gezielte Wachstumsreize können diese Zellen wieder in G_1 zurückkehren und mit der DNA-Replikation und Zellteilung fortfahren. Alle ausdifferenzierten und nicht mehr teilungsfähigen Zellen (z. B. Nervenzellen) befinden sich in G_0 .

1.3.1 Regulation auf molekularer Ebene: Die Zykline

Das Fortschreiten im Zellzyklus wird durch eine Reihe heterodimerer Proteinkinasen reguliert. Ihnen gemeinsam ist der Aufbau aus einer katalytischen Einheit (Zyklin-abhängige

und zum Nukleotidmetabolismus auch die regulatorischen Zykline E und A.

Zyclin E im Komplex mit Cdk2 ist selbst auch in der Lage Rb-Proteine zu phosphorylieren, so dass es hier zu einer durch positive Rückkopplung akzellerierten Aktivierung E2F-regulierter Gene kommt. Schreitet diese Schleife in der späten G_1 -Phase weiter fort, so ist ab einem bestimmten Aktivierungsniveau keine weitere externe Stimulation durch Wachstumsfaktoren nötig, der folgende Zyklusverlauf bis zum Abschluss der Mitose findet nun selbstständig statt und kann auch durch Wegnahme von Wachstumsfaktoren nicht mehr verhindert werden. Diesen Punkt nennt man daher Restriktionspunkt [45, 46].

Der Cdk-Inhibitor $p16^{INK4a}$ bindet spezifisch an Zyclin D-Cdk4/6-Komplexe und verhindert dadurch die weitere Phosphorylierung von Rb-Proteinen und arretiert so Zellen, die ansonsten zur Zellteilung stimuliert werden, bevor sie den Restriktionspunkt in der späten G_1 -Phase erreicht haben. Das Gleichgewicht zwischen Zyclin D, dem Rb-Protein und $p16^{INK4a}$ entscheidet maßgeblich über das Zustandekommen einer weiteren Zellteilung. Die physiologische Bedeutung dieser Faktoren für die Wachstumskontrolle wird vor allem auch dadurch aufgezeigt, dass inaktivierende Mutationen von Rb und $p16$ sowie die nicht kontrollierte Aktivierung von Zyclin D in der ganz überwiegenden Zahl aller humanen Tumoren gefunden wird.

Bei nun steigender Zyclin A-Konzentration wird der Zyclin A-Cdk2-Komplex durch inhibitorische Phosphorylierung der CDK-Untereinheit und durch verschiedene CKIs der CIP-Familie (engl. *Cdk Inhibitory Proteins*) zunächst noch inaktiv gehalten. Diese Mechanismen werden erst gegen Ende der G_1 -Phase aufgehoben. So wird das CKI p27 z. B. in der späten G_1 -Phase durch den Zyclin E-Cdk2-Komplex phosphoryliert und damit für die Degradierung nach Polyubiquitinierung markiert. Dem hingegen ist die Aktivierung der Cdc25A-Phosphatase [47] am G_1 -S-Übergang hauptverantwortlich für die Entfernung der inhibitorischen Phosphorylierung an Cdk2.

Schon im Verlauf der S-Phase steigt die Konzentration von Zyclin B langsam an [48], die Aktivität des entsprechenden Zyclin B-Cdk1-Komplexes wird jedoch wiederum durch inhibierende Phosphorylierung supprimiert. Zum Ende der G_2 -Phase wird der Komplex durch die Cdc25C-Phosphatase aktiviert und steuert nun den Eintritt und Verlauf der Mitose [49].

In der Mitose werden die Zykline A und B durch den sog. Anaphase Promoting Complex (APC) zur proteasomalen Degradierung markiert. Diese, wie auch der Abbau der S-Phase-inhibierenden Proteine der CIP-Familie am Ende der G_1 -Phase ist ein irreversibler Prozess

und ist einer der molekularen Mechanismen, die die Progression im Zellzyklus nur in eine Richtung erlaubt.

1.3.2 Kontrollpunkte im Zellzyklus

Unter genomischem Stress versteht man Vorgänge, die die korrekte Aufteilung der zellulären DNA auf Tochterzellen gefährdet oder verhindert. Genomischer Stress kann z. B. durch UV- oder γ -Strahlen oder durch alkylierende Substanzen (z. B. Doxorubicin) hervorgerufen werden. Kommt es hierzu, so existieren an verschiedenen Punkten im Zellzyklus Mechanismen die den weiteren Verlauf arretieren können, um nicht in der Mitose fehlerhafte Basen oder unvollständige Chromosomen weiterzuvererben [50]. In der Regel werden gleichzeitig vermehrt Proteine zur DNA-Reparatur exprimiert; ist die Schädigung allerdings zu umfangreich so wird ein Apoptose-Programm induziert.

Ein wichtiges Beispiel ist die Aktivierung der sog. ATM-Proteinkinase durch DNA-Strahlenschäden [51]. Sie aktiviert wiederum die Chk2-Proteinkinase welche durch Phosphorylierung spezifisch die bereits oben erwähnte Cdc25A-Phosphatase zur Degradierung markiert. Diese ist jedoch nötig, um Zyklin E/A-Cdk2-Komplexe durch Dephosphorylierung zu aktivieren und den G_1 -S-Phase-Übergang zu bewirken. So kommt es zum ATM-induzierten Arrest in der späten G_1 -Phase [52]. ATM und Chk2 sind Tumorsuppressor-Gene, die in vielen Tumor-Entitäten dereguliert vorliegen.

Ein weiteres wichtiges Substrat der ATM-Proteinkinase ist der Transkriptionsfaktor p53. p53 wird in unphosphorylierter Form rasch abgebaut und liegt konstitutiv somit in geringer Konzentration vor. Wird p53 jedoch z. B. nach DNA-Schädigung stabilisiert, so kommt es zur vermehrten Expression der durch p53 induzierten Proteine. Dazu zählen eine Reihe von DNA-Reparatur-Proteinen und p21^{CIP}, ein universeller Cdk-Inhibitor welcher das Fortschreiten des Zellzyklus in G_1 und G_2 arretiert. Darüber hinaus ist p53 in der Lage durch Förderung der Expression entsprechender Proteine Apoptose zu induzieren [53, 54].

Einige der wichtigen Kontrollpunkte im Zellzyklus wurden hier exemplarisch aufgeführt. Der Verlust solcher Mechanismen ist oft die Grundlage für das ungehinderte Wachstum von nicht-primären Zelllinien, wie sie im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden. Dies ist natürlich bei der Interpretation der Beobachtungen an derartigen Zelllinien zu berücksichtigen.

1.4 Einfluss von Zytomegalieviren auf den Zellzyklus

Einige DNA-Viren mit kleinem Genom, welche vollkommen auf die DNA-Replikationsproteine der Wirtszelle angewiesen sind, zeigen sich in der Lage eine Zellzyklusprogression in die S-Phase zu induzieren und dort die weitere Zyklusprogression zu arretieren, um ein optimales Milieu für die eigene Virus-Replikation zu schaffen. Besonders für Papilloma- und Adenoviren ist diese Art des Zellzykluseinfluss beschrieben [55]. Unter anderem nutzen diese Viren Proteine wie pRb und p53 als Angriffspunkt, indem sie durch deren Inaktivierung die Progression aus G_0 in die S-Phase unterstützen [56].

Zwar besitzen Zytomegalieviren wie beschrieben ein vergleichsweise großes Genom, so sind sie aber doch in gewissem Maß auf die Wirtsproteine zur DNA-Replikation angewiesen. Darüber hinaus dauert der lytische Zyklus vom ersten Virus-Zell-Kontakt bis zur Freisetzung neuer Viren außergewöhnlich lang (etwa 72 h). Beiden Bedingungen begegnet das Virus mit einem auf die Wirtszelle fein ausbalancierten System, um diese in ihrer Zellzyklusprogression derart zu steuern, dass ein optimales Milieu für die Virus-Replikation resultiert und gleichzeitig keine Apoptose induziert wird [57]. Auch für andere Herpesviridae (wie z. B. HSV und EBV) sind funktionell ähnliche Systeme beschrieben [58].

1.4.1 Zellzyklusregulation durch HCMV

Nach der Infektion von quieszenten Zellen (G_0) durch HCMV findet sich auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren eine rasche Induktion der Gene *fos*, *jun* und *myc* [59,60], welche sonst bei externer Mitogen-Stimulation beobachtet wird. Diese zur weiteren Zellzyklusprogression aktivierten Zellen akkumulieren jedoch später beim Übergang von G_1 in die S-Phase [61–64]. Dort finden sich zwar z. B. erhöhte Nukleotid-Konzentrationen, jedoch ohne Replikation der Wirts-DNA [63,65], ideale Bedingungen für die eigentliche Virus-Replikation.

Nach der Infektion induziert HCMV eine steigende Zyklin E-Konzentration und entsprechend assoziierte Cdk2-Kinaseaktivität [61]. Dies scheint ein essenzieller Mechanismus zu sein, da bei Gabe des Cdk-Inhibitors Roscovitin die Effizienz der Virus-Replikation stark inhibiert wird [66]. Darüber hinaus wird das pRb-Protein verstärkt exprimiert [67] und findet sich hauptsächlich hyperphosphoryliert (inaktiv, [61]), was zur Aktivierung der E2F-Transkriptionsfaktoren und damit zur Zellzyklusprogression beiträgt.

Auf der anderen Seite ist p53 erhöht [68], dies beruht auf einer Stabilisierung des Prote-

ins [69]. Es ist aber hier keine Induktion von p21 beobachtet worden, wie dies bei p53-Anstieg zu erwarten wäre [70]. Weiterhin ist die Zyklin A-assoziierte Kinaseaktivität reprimiert [61], diese könnte für den Arrest am G_1 -S-Übergang eine wichtige Rolle spielen. Zyklin B-Cdk1/2-Kinaseaktivität ist nach HCMV-Infektion deutlich gesteigert [61, 64], jedoch ist die Auswirkung auf den Zellzyklusverlauf unklar.

Für die feine Abstimmung in einem schwer zu fassenden Zustand zwischen G_1 und S-Phase finden sich nach HCMV-Infektion also gegenläufige Veränderungen in für die normale Zyklusregulation wichtigen Mechanismen.

1.4.2 Zellzyklus-Aktivität einzelner HCMV-Proteine

Der dargestellte Einfluss durch das Zytomegalievirus auf den Zellzyklusverlauf wird durch eine Reihe unterschiedlicher viraler Proteine bewirkt. Prinzipiell kommen hierbei verschiedene Proteingruppen in Frage: Glykoproteine der Hüllmembran welche als erste Kontakt mit der Wirtszelle haben, Proteine der Tegument-Matrix die nach Aufnahme des Virus direkt ins Zytoplasma freigesetzt werden und Proteine, welche sehr früh im Infektionszyklus exprimiert werden, besonders Proteine der *Immediate Early*-Klasse, prinzipiell auch *Early*-Proteine. Bei der initialen Unterscheidung half die Beobachtung, dass DNA-lose Virus-Partikel in der Lage sind quieszente Zellen aus G_0 zur weiteren Zellzyklusprogression zu stimulieren, jedoch ohne den sonst typischen G_1 /S-Arrest zu bewirken [71]. Diese Funktion schien also ohne Expression viraler Proteine bestehen zu bleiben. Bisher sind vier wichtige HCMV-Proteine beschrieben, die in ihrer Aktivität den Ablauf des Wirtszellzyklus beeinflussen können, davon zwei Tegument-Proteine (pUL69 und pp71) sowie zwei *Immediate Early*-Proteine (IE1 und IE2).

Für das Protein der Tegument-Struktur pUL69 ist eine G_1 -arretierende Funktion beschrieben worden, welche sich gegenüber zusätzlicher Serumstimulation dominant verhält [72]. Im Gen *UL69* deletierte Viren sind zwar in der Lage einen entsprechenden Zyklusblock zu produzieren, jedoch mit deutlich geringerer Effizienz [73]. So scheint dieser Faktor lediglich einen additiven Effekt bei der gemeinsamen Einflussnahme auf den Wirtszellzyklus zu haben, erklärt aber nicht die progressionsfördernde Wirkung DNA-loser Virus-Partikel.

Das auch im Tegument lokalisierte pp71 (HCMV-Gen *UL82*) ist in der Lage hypophosphorylierte Proteine der RB-Familie (p107 und p130) zu binden und so für die anschlie-

ßende Degradierung zu markieren [74]. Aus anderen Virus-Familien sind ebenfalls Faktoren bekannt, welche Proteine der RB-Familie über das konservierte Aminosäure-Motiv LxCxE binden (z. B. Adenovirus E1A-Protein, Papillomavirus E7-Protein). Dieses findet sich in abgewandelter Form (LxCxD, Glutamat→Aspartat) auch bei pp71. Mit der funktionellen Inaktivierung von RB-Proteinen ist es so in der Lage über E2F-Aktivierung in quieszenten Zellen eine Progression in die S-Phase zu bewirken [75] und dabei zusätzlich den G₁-Verlauf zu beschleunigen [76]. Darüber hinaus induziert pp71 die Transkription am *Major Immediate Early Promotor* (MIEP) und trägt somit zur Expression von IE1 und IE2 maßgeblich bei.

Die wichtigen *Immediate Early*-Gene IE1 und IE2 zeigen beide eine enorme Vielfalt unterschiedlicher Funktionen, Gemeinsamkeit findet sich neben der Kinase-Funktion unter anderem in der Fähigkeit die Transkription viraler und eukaryontischer Gene zu modulieren sowie auf unterschiedliche Weise mit Proteinen der RB-Familie und p53 zu interagieren [77]. Die ersten 85 N-terminalen Aminosäuren sind für IE1 und IE2 identisch.

Für die prinzipielle Virus-Replikation ist das IE1-Protein (auch IE72, HCMV *UL123*) nicht essenziell [77]. Es ist aber z. B. in der Lage p107 zu binden [78] und somit dessen E2F-inaktivierende Funktion zu unterdrücken. Zusätzlich bindet IE1 E2F-1 direkt, was in diesem Zusammenhang mit der verstärkten Transkription S-Phase-spezifischer Gene (z. B. der Dihydrofolatreduktase) assoziiert ist [79]. Auch die Phosphorylierung von p107, p130 und verschiedenen Proteinen der E2F-Familie führt letztendlich zur Aktivierung der RB-E2F-gesteuerten Zyklusprogression. Die Veränderung des Chromatins durch IE1 über direkte Interaktion mit einer Histondeacetylase [80] kann ein Grund für die aktivierende Wirkung auf die Transkription verschiedener viraler und zellulärer Gene sein.

IE2 (auch IE86, HCMV-Gen *UL122*) ist der entscheidende Faktor für die Interaktion mit der Zyklusprogression der Wirtszelle. Es konnte gezeigt werden, dass er essenziell für den lytischen Infektionszyklus ist [18]. Im Vergleich zeigt IE2 sehr ähnliche Charakteristika im Einfluss auf den Zellzyklus der Wirtszelle wie die Infektion mit dem vollständigen Virus: proliferationsfördernd in G₀ und früher G₁-Phase sowie Arrest am G₁-S-Übergang [19]. Hier zeigte sich, dass IE2 in der Lage ist eine Progression über den Restriktionspunkt zu induzieren, gleichzeitig aber die zelluläre DNA-Replikation zu verhindern und so vom S-Phase-typischen Milieu zu dissoziieren [20].

Ähnlich wie pp71 und IE1 ist IE2 in der Lage mit Proteinen der RB-Familie zu interagieren, es findet sich jedoch für diese Funktion bei IE1 und IE2 im Gegensatz zu pp71

kein typisches oder abgewandeltes LxCxE-Motiv [81]. IE2 ist in der Lage besonders hypophosphoryliertes pRb spezifisch zu binden und somit indirekt E2F-gesteuerte Gene zu aktivieren [82]. Darüber hinaus bindet IE2 p53 und scheint es damit zu stabilisieren, es kommt z. B. zur Induktion von p21 [83]. Die G₁-S-arretierende Wirkung von IE2 ist sogar auf ein funktionierendes zelluläres p53 angewiesen. Auf das System der Zykline, Cdks und CKIs zur physiologischen Regulation des Zellzyklus hat das IE2-Protein sehr unterschiedliche Einflüsse [61]. Ähnlich wie Zyclin D ist es in der Lage die Zyclin E-Expression zu erhöhen – entsprechend die assoziierte Cdk2-Kinaseaktivität [84] – und die Inhibitoren p21 und p27 zu reprimieren, was zu der allgemein progressionsfördernden Wirkung des Proteins passt. Auch Zyclin B ist deutlich erhöht, seine Relevanz bei der Zellzyklus-Modulation außerhalb des G₂-M-Übergangs ist aber unklar. Zyclin A wird in den meisten Untersuchungen vermindert gefunden [85] was ein Mechanismus für den beobachteten G₁-S-Arrest sein könnte.

IE2 ist darüber hinaus in der Lage E2F-unabhängig die Transkription zu modulieren, so z. B. über direkte Interaktion mit TBP (engl. *TATA-Binding Protein*) [86]. Es ist ein Hauptfaktor bei der Aktivierung der viralen β - und γ -Gene, fungiert aber gleichfalls autoregulierend in dem es die Transkription der *Immediate Early*-Gene am MIEP durch direkte DNA-Bindung reprimiert [87].

Für das durch das Virus fein regulierte Gleichgewicht zwischen proliferativen und anti-proliferativen Einflüssen auf den Wirtszellzyklus finden sich bei den beschriebenen Proteinen eine Vielfalt unterschiedlicher und nicht selten gegenläufiger Funktionen: für pUL69 die deutlich arretierende Wirkung, entgegen der progressionsfördernden Funktion von pp71 und IE1. Die überaus komplexe Wirkungsweise des IE2-Proteins zeigt fördernden und hemmenden Einfluss auf das Zyklusverhalten der Wirtszelle.

1.4.3 Einfluss auf den Zellzyklus durch andere CMV-Spezies

Für das Zytomegalievirus der Maus sind verschiedene Proteine untersucht und deren Homologien zu HCMV-Faktoren beschrieben [25]. Es gibt bereits gute Kenntnisse über die MCMV-Pathogenese und deren Vergleich mit HCMV [22]. Im Rahmen dieser Arbeit sollen ausschließlich Proteine von MCMV untersucht werden.

In einer direkten Vorarbeit [88, 89] wurde der allgemeine Einfluss von MCMV auf den Zellzyklusverlauf der Wirtszelle untersucht. Hier konnte der von HCMV bekannte Arrest beim G₁-S-Übergang ebenfalls deutlich gezeigt werden, zusätzlich akkumulierten infizierten Zellen mit einem doppelten DNA-Gehalt in G₂, ohne Zeichen für eine beginnende Mitose.

Ähnlich wie nach HCMV-Infektion konnte für MCMV eine gesteigerte Zyklin E-assoziierte Kinaseaktivität, jedoch keine erhöhten Zyklin E-Konzentrationen gefunden werden, dies konnte auf gesteigerte Zyklin E-Phosphorylierung zurückgeführt werden. Auch für die Zykline A und B konnte ohne wesentlich erhöhte Konzentration eine deutlich gesteigerte Cdk1-assoziierte Kinaseaktivität detektiert werden, dies konnte durch die nach Infektion beobachtete Dephosphorylierung von Cdk1 erklärt werden. Vergleichend muss die im Gegensatz zur HCMV-Infektion gesteigerte Zyklin A-assoziierte Kinaseaktivität erwähnt werden.

Für einzelne Proteine von MCMV sind bisher — besonders im Vergleich zu homologen HCMV-Proteinen — ähnliche aber auch gänzlich unterschiedliche Funktionen beschrieben. Besonderes Augenmerk liegt hier auf solchen Eigenschaften, die Einfluss auf den Zellzyklus der Wirtszelle zeigen. Für die in dieser Arbeit untersuchten Proteine (IE1, IE2 und IE3 sowie M69, M82 und M83) soll über diese Grundlagen hier ein Überblick skizziert werden, die eigentliche Auswahl dieser Proteine und die dabei zugrunde gelegenen Argumente werden in Kapitel 3.2 dargestellt.

Die *Immediate Early*-Gene von MCMV und deren Produkte sind erstmals gemeinsam in [90–93] beschrieben worden. Das IE1-Protein wurde mit einer Größe von 89 kDa beschrieben. Es konnte ein allgemeiner Einfluss auf Ebene der Transkription festgestellt werden, eventuell in Zusammenhang mit der Fähigkeit von IE1 direkt DNA zu binden [94]. Darüber hinaus wird durch IE1 die Expression von *c-fos* und generell die DNA-Synthese stimuliert [95], der genaue Einfluss auf den Zellzyklusverlauf der Wirtszelle durch diese Effekte ist jedoch unbekannt. IE1 ist für die Virus-Replikation essenziell. Es finden sich keine Übereinstimmungen in der Sequenz zu HCMV-Genen.

Das IE2-Protein (43 kDa, [92]) findet keine Entsprechung im HCMV-Proteom. Es steht

wie IE1 und IE3 unter dem Einfluss des *Major Immediate Early Promotors (MIEP)*, es finden sich aber nur geringfügige Homologien zu Proteinen der US22-Familie (siehe Kapitel 3.2). IE2 ist für die Virus-Replikation entbehrlich [96], dort ist aber eine expressionsaktivierende Funktion beschrieben. Über den Einfluss auf den Zellzyklus der infizierten Zelle ist bisher nichts bekannt.

Deutliche Übereinstimmungen zwischen dem wichtigsten *Immediate Early*-Protein von HCMV (IE2_{human}) und dem IE3-Protein von MCMV (88–90 kDa, [93]) haben früh die Vermutung aufgeworfen, dass es sich auch hier um einen entscheidenden viralen Faktor handelt. Nach Deletion im entsprechenden *IE3*-Lokus [97] ist keine virale Replikation mehr beobachtet worden. Wenn auch andere *Immediate Early*-Gene (α) transkribiert wurden, so fand sich bei *IE3*-Deletion keine Expression von β - und γ -Proteinen, was ähnlich wie bei IE2_{human} auf eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der viralen Genexpression deutet. IE3 ist in der Lage seine eigene Expression durch Autorepression zu regulieren.

Für die HCMV-Tegumentproteine pp71 (*UL82*) und pp65 (*UL83*) gibt es bei MCMV die drei Homologe M82, M83 und M84 [98]. Für pp71 ist — wie oben besprochen — Einfluss auf den Zyklusverlauf einer infizierten Zelle beschrieben, so sollen in dieser Arbeit lediglich die ihm homologen M82 und M83 untersucht werden. Bisher sind für diese beiden Proteine nur Funktionen im Rahmen der Immunreaktion untersucht worden, für deren Relevanz im Bezug auf den Zellzyklus ist nichts bekannt.

Für das HCMV-Protein pUL69 gibt es im Homologievergleich auf Ebene der Aminosäuren (siehe Kapitel 3.2) mit dem Protein M69 eine Entsprechung im MCMV-Proteom, jedoch ist dieses bisher nicht weiter untersucht und soll so in dieser Arbeit erstmals funktionell charakterisiert werden.

Eine Zusammenfassung über den Einfluss von HCMV, dessen Proteinen und den allgemeinen Einfluss von MCMV auf den Wirtszellzyklus gibt Tabelle 4.2 auf Seite 72. Dort wird der hier umrissene Vorkenntnisstand mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit besprochen.

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die bekannten Zusammenhänge bei der Interaktion des Zytomegalievirus der Maus und dem Zellzyklus der Wirtszelle mit den Funktionen einzelner MCMV-Proteine zu erklären. Dazu sollte eine Reihe potenzieller Faktoren als Kandidaten auf ihren Einfluss auf die unterschiedlichen physiologischen Mechanismen zur Regulation der Zyklusprogression hin untersucht werden. Es sollte geklärt werden, in wie weit diese Proteine in der Lage sind die für die Infektion mit MCMV typischen Veränderungen im DNA-Profil der untersuchten Population zu bewirken. Davon ausgehend wurde das für den Zellzyklus grundlegende Zyklin-Cdk-System auf Veränderungen durch diese Proteine untersucht. Letztendlich sollte eine vergleichende Darstellung der molekularen Prozesse zwischen HCMV und MCMV möglich werden, um eine bessere Vorhersagbarkeit bei der Übertragung von Kenntnissen aus dem Tiermodell in die klinischen Fragestellungen zu erzielen.

MCMV-Faktoren mit Homologie zu den bei HCMV zellzyklusrelevanten Proteinen sollten in eukaryontische Expressionsvektoren kloniert werden. Die transiente Transfektion dieser Plasmide in eine Reihe unterschiedlicher Zelllinien diene als wichtige Untersuchung des Zellzykluseinfluss der exprimierten Proteine. In den transfizierten Zellen sollten daneben Veränderungen der Zyklin-Konzentrationen für E, A und B sowie der assoziierten Kinaseaktivitäten analysiert werden um mögliche Wirkmechanismen aufdecken zu können.

Diese Expressionsvektoren sollten weiterhin als Werkzeug zur Identifizierung von siRNAs für die weitere Untersuchung dieser Proteine während der MCMV-Infektion eine methodische Hilfe liefern.

Im Rahmen einer Struktur-Funktionsanalyse sollten die für die untersuchten Zellzyklus-Funktionen relevanten Gen-Abschnitte näher eingegrenzt werden.

Mit dieser Arbeit sollten die bekannten Effekte verschiedener HCMV-Proteine und Einflüsse durch HCMV- und MCMV-Infektion auf den Zellzyklus durch Charakterisierung einzelner MCMV-Proteine ergänzt werden.

Kapitel 2

Methoden und Material

2.1 Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurden entweder aus Fremdquellen bezogen (siehe 2.1.8) oder aber wie im Folgenden beschrieben selbst hergestellt. Alle Plasmide wurden durch die unter 2.1.7 beschriebene Prozedur amplifiziert, um für die Transfektion ausreichende Mengen zu erhalten.

Die Grundstruktur der Plasmide wird in Abbildung 2.1 am Beispiel des *pSG5-3HA-IE1*-Vektors verdeutlicht, und folgt damit dem üblichen Aufbau eines eukaryontischen Expressionsplasmids [99]. In einen bereits vorhandenen Leervektor *pSG5-3HA* (*Stratagene*, in der Abbildung grau gezeigt), wurde die entsprechende Ziel-DNA (schwarz) eingesetzt. Für *M69* wurde *pCI-neo-3HA* (*Promega*) als Leervektor benutzt. Als funktionelle Bestandteile des Plasmids finden sich dann:

Ampicillin	Ampicillin-Resistenz-Gen für die Selektion in der Bakterienkultur.
SV40/SV40 ori	Promotor und Replikationsursprung (engl. <i>Origin of Replication</i>) für die Vervielfältigung des gesamten Plasmids in der Bakterienkultur.
T7-Promotor	Promotor für Expression der Ziel-DNA in der eukaryontischen Zelle.
3HA-Tag	Marker im Protein zur Kontrolle der Expression (engl. <i>Epitope Tagging</i>) [100,101], war bereits in den verwendeten Leerplasmiden einkloniert [102].
IE1-cDNA	Sequenzvorlage für das Kandidaten-Protein.

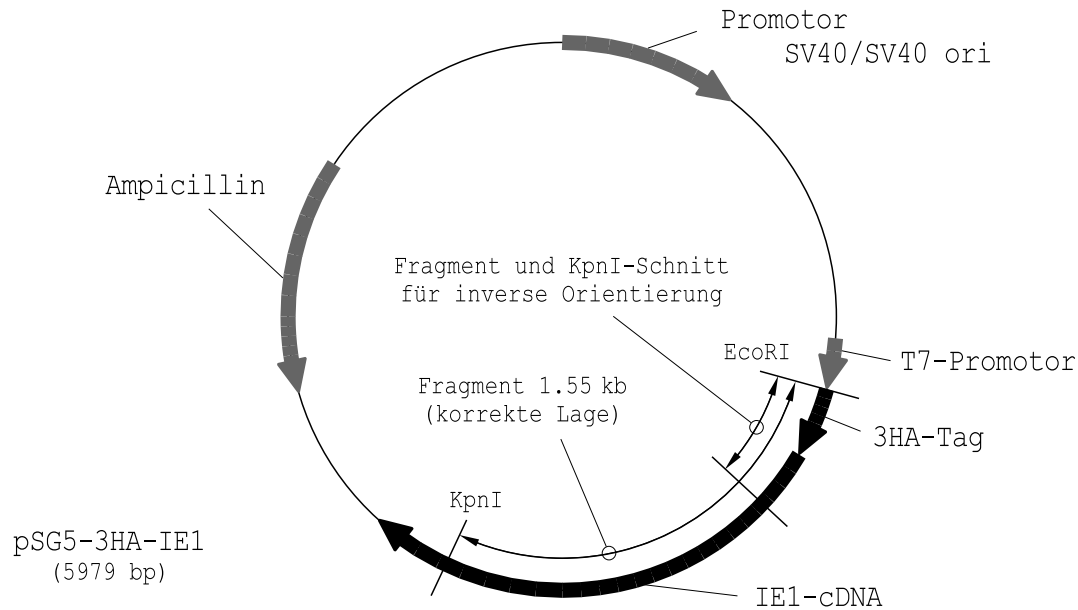


Abbildung 2.1: Am Beispiel des *pSG5-3HA-IE1*-Vektors ist der allgemeine Aufbau der verwendeten Plasmide gezeigt. Elemente des ursprünglichen Plasmids grau, Insert schwarz. Längen nicht im Maßstab. Das im Ring gezeigte Verhalten bei Restriktionsverdau wird in 2.1.5 erläutert.

Die Präparation der Plasmide begann mit der Aufbereitung eines für das entsprechende Kandidaten-Gen adäquaten DNA-Fragments (engl. *Template*). Der Einsatz dieses Templates in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *PCR, Polymerase Chain Reaction*) lieferte die spezifische Ziel-DNA, die in einer anschließenden Ligase-Reaktion in das Leerplasmid (*pSG5* bzw. *pCI-neo*) eingesetzt wurde. Das so gewonnene Plasmid wurde nach Elektroporation in einer Bakterienkultur amplifiziert und präpariert. Die Kontrolle fand durch abschließenden Restriktionsverdau und Sequenzierung der Ligationsstellen und der eingesetzten Ziel-DNA (engl. *Insert*) statt. Die einzelnen Schritte werden nun näher erläutert.

2.1.1 Die Vorlage der Sequenzen

Die Quelle für die den Zielproteinen entsprechenden cDNAs für die Gene ohne Introns (*M82*, *M83* und *M69*, siehe Tabelle 2.1) lieferte eine fünf Tage zuvor mit MCMV-Virus infizierte Zellkultur (3T3-Zellen, fünf 150mm-Schalen). Ziel war hier einen möglichst vollständigen zytopathischen Effekt (engl. *Cytopathic Effect, CPE*) zu erreichen. Die Zellmembranen wurden durch Einfrieren (-80°C) und Auftauen aufgeschlossen, 15' bei 7500 rpm zentrifugiert um die groben Zellstrukturen zu entfernen (das Pellet wurde verworfen). Nachfol-

Plasmid	Herkunft des Templates
<i>pSG5-3HA-IE1</i>	<i>pSG62-pp89-orf</i> von Herrn Dr. M. Messerle [103]
<i>pSG5-3HA-IE2</i>	Reverse Transkription aus MCMV-infizierten 3T3-Zellen
<i>pSG5-3HA-IE3</i>	Frau Dr. J. Asmar [104] (nur überprüfend sequenziert)
<i>pSG5-3HA-M82</i>	Virus-Präparation (infizierte 3T3-Zellen)
<i>pSG5-3HA-M83</i>	Virus-Präparation (infizierte 3T3-Zellen)
<i>pCI-neo-3HA-M69</i>	Virus-Präparation (infizierte 3T3-Zellen)

Tabelle 2.1: Herkunft der für die entsprechenden Ziel-Proteine kodierenden DNA-Sequenzen

gende Zentrifugation (90' bei 13000 rpm) sammelte nun die Virus-DNA im Pellet, welches in 10 ml 0,2% FCS (Fetales Kälberserum, engl. *Fetal Calf Serum*) aufgenommen wurde. Dies wurde mit 100 µl DNase (10000 U/ml) und 100 µl RNase (10 mg/ml) 15' bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (90' bei 16000 rpm). Das neue Pellet wurde in 2,7 ml TE (pH 9,0) aufgenommen und 300 µl SDS/Proteinase K (10% SDS, 5 g/l Proteinase K) zugeben. Dieser Ansatz wurde zwei Stunden bei 55°C inkubiert und dann zweimal mit Phenol (1:1) und einmal mit Chloroform (1:1) ausgeschüttelt. Die endgültige DNA-Fällung wurde nun durch 0,1 Volumen 3M Natriumacetat und 2,5 Volumen eiskalten Ethanol und Zentrifugation (5' bei 13000 rpm) bewirkt und in 50 µl TE (pH 8,0) aufgenommen. Für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden 0,5 µl eingesetzt. Der beschriebene Ablauf folgte mündlicher Instruktion durch Herrn Dr. S. Voigt.

Wie Tabelle 2.1 zu entnehmen, wurde für das Gen *IE1* ein Expressionsplasmid von Herrn Dr. M. Messerle [103] als Vorlage benutzt, auch hier wurden 0,5 µl als Template verwendet. Das Expressionsplasmid für *IE3* wurde bereits von Frau Dr. J. Asmar [104] hergestellt und unverändert benutzt, es wurde lediglich zur genauen Charakterisierung sequenziert (2.1.6).

Als Quelle für die *IE2*-Sequenz (in vivo mehrere Exons) diente eine mit MCMV infizierte 3T3-Zellkultur. Daraus wurde durch eine Reverse-Transkriptions-Reaktion (sog. *RT-PCR*) von der entsprechenden *IE2*-mRNA die cDNA generiert (Abbildung 2.2). Für die Isolierung der mRNA wurde das TRI REAGENT (*Molecular Research Center, Inc.*) benutzt [105,106]. Dazu wurde eine 150mm-Schale einige Tage zuvor infizierter konfluenter 3T3-Zellen durch Trypsinisierung geerntet (2.2.1), sofort in 1 ml TRI REAGENT aufgenommen und durch Inkubation 5' bei Raumtemperatur (RT) lysiert. Der Ansatz wurde mit 200 µl Chloroform kräftig aufgeschüttelt und weitere 10' bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation (15', 12000 g, 4°C) wurde die RNA in der oberen wässrigen Phase abgetrennt und konnte mit 0,5 Volumen Isopropanol ausgefällt (10' bei RT) und abzentrifugiert (10' bei 12000g) werden. Nach kurzem Waschen (75% Ethanol) wurde die RNA in H₂O aufgenommen.

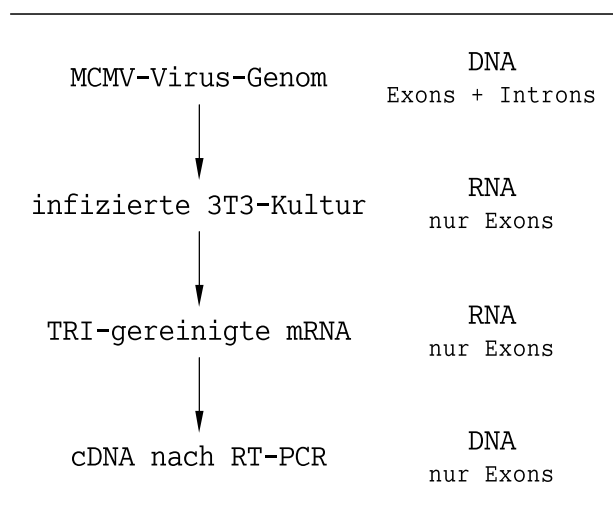


Abbildung 2.2: Die Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde mit dem *First-Strand cDNA Synthesis Superscript Pre-amplification System* der Firma *Gibco BRL* durchgeführt [107, 108]. Von der zuvor aufgereinigten mRNA-Präparation wurden dazu 5 µg (vgl. DNA-Bestimmung in 2.1.7) eingesetzt und auf 13 µl mit H₂O aufgefüllt. Durch Zugabe von 1 µl *oligo-dT* wird der poly-A-Schwanz der mRNA-Stränge komplementär als Start einer Polymerase-Reaktion markiert, ähnlich der Funktion eines Primers bei der PCR. Die Anlagerung fand bei 70°C statt (10').

Für die eigentliche Reverse Transkription wurden nun dem Ansatz 4.5 µl *first strand buffer*, 1 µl 10 mM *dNTP mix*, 2 µl 0,1 M DTT und zum Start der Reaktion 1 µl SuperScript II RT (Reverse Transkriptase, 200 U/µl) beigelegt und für 10' bei RT inkubiert. Die Elongation fand bei 42°C statt (50'), 15' bei 70°C beendete diesen Schritt. Die RNA im Ansatz konnte nun durch RNase H (1 µl, 20' bei 37°C) entfernt werden. Vom Reaktionsprodukt wurden auch 0,5 µl als Template in der folgenden PCR eingesetzt.

2.1.2 PCR

Allgemeine Prinzipien der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *PCR*) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden umfassend beschrieben [99, 108–110]. Für die Reaktion wurden 10 µl 10×-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9.0, *Amersham Biosciences*), 8 µl dNTP-Mix (10 mM, *Amersham*) und je Primer (Tabelle 2.2) 1 µl (vorverdünnt auf 100 pmol/µl) eingesetzt. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt, für einige Ansätze die MgCl₂-Endkonzentration auf 2,5–3 mM gehoben werden (25 mM MgCl₂, *Amersham*). Nach Zugabe des entsprechenden Templates (0,5 µl) wurde nach 60 sec *Hot Start* (Vorheizen auf 72°C) 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (5000 units/ml, *Amersham*) zugegeben und die eigentlichen Zyklen gestartet. Es wurde der *Mastercycler Gradient* (*Eppendorf*) verwendet, bei insgesamt 35 Zyklen mit 60 sec Denaturierung (95°C), 90 sec Anlagerung (engl. *Annealing*, 55°C) und 120 sec Elongation (Taq-Optimum bei 72°C). Das Reaktionsprodukt wurde im *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*) gereinigt und im Agarose-Gel bestätigt.

Gen (Enzym)	F-Primer, darunter R-Primer
<i>IE1</i> (BamHI)	$ \begin{array}{l} \text{Überhang} \quad \text{BamHI} \quad \text{Start} \quad \text{kodierende Sequenz} \\ 5'\text{-}\overbrace{\text{CTGA}}^{\text{Überhang}} \quad \overbrace{\text{G}_{\uparrow}\text{GATC}^{\downarrow}\text{C}}^{\text{BamHI}} \quad \overbrace{\text{ATG}}^{\text{Start}} \quad \overbrace{\text{GAG CCC GCC GCA CCC AGT}}^{\text{kodierende Sequenz}}\text{-3'} \\ 5'\text{-}\overbrace{\text{CTGA}}^{\text{Überhang}} \quad \overbrace{\text{G}_{\uparrow}\text{GATC}^{\downarrow}\text{C}}^{\text{BamHI}} \quad \overbrace{\text{TCA}}^{\text{Stop}} \quad \overbrace{\text{CTT CTT GCT CTT CTT CTT GG}}^{\text{kodierende Sequenz, komplementär}}\text{-3'} \end{array} $
<i>IE2</i> (BclI)	$ \begin{array}{l} 5'\text{-CTGA TGATCA ATG GAG CGT GTT CGG GGA GCT-3'} \\ 5'\text{-CTGA TGATCA TCA CTG AAT CTT CTT CCT GAC-3'} \end{array} $
<i>M82</i> (BclI)	$ \begin{array}{l} 5'\text{-CTGA TGATCA ATG GCC GAG GAA TTT AAC TTC-3'} \\ 5'\text{-CTGA TGATCA TCA GGG TTG TAG ATG TGG GGG-3'} \end{array} $
<i>M83</i> (BglII)	$ \begin{array}{l} 5'\text{-CTGA AGATCT ATG AAC GCC ATG AAC AAC AGG-3'} \\ 5'\text{-CTGA AGATCT TCA TGA ACG CAG CAG TCC CCG-3'} \end{array} $
<i>M69</i> (SalI + NotI)	$ \begin{array}{l} 5'\text{-ATGC CTCGAC ATG CTG CGG ACC GGC GTC AAG-3'} \\ 5'\text{-ATAC GCGGCCGC TCA GTC AGA GTC CAT CTC GCT-3'} \end{array} $

Tabelle 2.2: Die verwendeten Primer für die PCR, funktionelle Einheiten sind am Beispiel von *IE1* gezeigt, nähere Erläuterungen dazu im Text. Die in Klammern angegebenen Enzyme wurden zum Öffnen der Fragmente für die anschließende Ligation eingesetzt. F-Primer für den Vorwärts-Strang (engl. *forward*), R-Primer für den Rückwärts-Strang (engl. *reverse*).

Die Konstruktion der Primer wird in Tabelle 2.2 am Beispiel von *IE1* verdeutlicht. Ein Überhang von 4 Basen erleichtert die Restriktion durch das Enzym ohne die Anlagerung zu behindern. Die spezifische Restriktions-Schnittstelle wurde derart gewählt, dass nach dem Schneiden ein entsprechender Überhang für die anschließende Ligation entsteht. Nach dem Start- bzw. Stop-Codon wurden weitere 18–21 Basen aus der bekannten Sequenz [25] für die entsprechenden Gene gewählt um eine ausreichende Anlagerung zu gewährleisten.

2.1.3 Ligation

Zunächst wurden die Inserts durch die in Tabelle 2.2 angegebenen Restriktionsenzyme aufgeschnitten, in einer getrennten Reaktion wurden die Leerplasmide geschnitten. Dabei wurde dem allgemeinen Protokoll für einfache bzw. kombinierte Restriktionsreaktionen der Firma *New England BioLabs* gefolgt, von welcher auch die entsprechenden Enzyme und Puffer bezogen wurden. Für das Öffnen von *pSG5-3HA* wurde BglII, für *pCI-neo-3HA* SalI und NotI benutzt, anschließend wurde die reaktive 5'-Phosphat-Gruppe der offenen Plasmid-Ringe geschnitten um die Religation zu verhindern. Dafür wurde dem Restriktionsverdau 1 µl Phosphatase (*CIP, Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Fermentas*) zugesetzt und 30'

bei 30°C inkubiert, Reaktionsstop durch 85°C über 15' [99,111].

Um die Fragmente für die Ligation aufzubereiten wurden sie im Agarose-Gel (2.5) aufgetrennt und anschließend mit einem *QIAquick Gel Extraction Kit* (*Qiagen*) gereinigt.

Für die eigentliche Ligations-Reaktion wurden davon jeweils 4 µl äquimolarer DNA-Konzentration des Inserts sowie des Leerplasmids eingesetzt (DNA-Bestimmung in Kapitel 2.1.7). Um später eine Abschätzung über die Rate der Religation durchführen zu können, wurde immer ein Ansatz ohne Inserts parallel gestartet. Die Reaktion wurde mit 1 µl 10×-Ligationspuffer (660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM Dithioerythrit, 10 mM ATP, pH 7.5, *Roche*) und 1 µl T4-DNA-Ligase (*Roche*) gestartet und bei 16°C über 8 h inkubiert [112].

2.1.4 Elektroporation und Präparation

Die Transformation der neuen Plasmide in *E. coli* (XL1-blue, *Stratagen*) wurde durch Elektroporation (Gene Pulser *Bio Rad*) bewirkt [99,113]. Dazu wurden 60 µl nach Herstellerangaben vorpräparierter Bakterienkultur und 1 µl Ligationsprodukt in einer DNA-freien (UV Stratalinker 2400 *Stratagene*) vorgekühlten Küvette rasch gemischt und elektroporiert (2.5 Volt, 5 sec) und sofort in vorgewärmtes (37°C) 2TY-Kulturmedium überführt und 1 h inkubiert. Davon wurden 50 µl auf einer selektierenden Kulturschale ausgestrichen (LB-Agar mit 1‰ Ampicillin) und über 14–18 h bei 37°C inkubiert.

Einzelne Bakterienklone konnten nun ausgewählt und in selektierendem 2TY-Medium propagiert werden um nach Präparation die Plasmide durch Restriktionsverdau und Sequenzierung zu charakterisieren. Ausgehend von 1.5 ml auf Sättigung gewachsener Bakterienkultur wurde eine Schnellpräparation [99] durchgeführt (sog. Minipräp). Nach Zentrifugation (20 sec, 2000 g) wurde das Pellet in 100 µl Puffer 1 resuspendiert und nach 1' mit 200 µl eiskaltem Puffer 2 versetzt. Nach 5' wurden 150 µl Puffer 3 dazugegeben und gemischt (Vortex). Nach weiteren 5' auf Eis konnte die gefällte Plasmid-DNA durch Zentrifugation gewonnen und durch mehrmaliges Waschen mit Ethanol absteigender Konzentration (95%, 70%) grob gereinigt werden. Sie wurde in TE aufgenommen.

2.1.5 Restriktionsverdau

Plasmid	Restriktionsenzym		Fragmentlängen
	für Backbone	für Insert	
<i>pSG5-3HA-IE1</i>	EcoRI	KpnI	1.55/4.45 kB
<i>pSG5-3HA-IE2</i>	EcoRI	NheI	1.15/4.25 kB
<i>pSG5-3HA-IE3</i>	EcoRI	KpnI	1.0/5.05 kB
<i>pSG5-3HA-M82</i>	EcoRI	SacII	1.5/4.0 kB
<i>pSG5-3HA-M83</i>	EcoRI	EcoRV	2.1/4.5 kB
<i>pCI-neo-3HA-M69</i>	EcoRI	SacII	1.9/6.2 kB

Tabelle 2.3: Verwendete Restriktionsenzyme zur Charakterisierung der Plasmide, entsprechende Fragmentlängen bei korrekter Orientierung des Inserts.

Zur Analyse der Plasmide wurde für jeden untersuchten Bakterienklon ein Restriktionsverdau angesetzt und die entsprechenden Fragmente im Agarose-Gel (Ethidiumbromid-Färbung, EtBr) qualitativ beurteilt (Abbildung 2.3). Es wurden immer zwei Restriktionsenzyme gewählt, eines sollte genau einmal im ursprünglichen Leerplasmid schneiden, das andere genau einmal im Insert selbst, möglichst weit entfernt von der Mitte des Inserts um die Ausrichtung anhand der Fragmentlängen genau festlegen zu können (vgl. dazu Abbildung 2.1 auf Seite 20). Tabelle 2.3 zeigt die hierbei verwendeten Restriktionsenzyme und die zu erwartenden Fragmentlängen bei korrekter Orientierung. Zu den Reaktionsansätzen wurde 1 µl RNase (10 mg/ml Ribonuclease A, *Sigma*) zugegeben um ein Überblenden EtBr-gefärbter RNA im Agarose-Gel zu verhindern.

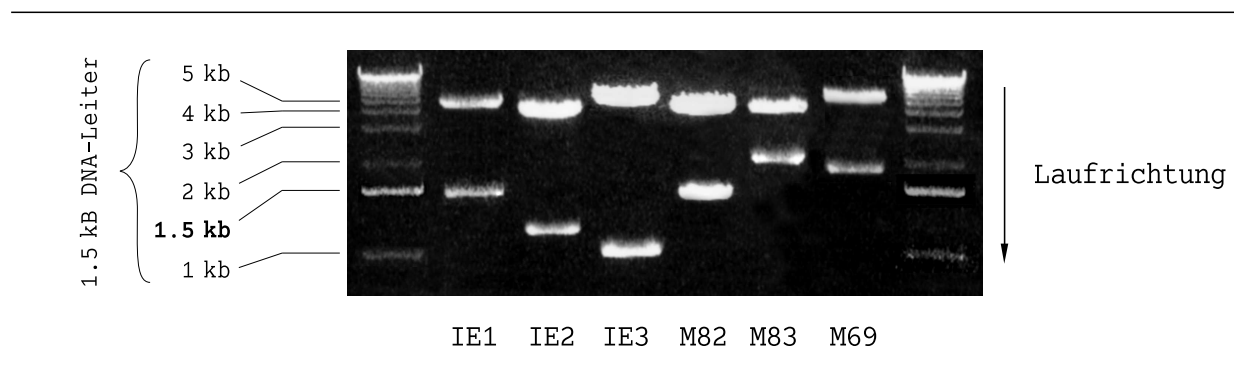


Abbildung 2.3: Für die sechs verwendeten Plasmid-Konstrukte ist die Auftrennung (Agarose-Gel 1%) nach spezifischem Reaktionsverdau gezeigt. Es sind nur Klonierungen mit korrekter Orientierung des Inserts gezeigt.

2.1.6 Sequenzierung

Nachdem nun für jedes Plasmid durch den beschriebenen Restriktionsverdau ein Bakterienklon gefunden wurde, wird zur abschließenden Bestätigung der Bereich des Plasmids sequenziert, der die Ligationsstellen sowie das gesamte kodierende DNA-Fragment (Insert) enthält. Es sollen hier Fehler bei der Ligation (2.1.3), im besonderen aber Fehler während der PCR (2.1.2) gefunden werden. Die verwendete Taq-DNA-Polymerase arbeitet mit einer Fehlerquote von 2–20/10000 Basen [114–116].

Bei der hier verwendeten Methode (Abbildung 2.4, [99, 117, 118]) werden für jedes zu untersuchende DNA-Fragment zusammen mit einem spezifischen Iridium (IRD)-markierten Startprimer jeweils vier Polymerase-Ketten-Reaktionen angesetzt. Dabei wird jedem Ansatz zusätzlich zu den regulären Nukleotiden ein kleiner Anteil spezieller Stop-Nukleotide (jeweils A, C, G oder T) zugesetzt, der mit einer (dem stöchiometrischen Verhältnis dieses Nukleotids zur Menge des entsprechenden normalen Nukleotids) entsprechenden Wahrscheinlichkeit zum Abbruch der Polymerase-Aktion führt. Durch dieses Verfahren entsteht

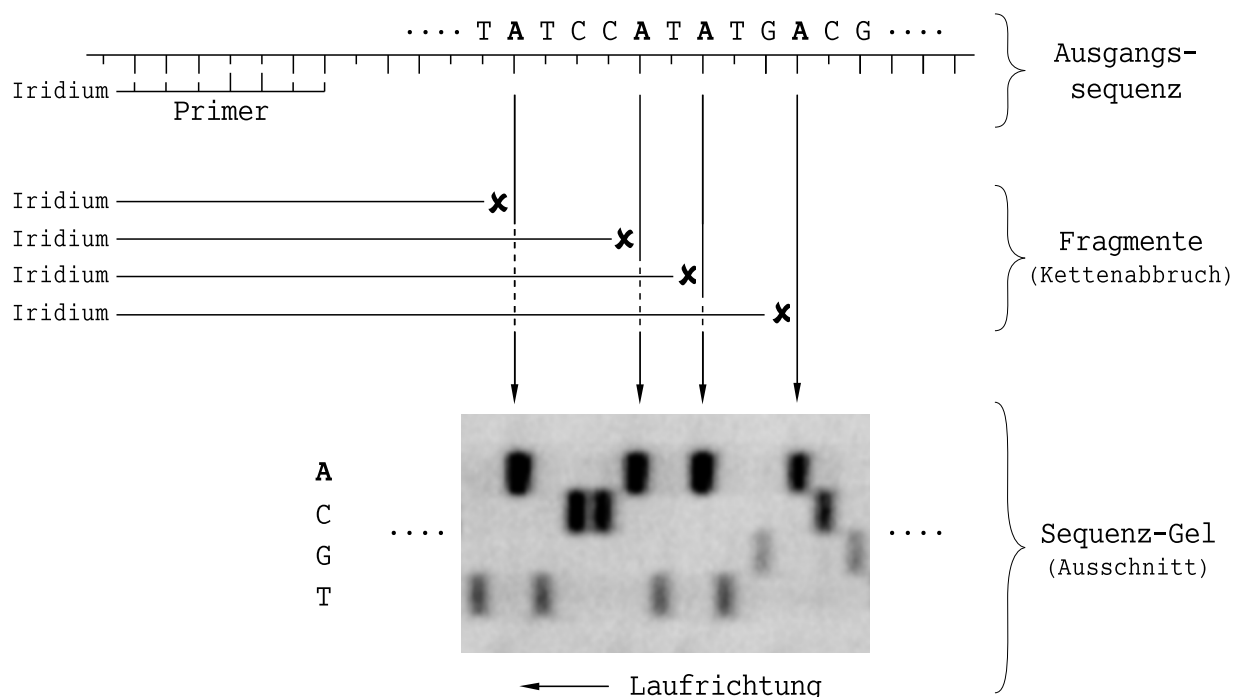


Abbildung 2.4: Allgemeine Struktur der Sequenzierungs-Reaktion. Oben ist die zu sequenzierende Einzelstrang-DNA mit angelagertem IRD-markiertem Primer gezeigt. In diesem Beispiel ist der Kettenabbruch für A exemplarisch skizziert, unten beispielhaft ein Ausschnitt aus dem Sequenz-Gel.

ein Reaktionsprodukt, welches unterschiedlich lange markierte DNA-Fragmente enthält. Die Längen entsprechen den jeweiligen Basen-Positionen im zu untersuchenden DNA-Strang.

Im Speziellen wurde dafür das *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* der Firma *Amersham* verwendet. Im Reaktionsansatz 2 µl des entsprechenden Nukleotid-Reagenzes (aus dem Kit), etwa 0.5 µg des zu untersuchenden Plasmids, 0.5 µl des vorverdünnten Start-Primers, auf 7 µl doppelt destilliertes H₂O. Dem kleinen Volumen wegen wurde dem Ansatz ein Tropfen Öl aufgegeben. Nach einem initialen Denaturierungsschritt (2' bei 95°C) lief die Reaktion mit 30 Zyklen (Primus 96 plus, *MWG-Biotech*, Denaturierung 30 sec bei 95°C, Anlagerung 15 sec bei 46°C, Elongation 15 sec bei 70°C).

Bei der anschließenden Auftrennung im Gel wird eine Interpretation der Sequenz bis etwa 700–900 bp erwartet, entsprechend wurden die spezifischen Primer gewählt (Tabelle 2.4). Sie wurden von der Firma *MWG* bezogen, Vorverdünnung auf eine Konzentration von 1 pmol/µl.

Sequenzierungs-Primer für Leervektoren	
<i>pSG5</i> und <i>pCI-neo</i> Start	<i>T7</i> (5'-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3')
<i>pSG5</i> Ende	<i>SeqSG5antiIRD</i> (5'-ACC ps ACA ACT AGA ATG CAG-3')
<i>pCI-neo</i> Ende	<i>T3</i> (5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3')
Insert-spezifische Primer	
<i>pSG5-3HA-IE1</i>	<i>IRD-ie1mz</i> (5'-CTA ATC TAG GGC CCT CAG AA-3')
<i>pSG5-3HA-IE3</i>	<i>IRD-ie3m</i> (5'-GCC TCA GGA GGA GGA GTA TC-3')
<i>pSG5-3HA-M83</i>	<i>IRD-m83m</i> (5'-CTC CAG ACT CGC TCA CGG CC-3')
<i>pCI-neo-3HA-M69</i>	<i>IRD-m69fx</i> (5'-TGT CTG GGA CCC GAC GAC CT-3')
	<i>IRD-m69m</i> (5'-CCA TCA ACA ACG CGC CGA GC-3')
	<i>IRD-m69mz</i> (5'-CAC CTA CCG GCG CGA AGG TC-3')

Tabelle 2.4: Zur Sequenzierung benutzte IRD 800-markierte Primer

Nach Beendigung der Reaktion wurde den Proben 3 µl Stop-Puffer zugegeben (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0.1% Bromphenolblau, 0.05% Xylen Cyanol). Der Gellauf fand im *dna sequencer 4000* der Firma *LI-COR* statt. Dazu wurde ein 6%iges Polyacrylamidgel gegossen, 8 ml *Sequagel complete*, 32 ml *Sequagel XR* (beide von *National Diagnostics*) und 320 µl 10% APS. Nach Einsatz eines Haifischkamms mit 48 Taschen wurden pro Tasche 1.2 µl der Probe aufgetragen. Die Aufzeichnung und Analyse fand mit der unter 2.6 aufgeführten Software statt. Es wurden so lange Bakterienklone getestet, bis in der abschließenden Sequenzierung keine Tausch-, Insertions oder Deletions-Fehler registriert werden konnten.

2.1.7 Präparation der Plasmide

Für die Transfektion wurden relativ große Mengen der entsprechenden Plasmide benötigt. Nach Vorpräparation und Charakterisierung durch Restriktionsverdau und Sequenzierung wurde dazu ein entsprechender Bakterienklon ausgestrichen (selektierende Agar-Platten, i. d. R. Ampicillin) und über Nacht bei 37°C kultiviert. 2 ml 2TY-Medium wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und mehrere Stunden bei 37°C geschüttelt. Ein kleiner Teil dieser Vorkultur wurde nun in 500 ml 2TY-Medium überführt, auch hier wurde zur Selektion 1‰ Ampicillin bzw. Kanamycin zugegeben. Die Inkubation fand bei 37°C über Nacht (etwa 14–18 h) statt.

Die Präparation der Plasmid-DNA fand nach der Methode der Alkalischen Lyse [119] statt. Dazu wurden die Bakterien abzentrifugiert (10', 3500 rpm, 4°C) und in 30 ml Puffer 1 resuspendiert, 60 ml Puffer 2 lysierte die Bakterien. Proteine und chromosomale Bakterien-DNA wurden durch Zugabe von 30 ml vorgekühltem Puffer 3 ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (15', 4000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgefiltert und daraus mit 0.6 Vol% Isopropanol die verbliebene DNA (hauptsächlich Plasmid-DNA) 30' bei Raumtemperatur präzipitiert und anschließend zentrifugiert (10', 10000 g, 4°C). Das Pellet wurde mit reinem Ethanol gewaschen und in 8 ml TE (pH 8.0) gelöst [99].

Der abschließende Reinigungsschritt wurde mit Hilfe eines Cäsium-Chlorid-Gradienten durchgeführt [99]. Dafür wurde die Probe mit 8.4 g CsCl versetzt und zur Identifizierung der DNA-haltigen Banden mit 800 µl Ethidiumbromid (10 g/l) gefärbt. Eine kurze Vorzentrifugation (5', 3000 g) entfernte unlösliche Reste, die Auftrennung nach Dichte im CsCl-Gradienten fand bei 234000 g in der Ultrazentrifuge (Optima TLX, *Beckmann*) statt (mindestens 12 h). Danach wurde die Plasmid-DNA-Bande abgezogen und durch mehrfaches Ausschütteln mit TE-gesättigtem Butanol das darin enthaltene Ethidiumbromid entfernt. Weitere Aufreinigung erfolgte durch zweimalige Ethanolfällung (Proben auf 0.3 M Natriumacetat, danach mit 3 Volumen eiskaltem Ethanol fällen, zentrifugieren), und anschließendem Waschen des Pellets mit 70% bzw. 100% Ethanol. Zur Weiterverwendung Lösung in TE (pH 8.0) und Lagerung bei -20°C.

Der DNA-Gehalt der Proben wurde mit einem Photometer (Gene Quant, *Pharmacia Biotech*) bei 260 nm Wellenlänge bestimmt, die Reinheit der Proben über den 260 nm/280 nm-Quotienten kontrolliert.

2.1.8 Sonstige Plasmide

Plasmid	Quelle	Einsatz
<i>pSG5-3HA</i>	aus der Arbeitsgruppe [102]	Leerkontrolle
<i>pSG5-3HA-IE2_{human}</i>	aus der Arbeitsgruppe [102]	Kontrolle Zellzyklusarrest
<i>pX_{myc}-p16</i>	J. Lukas, pers. Kontakt	Kontrolle p16-Arrest in G ₁
<i>pCMX-CycA</i>	J. Pines, pers. Kontakt	Cyclin A
<i>pCMX-CycB</i>	J. Pines, pers. Kontakt	Cyclin B
<i>pCMX-CycE</i>	J. Pines, pers. Kontakt	Cyclin E
<i>pMACS K^K.II</i>	<i>Miltenyi Biotec</i>	FITC-Markierung und Sortierung
<i>pDsRed2-N1</i>	<i>BD Biosciences</i>	Transfektions-/Sortierungskontrolle
<i>GFP</i>	aus der Arbeitsgruppe [102]	Transfektionskontrolle
<i>GFP-IE3-wt</i>	Q. Tang	Mutationsanalyse IE3
<i>GFP-IE3-Δ11–36</i>	Q. Tang	Mutationsanalyse IE3
<i>GFP-IE3-Δ37–99</i>	Q. Tang	Mutationsanalyse IE3
<i>GFP-IE3-Δ100–360</i>	Q. Tang	Mutationsanalyse IE3
<i>GFP-IE3-Δ360–611</i>	Q. Tang	Mutationsanalyse IE3

Tabelle 2.5: Sonstige in der Arbeit verwendete Plasmide

2.2 Zellen

Für den Großteil der durchgeführten Experimente wurden NIH-3T3-Zellen verwendet, die übrigen in Tabelle 2.6 aufgeführten Zelllinien wurden nur zum Vergleich der Zellzyklusanalyse (Kapitel 2.3.5) zugeführt. Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz (siehe 2.2.2) mussten die 3T3-Zellen nach der Transfektion sortiert werden (2.2.4) um für die Herstellung von Extrakten eine möglichst hohe Rate an transfizierten Zellen als Ausgangsmaterial zu erhalten.

2.2.1 Zellkultur

Für alle durchgeführten Experimente in der Zellkultur wurden Kunststoffmaterialien verwendet. Es wurde nur mit adhärent und in Ein-Zell-Schicht (engl. *Monolayer*) wachsenden Zellen gearbeitet, zur Kultur dazu 150mm-, 100mm- und 60mm-Schalen sowie Mehrfachplatten mit 6 und 12 Proben verwendet. Die in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagerten Zellproben wurden rasch im Wasserbad aufgetaut, in vorgewärmtes Medium (37°C) überführt und zur weitgehenden Entfernung von DMSO abzentrifugiert. Alle Zentrifugationen beim

Zelllinie	Quelle	Splitting	Zelltyp und Mutationen
NIH-3T3	J. Sinclair	1:6	Fibroblasten (Maus), p16 ^{INK4a} negativ
U2OS	T. Kouzarides	1:3	Osteosarkom (Mensch), p16 ^{INK4a} und p14 ^{ARF} negativ [120]
HeLa	T. Kloetzel	1:12	Adenokarzinom (Mensch), p53 und Rb negativ [121]
U373	<i>CellLineService</i>	1:6	Astrozytom (Mensch), p53 negativ [122]
MCF-7	L. Toschi	1:3	Mammakarzinom (Mensch), p16 ^{INK4a} und p14 ^{ARF} negativ [120]
Rat-1	T. Kouzarides	1:6	Fibroblasten (Ratte), p21 ^{WAF1} negativ

Tabelle 2.6: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Umgang mit Zellen wurden bei 1000 rpm für 3–5' in einer CS-6R Zentrifuge (*Beckmann*) durchgeführt. Das Zellpellet wurde wiederum in warmem Medium aufgenommen und auf eine entsprechende Zellkulturschale aufgebracht. Alle Zellen wurden in Kulturschränken (Incubator 3250, *Forma*) bei 37°C maximaler Luftfeuchte (>95%) und 5% CO₂ kultiviert, da der pH-Wert des verwendeten Mediums über Kohlendioxid gepuffert wird [123].

Die Zellen wurden alle drei Tage nach dem in Tabelle 2.6 angegebenen Verhältnis geteilt (engl. *Splitting*). Dazu wurden die Kulturschalen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 20% des Mediumvolumens Trypsin/EDTA (*Gibco*) für 3–5' bei 37°C inkubiert. Die anschließend in Medium aufgeschwemmten Zellen wurden nun dem entsprechenden Verdünnungsverhältnis auf neue Kulturschalen aufgebracht und mit der adäquaten Menge Medium aufgefüllt.

Zur langfristigen Lagerung einer Zelllinie wurden 1.5 ml aufgeschwemmter Zellen nach Trypsinisierung mit 10% DMSO versetzt und langsam auf -80°C heruntergekühlt [123].

2.2.2 Kalzium-Phosphat-Transfektion

Die transiente Transfektion der hauptsächlich untersuchten NIH-3T3-Zellen mit Plasmid-DNA stellte ein erhebliches Problem dar, da für die untersuchten Methoden jeweils nur geringe Transfektionseffizienzen erzielt werden konnten. Dies entspricht bisherigen Erfahrungen mit der Transfektion dieser Zelllinie [102, 124]. Neben ExGen 500 (*Fermentas*, 10-20%), TransIT-3T3 (*Mirus*, 5-10%), GenePorter 2 (*PeqLab*, <5%), Lipofectamin 2000 (*Invitrogen*, 2-20%) und PEI (eigener Ansatz und Verdünnungen [125, 126], <2%) wurde schließlich die Kalzium-Phosphat-vermittelte Transfektion (Effizienz siehe 2.2.3) gewählt [99, 123]. Finden sich wie für alle Methoden zur DNA-Transfektion Bedenken, dass der Ablauf der Transfek-

tion und die eingesetzten Substanzen zu erheblichen Änderungen des Zellmetabolismus und des Teilungsverhaltens führen können [127], so bietet die gewählte Methode neben hoher Kosteneffizienz den Vorteil der Vergleichbarkeit mit Vorarbeiten zu dem hier untersuchten Thema [88, 89, 102]. Um den Einfluss der Methode zu untersuchen wurden einige zentrale Experimente zusätzlich mit ExGen 500 durchgeführt und dort im Ablauf den Angaben des Herstellers gefolgt.

Zunächst wurde als Stammlösungen 2×BBS hergestellt (280 mM NaCl, 50 mM BES (*Sigma*, hochrein für Zellkultur) und 1.5 mM Na₂HPO₄, [99, 123, 128]). Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6.95 titriert, Lagerung bei -80°C. Für eine 150mm-Kulturschale wurden dann 50 µg Plasmid-DNA auf 1560 µl aufgefüllt, dazu wurde eine CaCl₂-Lösung (250 mM) verwendet. Nach Zugabe von 1560 µl 2×BBS (Vortex) wurde der Ansatz bei RT für 15' ruhen gelassen und zügig auf die Kulturschalen aufgebracht (25 ml Kulturmedium). Für kleinere Schalen wurden DNA- und Lösungsmengen angepasst. Die Zellen wurden nun für 14 h bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert, anschließend zweimal mit TBS gewaschen und mit vorgewärmtem Kulturmedium aufgefüllt.

2.2.3 Transfektionskontrolle

Neben dem pH-Wert der 2×BBS-Lösung und der CO₂-Konzentration, welche gemeinsam den pH-Wert des Mediums während der Transfektion kritisch beeinflussen, spielt die Dichte der vor der Transfektion ausplattierten Zellen die entscheidende Rolle für eine hohe Transfektionseffizienz. Allgemein wurden die Zellen 24 h vor Beginn der Transfektion geteilt, die Zelldichte nach Trypsinisierung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer [123] bestimmt und dann entsprechend verdünnt. Höchste Effizienz ergab sich für 0.8×10^5 Zellen pro ml, Abbildung 2.5 (a) zeigt den raschen Abfall für höhere Zelldichten.

Zur Kontrolle und Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden Zellen parallel zum eigentlichen Experiment mit *GFP*-Plasmid (subjektiv-quantitative Beurteilung im Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert S 100 von *Zeiss*) oder mit *dsRed*-Plasmid (subjektive, aber auch objektive Bestimmung durch FACS-Analyse) transfiziert. Für NIH-3T3-Zellen begann erst 12–18 h nach Transfektions-Ende eine ausreichende Expression dieser Kontroll-Proteine für eine quantitative Beurteilung, die Effizienzen beziehen sich auf 24 h nach Transfektions-Ende.

Zur Analyse geerntete Zellen wurden dafür nach Trypsinisierung mit PBS gewaschen, wieder in PBS aufgenommen und die Fluoreszenz des dsRed-Proteins direkt in der Durch-

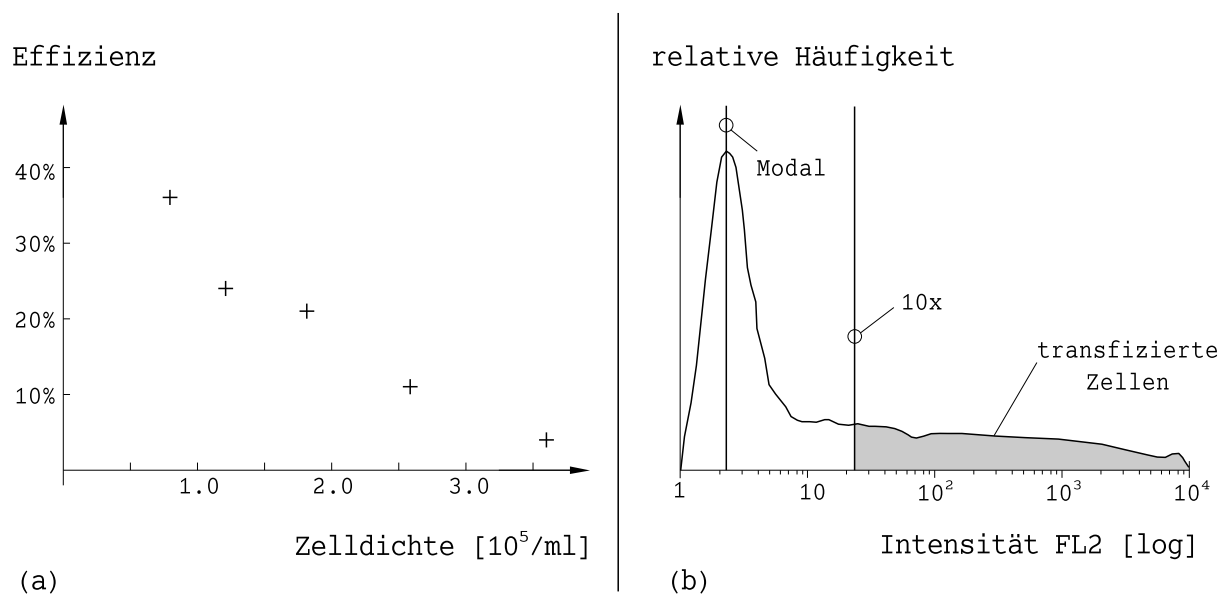


Abbildung 2.5: (a) Transfektionseffizienz bei unterschiedlicher Zelldichte aus fünf Ansätzen. Für 0.8×10^5 Zellen pro ml wird in (b) die Häufigkeitsverteilung über FL2 nach Kalzium-Phosphat-Transfektion mit *dsRed* gezeigt.

flusszytometrie (FACScan *Becton Dickinson*) in Kanal FL2 (585 nm, siehe 2.3.5) gemessen. Abbildung 2.5 (b) zeigt die Häufigkeitsverteilung einer transfigurierten Zellpopulation. Im Rahmen dieser Arbeit werden Zellen als transfiguriert angesehen, die mehr als ein zehnfaches des Modalwertes der nichttransfigurierten Zellen im entsprechenden Kanal aufweisen.

2.2.4 MACS-Sortierung

Für die durchgeführten biochemischen Funktionsanalysen bedurfte es einer höheren Reinheit transfigurerter Zellen, um Unterschiede im Einfluss verschiedener Effektor-Plasmide zeigen zu können. Um dies zu bewirken, wurden die geernteten Zellen mit MACSelect K^K MicroBeads (*Miltenyi Biotec*) inkubiert und aufgetrennt [129]. Diese binden an die nach Kotransfektion mit *pMACS K^K.II*-Plasmid auf den Zelloberflächen exprimierten H-2K^K-Proteine (MHC-Protein Klasse I, Maus). Für diese Inkubation wurden die Zellen einer 150mm-Schale zunächst mit PBS gewaschen, abzentrifugiert, in 100 μl PBE (PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA, unter der Vakuumumpe entgast, 4°C) und 20 μl MicroBeads aufgenommen und für 15' bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden nun mit PBE auf 10 ml aufgefüllt.

Für die eigentliche Sortierung wurden die Zellen durch im Magnethalter fixierte und zuvor mit PBE gewaschene Trennsäulen für große Zellen (*Large Cell Separation Columns*,

Miltenyi) geführt. Dabei werden transfizierte Zellen mit an der Zelloberfläche gebundenen MicroBeads durch deren paramagnetische Struktur im Magnetfeld der Säule zurückgehalten. Nicht oder nur sehr schwach transfizierte Zellen wurden durch dreimaliges Waschen der Säule mit PBE entfernt. Nun konnte die aufgereinigte transfizierte Zellpopulation nach Entfernung des Magnetfelds ebenfalls mit PBE aus der Säule ausgewaschen und der weiteren Analyse zugeführt werden.

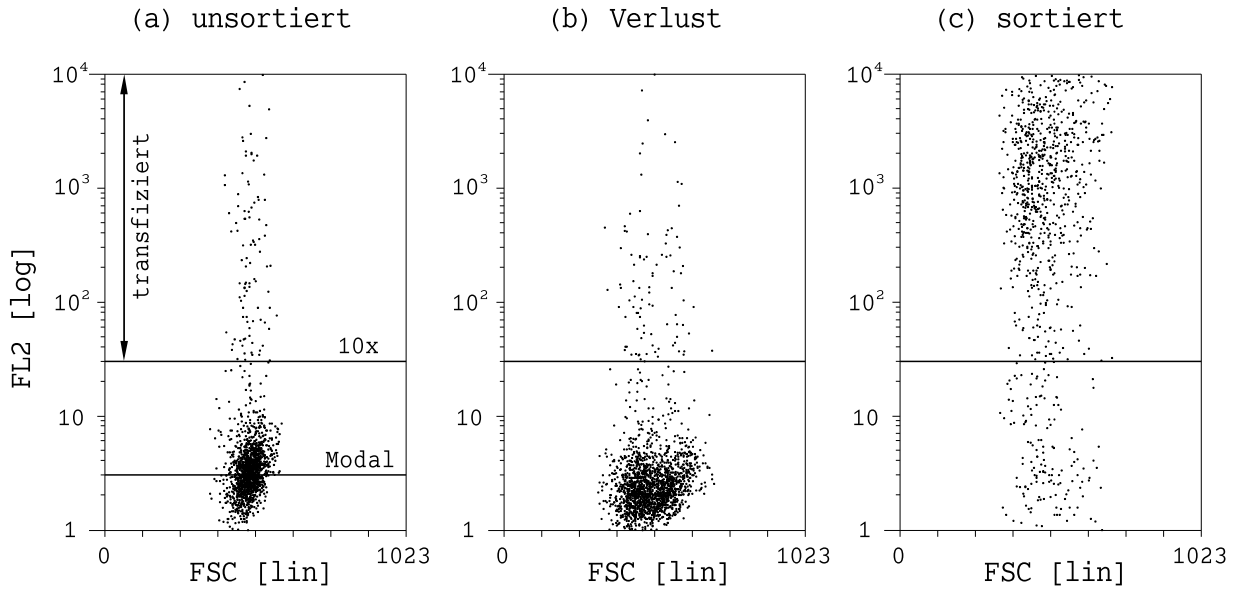


Abbildung 2.6: Kontrolle der Sortierung durch MACS-Säulen, Details im Text.

Zur Kontrolle der Sortierung wurde eine Testtransfektion durchgeführt, dazu wurden als Hauptplasmid (80% der eingesetzten DNA-Menge) das *dsRED* und für die Sortierung 20% *pMACS K^K.II* eingesetzt. Abbildung 2.6 zeigt in FL2 die Transfektionseffizienz durch dsRED-Lumineszenz, dabei werden wiederum Zellen als transfiziert angesehen, welche ein zehnfaches des Modalwertes im entsprechenden Kanal aufweisen (Teilbild (a)). Vor der Sortierung wurde ein kleiner Teil der Zellen im FACS analysiert (unsortierte Zellen, (a)). Der Durchfluss bei der Sortierung ist in (b) gezeigt, es ist eine geringfügige Depletion transfizierter Zellen zu erkennen. In (c) ist schließlich die Population angereicherter Zellen zu erkennen, besonders die gut transfizierten Zellen mit hoher dsRED-Lumineszenz in FL2 werden relativ stark angereichert. Diese Beobachtung entspricht der hohen Kotransfektions- und -expressionsrate von zwei gleichzeitig verwendeten Plasmiden, womit eben auch eine starke Expression des H-2K^K-Oberflächenproteins bei hoher Lumineszenz einhergeht.

2.2.5 Extrakte und Protein-Quantifizierung

Für alle anschließend beschriebenen Proteinexpressions und -funktionsanalysen wurden aus den geernteten und gegebenenfalls sortierten Zellen Extrakte hergestellt. Dazu wurden die mit PBS gewaschenen Zellpellets nach Zentrifugation (beschrieben in 2.2.1) je nach Anzahl und Zelltyp in IPB (2.5) aufgenommen, für eine konfluente 150mm-Schale NIH-3T3-Zellen z. B. in 50–100 μ l. Durch sofortiges Schockfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Zellmembranen desintegriert und sofort bei 37°C wieder aufgetaut; diese Prozedur wurde zwei bis drei mal wiederholt. Nach einer Ruhezeit von 20' bei 0–4°C wurden die sonstigen Zellbestandteile bei 20000 g und 4°C für 20' abzentrifugiert. Im Überstand finden sich nun die zur Analyse aufbereiteten Proteine, Lagerung bei -80°C.

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den jeweiligen Extrakten wurde die Lowry-Methode benutzt [130]. Dazu wurde ein Kit verwendet (DC Protein Assay, *BioRad*). 2 μ l Extrakt und 198 μ l H₂O werden mit 100 μ l Reagenz A und 800 μ l Reagenz B (beide aus dem Kit) rasch gemischt und für 10' bei RT inkubiert. Jetzt kann bei 750 nm (Bio Photometer, *Eppendorf*) die Proteinkonzentration gemessen werden, als Leerwert wurde IPB, für die Referenzwerte eine BSA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen eingesetzt. Die Extrakte wurden vor der weiteren Verwendung mit IPB auf entsprechend gleiche Proteinmengen verdünnt.

2.3 Analyse-Verfahren

2.3.1 In-vitro-Expression

Für den unspezifischen Nachweis der Expression eines der erwarteten Zielgröße entsprechenden Proteins aus den konstruierten Plasmiden (Tabelle 2.1) wurde eine In-Vitro-Translation durchgeführt [99]. Dazu wurde das *TnT Coupled Reticulocyte Lysate System* (*Promega*) verwendet [131] und den Angaben im Protokoll des Herstellers gefolgt. Zur Analyse wurden die Proben im SDS-Gel (12%, 2.3.2) aufgetrennt und dieses für 20' fixiert (in 50% Methanol, 10% Eisessig) und für weitere 20' amplifiziert (Amplifier, *Amersham*). Im Ansatz der In-Vitro-Reaktion ist die Aminosäure Methionin vollständig durch radioaktiv markiertes ^{35}S -Methionin ersetzt, welches nach Trocknung des Gels autoradiographisch aufgezeichnet werden konnte (Phosphoimager FLA 3000, *Fuji*).

2.3.2 SDS-Page

Zur Auftrennung der untersuchten Proteine (für Western-Blots und Kinase-Essays) allgemein nach Größe und Ladungsverhalten wurde das Verfahren der SDS-Gel-Elektrophorese eingesetzt [99,132]. Zunächst wurde der untere Teil des Gels, das sog. Trenngel gegossen und getrocknet. Es füllt etwa 80% der Laufhöhe. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden Trenngele mit verschiedenen Polyacrylamid-Konzentrationen (10–15%, Rothiphorese Gel 30, *Roth*) benutzt. Der pH-Wert wurde mit einer Endkonzentration von 375 mM Tris auf 8.8 eingestellt. Es wurde 0.1% SDS eingesetzt, die Polymerisierung durch Zugabe von 0.1% Ammoniumpersulfat (APS) und 0.1% TEMED (*Sigma*) eingeleitet. Die oberen 20% des Gels (sog. Sammelgel) wurden mit 5% Polyacrylamid und 125 mM Tris (pH 6.8) gegossen.

Die aufzutrennenden Proteinproben wurden direkt vor dem Gellauf mit 0.33 Volumen 4×Roti-Load (*Roth*) versetzt und für 5' bei 95°C denaturiert. Nach kurzer Abkühlung wurden die Proben in die entsprechenden Taschen des Sammelgels gefüllt und der Lauf gestartet. Als Größenvergleich wurde eine Proteingrößenstandard von *Fermentas* verwendet, der SDS-Laufpuffer bestand aus 125 mM Tris, 1250 mM Glycin und 0.5% SDS. Der Gellauf selbst wurde im Mini-Protean II System (*BioRad*) durchgeführt, die ersten 15' bei 80 V, anschließend bei 200 V bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennung.

2.3.3 Western Blot (Immunoblot)

Für die Detektierung spezifischer Proteine im SDS-Gel wurde das Immunoblot-Verfahren angewendet. Dazu wurde in einer Semidry-Apparatur ein sog. Sandwich aus drei in Transferpuffer vorgetränkten Whatman-Papieren, dem in Transferpuffer gewaschenen Gel, der Blotting-Membran (PVFD Western Blotting Membrane, *Roche*) und drei weiteren Whatman-Papieren gestapelt. In der geschlossenen Apparatur wurde für 1 h ein konstanter Strom von 1 mA/cm² (des Gels) appliziert und so die Proteine auf die Membran transferiert.

Um unspezifische Antikörperbindungsstellen der Proteine zu blockieren wurde die Membran vor der Anwendung spezifischer Antikörper für 30' in TTBS mit 5% Trockenmilchpulver (*Nestlé*) auf dem Schütteltisch bewegt. Die anschließende Inkubation mit Primärantikörper (Tabelle 2.7, [133]) fand für 8-12 h bei 4°C im Drehinkubator statt. Die Antikörper wurden in der angegebenen Konzentration in TTBS mit 5% Milchpulver aufgenommen und für eine mehrmalige Verwendung mit 0.1% NaN₃ haltbar gemacht. Nach der Inkubation wurde die Membran viermal in TTBS gewaschen, für 1 h bei RT mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und erneut viermal gewaschen.

Die in spezifischen Banden am Sekundärantikörper gebundenen Peroxidasen konnten nun durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden. Es wurde das *ECL Plus Western Blotting Detection Reagent* von *Amersham Biosciences* verwendet, entsprechend den Produktangaben verfahren und anschließend die Membran auf einem Röntgenfilm (*Kodak*) exponiert und entwickelt.

Antikörper	Quelle	Verwendung	Einsatz
Anti-HA	<i>Roche</i>	Nachweis der Proteinexpression	1:700
Anti-IE1 (Cromo 101)	S. Jongic	Nachweis bei siRNA-Experimenten	1:30*
Cyclin A (C-19)	<i>Santa Cruz</i>	{ Kinase-Essay Zyklin-Expression	1:25 1:100
Cyclin B (GNS1)	<i>Santa Cruz</i>	{ Kinase-Essay Zyklin-Expression	1:25 1:100
Cyclin E (M20)	<i>Santa Cruz</i>	{ Kinase-Essay Zyklin-Expression	1:25 1:100
Sekundär IgG	<i>Sigma</i>		1:3500

Tabelle 2.7: Verwendete Antikörper für Western Blots und Kinase-Essays.

* direkter Überstand einer Kultur, Konzentration nicht bekannt.

2.3.4 Kinase-Essay

Zur Bestimmung der Zyklin-assoziierten Kinase-Aktivitäten wurden die entsprechenden Zykline zunächst immunpräzipitiert (sog. IP) um anschließend die Kinase-Aktivität aufzeichnen zu können.

Für die Präzipitation wurden bei jeweils identischen Proteinkonzentrationen 50 µl der vorbereiteten Zellextrakte eingesetzt und mit 2 µl Antikörper (Tabelle 2.7) für 1 h auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde mit IPB auf 750 µl aufgefüllt, mit 10 µl Protein-A-Sepharose (in IPB gewaschen, *Sigma*) für 8-12 h bei 4°C im Drehinkubator konnten so die jeweiligen Zykline und die entsprechend assoziierten Kinasen mit Sepharose-Granula markiert werden. In vier anschließenden Zentrifugationsschritten (1' bei 6000 rpm) wurden nicht gebundene Proteine ausverdünnt, dazu wurde zwischendurch mit IPB gewaschen. In zwei weiteren Zentrifugationen wurde zum Waschen 50 mM Tris-Cl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT verwendet.

Die Kinase-Reaktion wurde in 25 µl des oben genannten Waschpuffers durchgeführt. Es wurden jedoch 10 mM β -Glycerophosphat und 50 µM ATP zugesetzt. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 5 µg Histon H₁ (*Roche*) als Substrat der Kinaseaktivität und 5 µCi γ -³²P-ATP (*Perkin Elmer*) zur radioaktiven Markierung der phosphorylierten Histone, und fand bei 30°C im Drehinkubator statt.

Die Auftrennung des Histon-Proteins fand in einem 12%-SDS-Gel (2.3.2) statt, welches anschließend für 20' in 50% Methanol und 10% Eisessig fixiert, danach getrocknet wurde. Für die autoradiographische Aufzeichnung wurde der Phosphorimager FLA 3000 (*Fuji*) verwendet.

2.3.5 Zellzyklusanalyse im FACS

Zur Zellzyklusanalyse wurden die zu analysierenden Zellen mit 20% *pMACS K^K.II*-Plasmid-DNA kotransfiziert (siehe 2.2.2) und zum entsprechenden Zeitpunkt durch Trypsinisierung (2.2.1) geerntet und mit Medium (37°C) gewaschen. Es folgte nun die Inkubation mit dem mit FITC-Farbstoff-markierten H-2K^K-FITC-Antikörper (*Miltenyi Biotec*), dazu wurden die Zellen einer 150mm-Schale nach der Zentrifugation in 50 µl Medium und 1 µl Antikörper aufgeschwemmt und für 30' auf Eis bei regelmäßig leichter Bewegung belassen. Um ein starkes Signal des FITC-Farbstoffs später im FACS messen zu können wurden dieser und die folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS (+1% FCS) gewaschen und abzentrifugiert. Sollten die Zellen direkt anschließend im

FACS gemessen werden wurde eine Schnellfärbung durchgeführt, bei Ernten mit mehreren Zeitpunkten wurden sie zunächst in Ethanol fixiert und zu einem späteren Zeitpunkt gefärbt und gemeinsam gemessen.

Für die Schnellfärbung wurde das Zellpellet einer 150mm-Schale in 200 μ l Citrat-Puffer (siehe 2.5) aufgenommen und direkt mit 800 μ l Färbe-Lösung und 20 μ l RNase A (10 mg/ml Ribonuclease A, *Sigma*) gemischt. Vor der Analyse sollten die Zellen mindestens 15' auf Eis inkubieren um eine ausreichende Permeabilisierung der Zellmembranen als Voraussetzung für die DNA-Färbung mit Propidiumjodid zu gewährleisten.

Für die Fixierung der Zellen wurde das Pellet einer 150mm-Schale in 1 ml PBS (4°C) aufgeschwemmt und dann auf dem Vortex vorsichtig tropfenweise 3.5 ml Ethanol (-20°C) zugegeben. So konnten die Zellen auf Eis und lichtgeschützt für einige Tage fixiert gelagert werden, mindestens aber für 2 h. Dabei wurden die Zellmembranen permeabilisiert. Für die gemeinsame Färbung wurde die Fixierung durch vortexen aufgeschwemmt, die Zellen abzentrifugiert und das Ethanol vollständig entfernt. Die Zellen wurden nun in 1 ml PBS aufgenommen und zusammen mit 50 μ l Propidiumjodid (PI, 10 μ g/ μ l) und 30 μ l RNase A für 30' bei RT inkubiert.

Für alle durchflusszytometrischen Analysen wurde ein FACScan (*Becton Dickinson*) benutzt. Wie in Abbildung 2.7 zu erkennen, werden die verwendeten Farbstoffe durch den

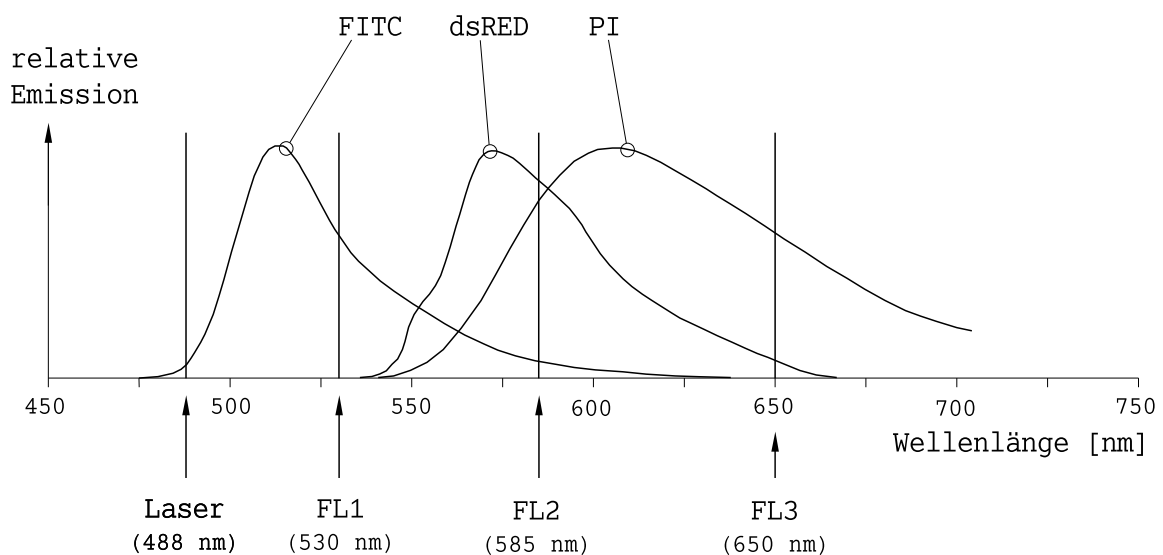


Abbildung 2.7: Exzitationswellenlänge des FACScan-Lasers bei 488 nm, Emissionskurven der verwendeten Farbstoffe und die Wellenlängen der drei Messkanäle. Kurvenverläufe in Anlehnung an www.bdbiosciences.com/spectra.

488 nm-Laser des Geräts exzitiert und emittieren in der gezeigten Spektralverteilung. Der FITC-Farbstoff wurde wie oben beschrieben zur Selektion der transfizierten Zellen eingesetzt, dessen Intensität wurde in Kanal FL1 gemessen. Der DNA-Gehalt der Zellen wurde gleichzeitig in den Kanälen FL2 oder FL3 über den Farbstoff Propidiumjodid gemessen. Die prozentual berechnete Kompensation bei Überblendung eines Farbstoffs in mehreren Kanälen fand mit der benutzten Software (Kapitel 2.6) statt [134].

Der Kanal FSC (engl. *Forward Scatter*) gibt grob Auskunft über die Größe der jeweiligen Zelle, in Kanal SSC (engl. *Side Scatter*) wird eine quantitative Aussage über die Granularität und damit über die Komplexität der Zellstrukturen gegeben. In einer Darstellung zwischen den Kanälen FL2-A und FL2-W können Zelldoubletten aussortiert werden. Die Implikation der hier beschriebenen Funktionalitäten wird später im Kontext der einzelnen Darstellungen genau erläutert. Für Färbung und Anwendung des FACScan-Geräts wurde grob nach www.molbio.princeton.edu/facility/flowcyt verfahren.

Für einige Zellzyklusanalysen wurde dem Kulturmedium in unterschiedlichem Abstand zum Erntezeitpunkt 50 ng/ml Nocodazol [135, 136] zugesetzt (siehe Abbildung 3.9).

2.4 RNA-Interferenz

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch die expressionssupprimierende Methode des sog. Gene-Silencing oder Knock-Down die Gene *IE1*, *IE2* und *IE3* von MCMV untersucht. Hierzu wurden zu jedem dieser Gene jeweils drei shRNAs aus den bekannten Gen-Sequenzen ausgewählt. Es wurden bewährte Prinzipien der Basenzusammensetzung und Repetition beachtet [137]. Mit diesen Sequenzen wurden entsprechende Expressionsvektoren kloniert, welche zusätzlich immer auch das *pac*-Gen exprimieren, ein für Puromycin-N-Acetyl-Transferase kodierendes Gen. Dieses Protein vermittelt eine Resistenz gegen das die Protein-Synthese inhibierende Puromycin, so können transfizierte Zellen über die Applikation dieser sonst toxischen Substanz ausselektiert werden. Hierüber kann eine stabile Transfektion erreicht werden. Die Vektoren wurden mit den Nummern 55 bis 63 spezifiziert (*IE1* 55–57, *IE2* 58–60, *IE3* 61–63). Sie wurden alle zur Kontrolle kommerziell sequenziert.

Die Methode des funktionellen Knock-Down über shRNA beruht auf der Anlagerung von kurzen — einer bestimmten mRNA komplementären — RNA-Fragmenten, wobei die Funktion zur Übersetzung in die entsprechenden Proteine verloren geht. Bei der hier verwendeten

Methode wird die entsprechende Sequenz über einen DNA-Vektor in die Zellen transfiziert. Dort wird eine entsprechende shRNA abgelesen die an beiden Enden aus komplementär zueinander gewählten Basensequenzen (in diesem Fall 21 Nukleotide) und einem kurzen nicht komplementären Zwischensegment besteht, welches sich bei Anlagerung der spezifischen Bereiche wie das Ende einer Haarnadel (engl. *hairpin*) verformt. In Vorarbeiten konnte mit dieser Methode der RNA-Interferenz (RNAi) bereits die funktionelle Suppression der viralen DNA-Polymerase von HCMV (Gen *UL54*) gezeigt werden [138].

Die genannten Expressionsvektoren 55–63 wurden wie unter 2.1.4 beschrieben propagiert und mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Maxi Kits* aufgereinigt. Den Herstellerangaben wurde hierbei Folge geleistet. Zur Transfektion der Plasmide in NIH-3T3-Zellen wurde ExGen 500 (*Fermentas*) verwendet, sie fand in 6er-Mehrfachschalen statt. Auch hier wurde nach Herstellerangaben vorgegangen (2 µg DNA, 198 µl NaCl 150 mM, 6.6 µl ExGen 500). Die Transfektion fand bei etwa 50–70% Konfluenz der Zellen statt. Für das Kotransfektions-Experiment wurden 1/5 Expressionsplasmid für die 3HA-markierten Gene *IE1–3* und 4/5 der die shRNA exprimierenden Plasmide bzw. *pSG5-3HA* als Leerkontrolle eingesetzt. Für die Kontrolle der Transfektion wurde das *pDsRed2-N1*-Plasmid verwendet. Ernte und Analyse fanden wie beschrieben statt.

2.5 Lösungen

Medien zur Bakterienpropagation	
2TY	16 g/l Trypton/Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
LB	10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
Ampicillin-Stock	10% Ampicillin-Salz in 50% Ethanol, Lagerung bei -20°C
Kanamycin-Stock	10% Kanamycin-Salz in 50% Ethanol, Lagerung bei -20°C
DNA und Plasmide	
TE	10 mM Tris-Cl (pH im Text spezifiziert), 1 mM EDTA
TBE	90 mM Tris-Cl, 90 mM Borsäure, 10 mM EDTA
Agarose-Gel	100 ml TBE, 1 g Agarose, 5 µl EtBr
P1 (Puffer 1)	25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 50 mM Glukose
P2 (Puffer 2)	0.2 N NaOH, 1% SDS
P3 (Puffer 3)	3 M Kaliumacetat, 10% Essigsäure
Zellen	
Kulturmedium	D-MEM, 4.5 g/l Glukose, 1% GlutaMAX I (<i>Gibco</i>), 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/10000 µg/ml, <i>Biochrom AG</i>), 5% Newborn Calf Serum, 5% Fetal Bovine Serum (beides <i>Biochrom AG</i>)
PBS	8.5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 3 mM KCl
TBS	10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl
PBE	PBS, 2 mM EDTA, 0.5% BSA Albumin Fraktion <i>Roth</i>
Citrat-Puffer	40 mM Natriumcitrat pH 7.4, 250 mM Sucrose
Färbe-Lösung	PBS, 20 µg/ml Propidiumjodid, 0.5% Igepal CA-630 (Nonidet P-40), 0.5 mM EDTA
Proteinanalysen	
Transferpuffer	20% Methanol, 25 mM Tris, 190 mM Glycin
IPB	50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM NaF, 0.5 mM Na ₃ VO ₄ , 0.5% Nonidet P-40, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 2 µg/ml Aprotinin, 1 mM Leupeptin, 1 mM PMSF
TTBS	10 mM Tris-Cl (pH 7.6), 9 g/l NaCl, 0.1% Tween 20

Tabelle 2.8: Allgemeine Angaben zu häufig verwendeten Lösungen

2.6 Software

- \LaTeX 2_ε, *Kile 1.5.2* unter *SuSE 9.0* sowie *WinEdt 5* unter *Windows xp* für das Layout dieser Arbeit.
- *EndNote 8.0* unter *Windows xp* für die Verwaltung der Literatur.
- BaseImagIRTM *Data Collection v2.31*, *Image Analysis v4.1* und *Image Manipulation v4.0* der Firma LI-COR unter *OS/2 WARP* für die Datenaufzeichnung und automatische Auswertung der Sequenzierung.
- *MacDNAsis Pro v3.5* unter *MacOS 8.6* für die Erstellung der Plasmid-Zielsequenzen und DNA-Vergleich nach Sequenzierung.
- *BLASTP 2.2.10 (2004)* des *NCBI* für die Sequenz-Suche und -Vergleich im Netz.
- *StarOffice 7* und *Adobe Photoshop CS 8.0* unter *Windows xp* für die Erstellung und Bearbeitung der Abbildungen.
- *CellQuest v1.0 (Becton Dickinson)* unter *MacOS 7.1* für die Aufnahme der FACS-Daten.
- *ModFit LT 3.1*, *WinMDI 2.8* und *Flow Explorer 4* unter *Windows xp* für die Auswertung der FACS-Daten.
- *BASReader 3.01* unter *Windows NT* zur Aufzeichnung der Kinase-Essay-Blots.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Struktur der Experimente

Zuerst wurden MCMV-Gene ausgewählt, welche auf ihren Einfluss auf den Zellzyklus der Wirtszelle untersucht werden sollten. Hierbei wurden Homologe zu denjenigen HCMV-Faktoren in Betracht gezogen, für die Einflüsse auf den Zellzyklusverlauf bereits beschrieben sind (1.4.2). Entsprechend wurde zunächst ein Homologievergleich zwischen HCMV- und MCMV-Genen durchgeführt (3.2). Insgesamt sechs Gene wurden ausgewählt und der weiteren Analyse zugeführt, darunter drei *Immediate Early*-Proteine und drei Tegument-Faktoren.

Für die ausgewählten Gene wurde zunächst die allgemeine Expressionsfähigkeit *in vitro* und *in vivo* (NIH-3T3-Zellen) gezeigt (3.3). Entsprechende cDNA wurde in eukaryontische Expressionsvektoren kloniert. Dazu wurden entweder aus einer Viruspräparation oder für die gespleisssten Gene durch Reverse Transkription aus Lysat infizierter Zellen kloniert. Dabei wurde den einzelnen Genen die Markersequenz 3HA als sog. Expressions-Tag vorangestellt. Diese besteht aus drei identischen, linear kombinierten Aminosäuresequenzen (YPYDVDP-YA), aus dem Influenza-Hämagglutinin und kann mit kommerziellen Antikörpern mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden.

Da die erwartete Transfektionseffizienz in den untersuchten NIH-3T3-Zellen höchstens 20% beträgt, musste vor der weiteren Analyse eine Selektion der transfizierten Zellen vorgenommen werden (Abbildung 3.1). Hierzu wurde das *pMACS K^K.II*-Markerplasmid im Verhältnis 1:4 zum eigentlichen Effektorplasmid kotransfiziert. Es kodiert für ein Oberflächenprotein welches nach Expression auf der Zellmembran transfizierter Zellen durch Antikörper-Bindung markiert werden konnte. Diese spezifischen Antikörper konnten, selbst mit

FITC-Farbstoff markiert, in der Durchflusszytometrie die transfizierten Zellen identifizieren. Das genannte Oberflächenprotein ist ein modifiziertes MHC-Molekül der Maus, welches durch Entfernen des intrazellulären Abschnitts seine ursprüngliche Funktion verloren hat, jedoch nach extrazellulär hin ein starkes Antigen bleibt. Durch zusätzliche Propidiumjodid-Färbung der Nukleinsäuren konnten so DNA-Profile aufgezeichnet werden, die nur transfizierte Zellen berücksichtigten. So konnte der Einfluss der einzelnen Proteine auf die Zellzyklus-Verteilung der transfizierten Zellen beobachtet werden. Um die dargestellten Effekte zu reproduzieren, wurden ebenfalls Vergleichsanalysen in unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt.

Zur Analyse der Zyklin-Kinasen der transfizierten Zellen wurden mit magnetischen MicroBeads gekoppelte gegen das H-2K^K-Oberflächenprotein gerichtete Antikörper eingesetzt. Nach Bindung auf den Membranen transfizierter Zellen konnten diese dann durch magnetische Sortierung separiert und analysiert werden.

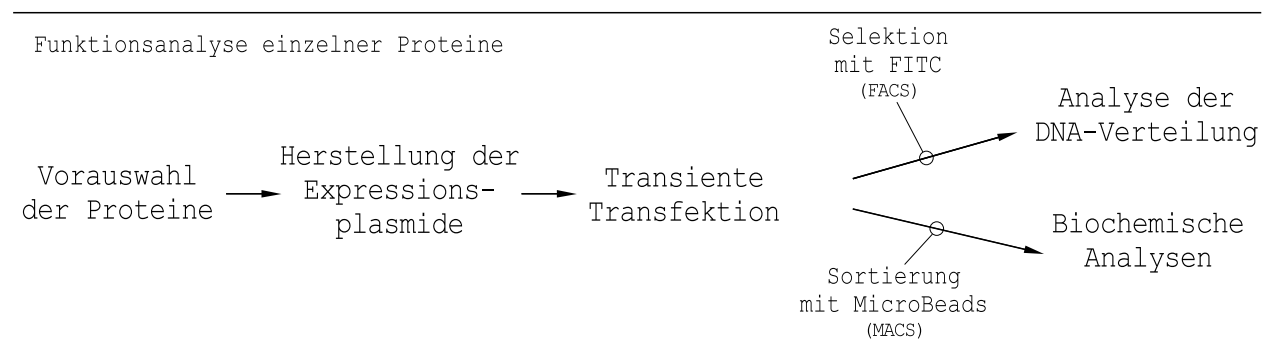


Abbildung 3.1: Darstellung des experimentellen Ablaufs

Darüber hinaus wurden für die drei untersuchten *Immediate Early*-Proteine mit Hilfe der vorhandenen 3HA-markierten Expressionsvektoren einige potente siRNA-Fragmente identifiziert. Diese zur viralen mRNA komplementären Sequenzen sind in der Lage im Rahmen einer sog. Knock-Down-Analyse im Kontext der viralen Infektion die Expression des entsprechenden Proteins effektiv zu supprimieren und damit selektiv auch dessen Funktion zu inhibieren, ohne jedoch sämtliche anderen viral kodierten Proteine zu beeinflussen. Die identifizierten Sequenzen liefern damit ein wichtiges Werkzeug für weitere Charakterisierungen dieser Proteine und ihrer Funktionen.

Für das Protein IE3 wurde abschließend eine Mutationsanalyse durchgeführt. Dr. Qiyi Tang (Wistar Institute, Philadelphia) stellte dafür vier Expressionsvektoren zur Verfügung, welche jeweils eine unterschiedliche Deletionsmutante von *IE3* sowie ein daran N-terminal

fusioniertes *GFP*-Gen trugen. Neben der Zellzyklusanalyse der einzelnen Mutanten konnten in der Fluoreszenzmikroskopie unterschiedliche intrazelluläre Verteilungsmuster mit Hilfe des GFP-Proteins dargestellt werden.

3.2 Vorauswahl der Kandidatengene

Bei der Auswahl der zu untersuchenden Proteine wurde auf Basis eines Proteinsequenzvergleichs eine Suche in allen zum Zeitpunkt der durchgeführten Klonierungen (Herbst 2003) bekannten und in der zentralen Proteindatenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* registrierten Sequenzen durchgeführt. Die hierfür verwendete Software BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool for Proteins) wurde mit den Standard-Vorgaben verwendet. Darüber hinaus wurde eine manuelle Suche in der vorhandenen Literatur (Kapitel 1.4.3) zu Proteinen von HCMV und MCMV durchgeführt, um die bisherigen Kenntnisse über deren Struktur- bzw. Funktionsähnlichkeiten mit berücksichtigen zu können.

Ausgehend von den vier HCMV-Proteinen — IE1, IE2, pp71 und pUL69 — für welche ein Einfluss auf die Zellzyklusprogression beschrieben ist (1.4.2), wurde die oben genannte Suche begonnen. Die hierbei gefundenen Sequenzhomologien werden im Folgenden für die einzelnen Faktoren beschrieben. Der Vergleich blieb nicht auf die Basensequenz der zugrunde liegenden Gene beschränkt, sondern berücksichtigte ebenfalls die im entsprechenden Leseraster kodierte Aminosäurefolge. Hierbei bewertet der zugrunde liegende Algorithmus den Austausch zweier Aminosäuren nach strukturellen, chemischen und funktionellen Gesichtspunkten [139], es wurde zur Gewichtung die zur Standard-Suche übliche *BLOSUM62*-Matrix verwendet. Übereinstimmung bei Ähnlichkeit der Aminosäuren werden in den Abbildungen zu einzelnen Proteinen direkt genannt.

Zunächst sollen die Ergebnisse für die Tegument-Proteine pp71 und pUL69 dargestellt werden. Für pp71 wurden durch die BLASTP-Suche zwei potenzielle Homologe im MCMV-Proteom identifiziert, das sog. *Upper Matrix Protein* M82 und das *Lower Matrix Protein* M83. In Abbildung 3.2 sind die jeweilig homologen Sequenzen zu pp71 gezeigt und entsprechend übereinstimmende bzw. ähnliche Aminosäurepaare prozentual angegeben. Proteine mit einer vergleichbaren Übereinstimmung finden sich auch bei Zytomegalieviren anderer Spezies, z. B. der Ratte, so kann auch eine teilweise konservierte Funktionshomologie vermutet werden. Zusätzlich zeigte eine reverse Suche (nicht gezeigt) Homologie zum pp65-Protein

des humanen Zytomegalievirus, auch ein Tegument-Bestandteil für welchen zwar bisher keine Zellzyklusaktivität, jedoch immunogene Eigenschaften beschrieben sind.

Wie bereits erwähnt (1.4.2) findet sich bei pp71 das RB-Konsensus-Bindungselement RxCxD/E. Für die MCMV-Homologen findet sich auch eine zu pp71 entsprechend teilkonservierte Sequenz an ähnlicher Position, für M82 KAISDP und für M83 KTCSDP (identische Aminosäuren unterstrichen). Jedoch sollte hier bedacht werden, dass trotz ähnlicher Aminosäure-Sequenz möglicherweise die Funktion nicht konserviert ist. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass bisher kein Funktionshomolog im MCMV-Proteom bezüglich der RB-Bindung identifiziert werden konnte [persönliche Kommunikation, Rob Kalejta].

Für das pUL69-Protein konnte durch den Algorithmus M69 als homologes Protein von MCMV identifiziert werden. Auch dieses Protein findet sich bei einer Reihe von Zytomega-

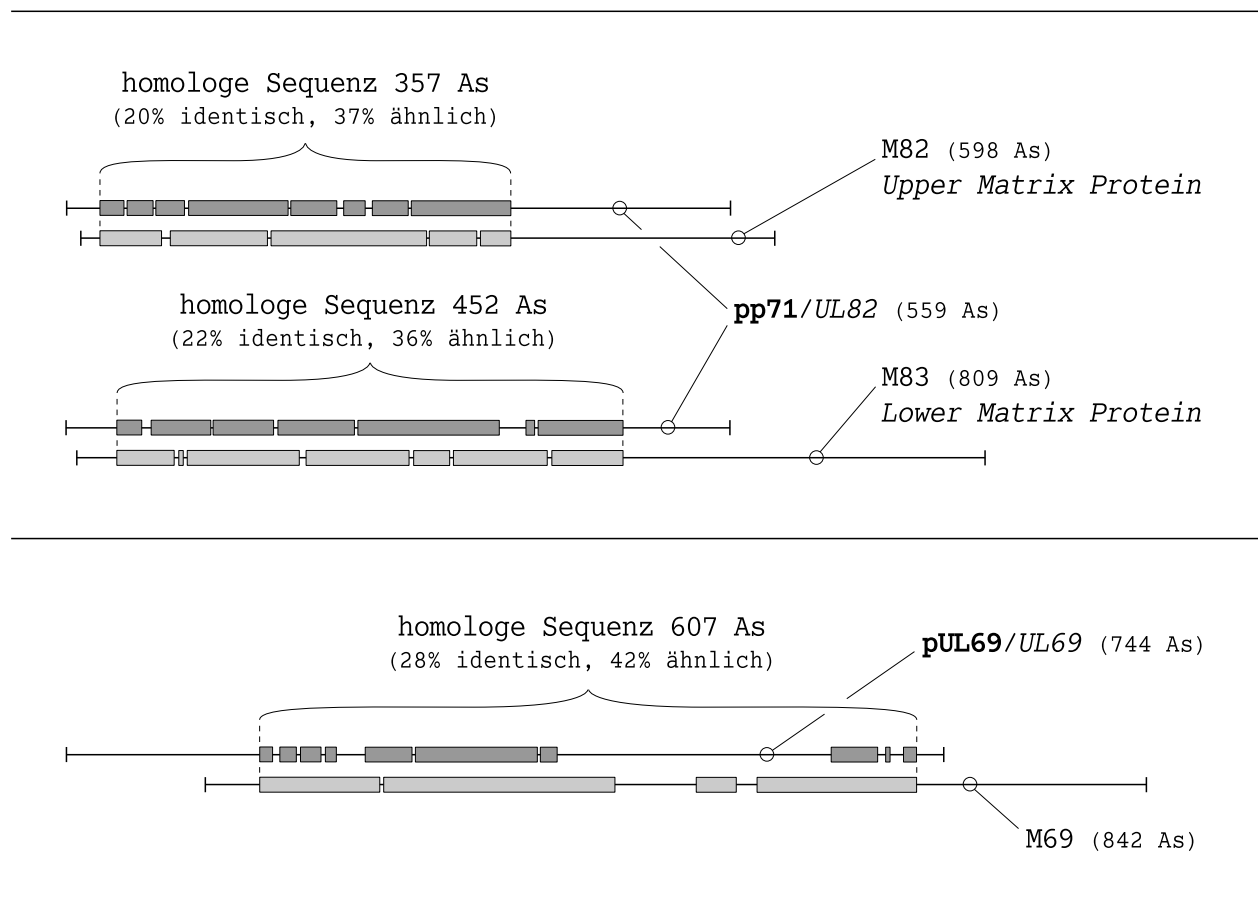


Abbildung 3.2: Ergebnisse der BLASTP-Suche für die beiden Tegument-Proteine pp71 (oben) und pUL69 (unten). Im jeweils oberen Balken (dunkel) sind homologe Sequenzen des HCMV-Proteins, im unteren (hell) des MCMV-Proteins gezeigt. Prozentuale Ähnlichkeit nach *BLOSUM62*-Matrix kalkuliert. As – Aminosäuren.

lieviren anderer Spezies teilkonserviert. Da über den Aufbau von pUL69 bisher keine Daten vorliegen, erübrigt sich hier ein Vergleich einzelner Substrukturen.

Bei der Suche nach Proteinen, welche Homologien zu IE1 zeigen, konnten ausschließlich Proteine in Zytomegalieviren verschiedener Affen-Arten (Daten nicht gezeigt) gefunden werden. Für das Zytomegalievirus der Maus wurde kein Protein identifiziert.

Für das wichtige *Immediate Early*-Protein IE2 von HCMV konnte wie bereits vorher beschrieben ein deutlich konserviertes Protein bei MCMV aufgezeigt werden, es wird der Nomenklatur [25] nach als IE3 bezeichnet. Abbildung 3.3 zeigt das Ergebnis dieses Vergleichs, bei dem identische Parameter wie bei der Tegument-Protein-Suche verwendet wurden. Die in einer Vorarbeit [104] aufgezeigte funktionelle sog. *Core-Domäne* (in der Zeichnung dunkel) des IE2_{human}-Proteins, die sich nach dort durchgeführten Mutationsanalysen zwischen den Positionen 450 und 552 befindet, liegt vollständig in einem Bereich mit starker Homologie zu IE3. Die Multifunktionalität von IE2_{human} (siehe Kapitel 1.4.2) konnte teilweise in dieser Region wiedergefunden werden, so liegt die Vermutung nah, dass es sich bei IE3 für die MCMV-Infektion auch um ein regulatorisch wichtiges Protein mit unterschiedlichen Funktionen handeln kann.

Ähnlich wie bei den *Immediate Early*-Proteinen von HCMV steht das IE3-Protein unter starkem Einfluss eines spezifischen Promotors, der auch hier *Major Immediate Early Promotor* (*MIEP*) genannt wird. Bei der Analyse dieses Promotors [25] und der von ihm regulierten Gene (Abbildung 3.4) zeigten sich neben IE3 noch zwei weitere Proteine die als IE1 [91,94]

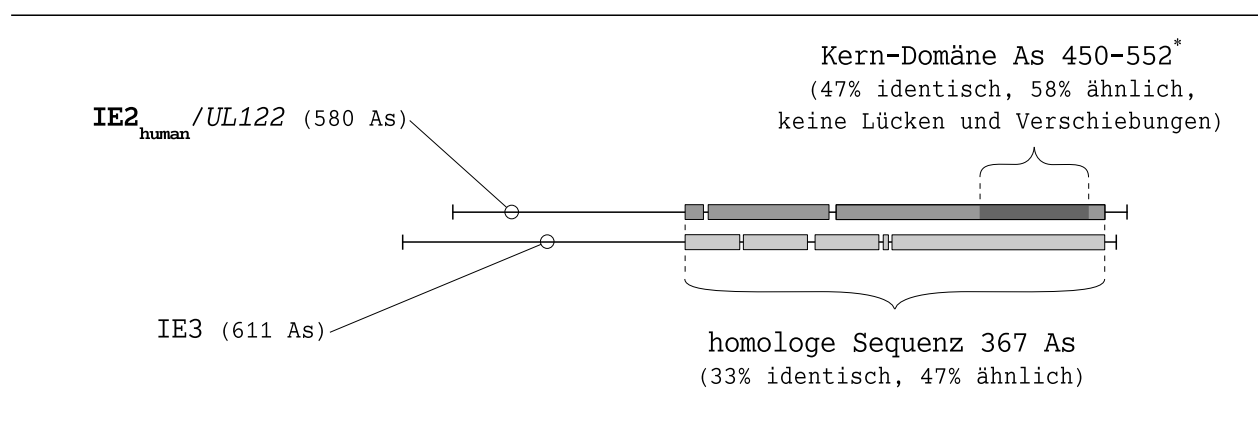


Abbildung 3.3: Ergebnisse der BLASTP-Suche für das HCMV-Protein IE2 im oberen Balken (dunkel), das homologe MCMV-Protein IE3 im unteren Balken (hell). Prozentuale Ähnlichkeit nach *BLOSUM62*-Matrix kalkuliert. As – Aminosäuren.

* Angaben nach [104], Erläuterung dazu im Text.

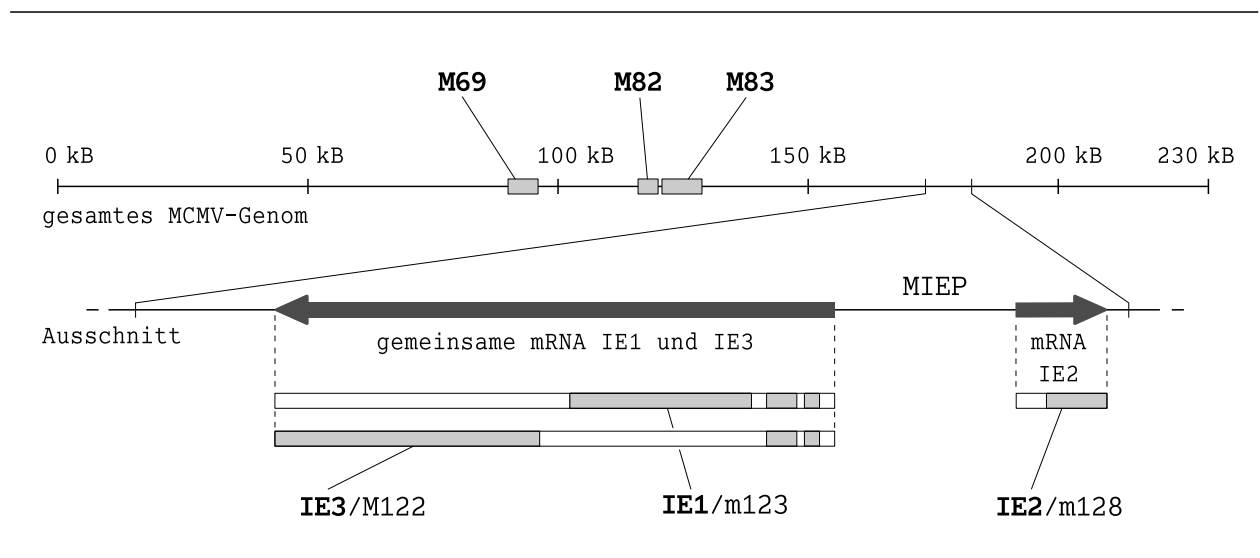


Abbildung 3.4: Positionen der untersuchten Gene im MCMV-Genom (etwa 230 kB). Oben direkte Positionen der ungespleissten Gene der Tegument-Proteine, darunter Ausschnitt aus der *MIEP*-Region. IE1 und IE3 als Spleiss-Varianten einer gemeinsamen mRNA.

und IE2 [92] bezeichnet werden und bei entsprechender Stimulation [90] exprimiert werden. Neben IE3 wird aus einer gemeinsamen mRNA ein weiteres Protein (IE1) mit einer höheren Rate translatiert. Durch unterschiedliches Spleissen entstehen so zwei verschiedene Proteine, welche die beiden beginnenden sehr kurzen Exons teilen (Exon 2 und 3, Exon 1 wird nicht translatiert). Gemeinsam mit Exon 4 entsteht so *IE1*, mit Exon 5 *IE3*. Beide Gene finden sich entgegen aller anderen untersuchten auf dem Minusstrang, *IE2* (nur aus Exon 3) auf dem Plusstrang. Für die entsprechenden Proteine IE1 und IE2 wurden keine Homologien im Sequenzvergleich auf Aminosäureebene gefunden. Trotzdem wurden sie in die Analysen mit einbezogen.

Da bisher für *Early*-Proteine von HCMV kein Einfluss auf den Zellzyklus der Wirtszelle gezeigt werden konnte, wurden keine Proteine dieser Gruppe untersucht.

Tabelle 3.1 zeigt die analysierten Gene und Proteine. Die entsprechenden Expressionsplasmide hierzu wurden wie in Kapitel 2.1 beschrieben hergestellt.

3.3 Nachweis der Protein-Expression

Nachdem wie beschrieben die Expressionsplasmide zur Verfügung standen, sollte vor der eigentlichen Funktionsprüfung die Expressionsfähigkeit dieser Vektoren im eukaryontischen Kontext allgemein untersucht werden. Zu diesem Ziel wurden zwei unterschiedliche Ansätze

Gen	Protein	HCMV-Homolog	Position	Länge	Gewicht*	gespleisst
<i>M69</i>	M69	pUL69 [†]	96.193	842 As	90.0 kDa	nein
<i>M82</i>	M82	pp71 [†] , pp65 [†]	115.711	598 As	67.4 kDa	nein
<i>M83</i>	M83	pp71 [†] , pp65 [†]	117.614	809 As	90.9 kDa	nein
<i>M122</i>	IE3	IE2 [†]	181.766	611 As	68.1 kDa	ja (3 Exons)
<i>m123</i>	IE1	IE1 [△]	181.766	595 As	66.7 kDa	ja (3 Exons)
<i>m128</i>	IE2	–	186.085	404 As	45.5 kDa	ja (1 Exon)

Tabelle 3.1: Übersicht untersuchter MCMV-Gene mit wichtigen Gen- und Proteineigenschaften als Ergebnis der Homologie-Suche. As – Aminosäuren, kDa – Kilodalton.

* aus den Aminosäurehäufigkeiten errechnetes theoretisches Gewicht. [†] statistische Sequenzhomologie.

[△] bekannte Funktionshomologie.

verfolgt. Zum einen sollte die Plasmid-DNA direkt im Rahmen einer In-Vitro-Translation (Kapitel 2.3.1) eingesetzt werden, zum anderen wurde die Expression in den zu untersuchenden Zellen — exemplarisch an NIH-3T3-Zellen — nachgewiesen. Beides ist in den nun folgenden Teilkapiteln dargestellt.

3.3.1 In-vitro Nachweis

Der Nachweis der Proteinexpression durch In-vitro-Translation gelang mit der autoradiographischen Darstellung des in den Proteinen eingebauten radioaktiv markierten Methionins. Hierbei spielen die immunologischen Proteineigenschaften außerhalb des Gellaufs keine Rolle, es wird lediglich eine Aussage über das Laufverhalten möglich welches einen Hinweis auf die Proteingröße gibt. Für fünf der sechs untersuchten Expressionsplasmide konnten auf diese Weise distinkte Banden im Gel detektiert werden (Abbildung 3.5), für das *pCI-neo-3HA-M69*-Plasmid konnte jedoch keine bzw. nur eine sehr schwache Proteinexpression nachgewiesen werden. Da bei dieser Methode grundsätzlich sämtliche während der Reaktion generierten Proteinfragmente aufgezeichnet werden, ist mit einer Reihe von unspezifischen Banden welche nicht das Zielprotein zeigen zu rechnen. Für die gezeigten Plasmide finden sich in fünf Fällen Proteine nachvollziehbarer Größe (für theoretische Größen siehe Tabelle 3.1), wobei für das 3HA-Tag etwa 5.0 kDa zu berücksichtigen sind. Besonders deswegen ist ein Vergleich mit bereits durchgeführten Expressionsanalysen der untersuchten Proteine schwierig (z. B. [90–94,103]), da sich Proteinstruktur und damit das Laufverhalten im SDS-Gel verändert haben können.

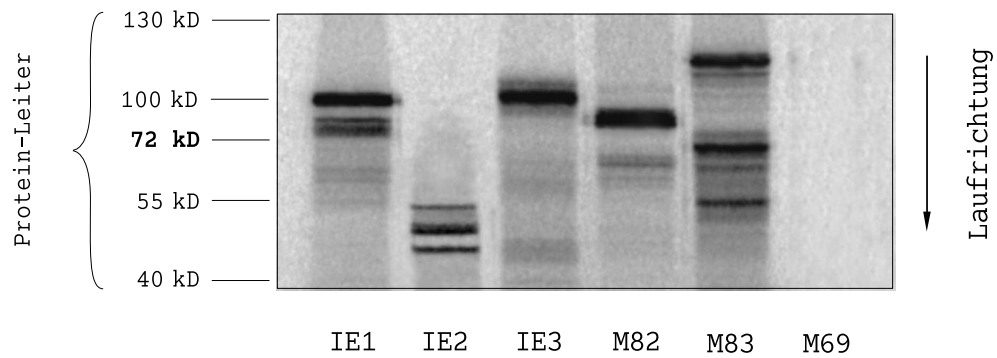


Abbildung 3.5: Autoradiographische Darstellung nach In-vitro-Translation der Expressionsplasmide zu genannten Proteinen. Für M69 konnte kein Nachweis geführt werden. Theoretische Größen siehe Tabelle 3.1. 8%-SDS-Gel.

Wichtigstes Ergebnis dieser Untersuchung ist, dass für die genannten Proteine ein frühzeitiger Abbruch der Proteinsynthese und eine Verschiebung des Leserasters ausgeschlossen werden konnte.

3.3.2 Nachweis der Expression in NIH-3T3-Zellen

Für den direkten Nachweis einer Proteinexpression im realen Kontext der zu untersuchenden Zelle wurden NIH-3T3-Zellen nach dem beschriebenen Vorgehen transfiziert (2.2.2), 36 h nach Beginn der Transfektion geerntet und die Zell-Extrakte im SDS-Gel aufgetrennt. Über ihren 3HA-Tag konnten die transfizierten Faktoren nun durch Anti-HA-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 3.6). Mit dieser Vorgehensweise konnte nun auch für das *pCI-neo-3HA-M69*-Plasmid eine Proteinexpression erwarteter Größe detektiert werden, für die anderen fünf untersuchten Plasmide konnten die aus der In-vitro-Untersuchung gewonnenen Ergebnisse bestätigt werden. Zusätzlich konnte die Expression des als Kontrolle benutzten *pSG5-3HA-IE2_{human}*-Plasmids nachgewiesen werden (ganz rechts in der Abbildung).

Besonders für die Spuren IE1 und M69 zeigt sich jeweils eine zusätzliche Bande mit deutlich schnellerem Laufverhalten im Gel, als dies für die erwartete Proteingröße anzunehmen wäre. Möglicherweise handelt es sich um Nebenprodukte mit unterschiedlicher posttranslationaler Modifikation oder sich bereits im Abbau befindliche Proteinfragmente mit erhaltenem und entsprechend detektierbarem HA-Tag.

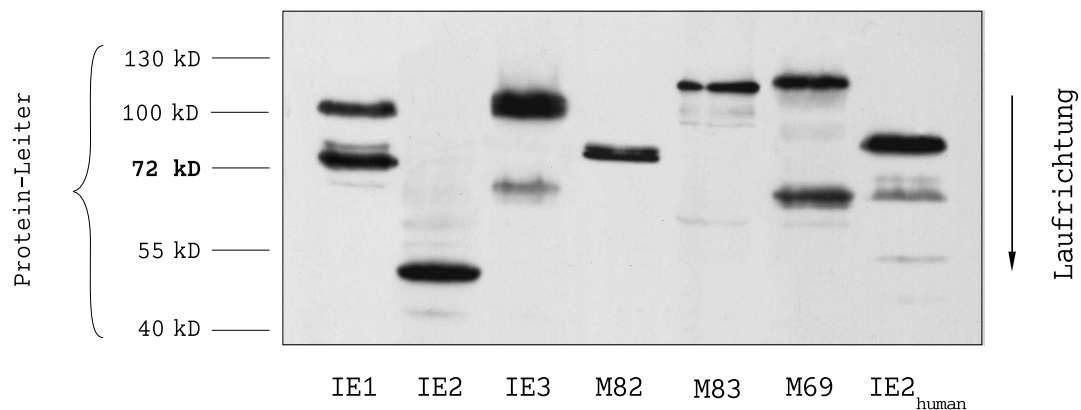


Abbildung 3.6: SDS-Auftrennung einfacher Proteinextrakte nach Kalzium-Phosphat-Transfektion der entsprechenden Plasmide. Die Proteine tragen ein 3HA-Tag welches spezifisch durch Anti-HA-Antikörper markiert ist. 8%-SDS-Gel.

3.4 Analyse der Zellzyklusprogression von transfizierten Zellen im FACS

Nachdem nun gezeigt wurde, dass aus den für die Untersuchung bereitstehenden Plasmi-
den (Tabelle 2.1) nach Transfektion in NIH-3T3-Zellen Proteine der erwarteten Größen ex-
primiert wurden (3.3), wurde als erste und grundlegende Funktionsanalyse der allgemeine
Einfluss dieser Proteine auf den Zellzyklusverlauf bestimmt. Zuerst wurden NIH-3T3-Zellen,
später weitere Zelllinien (Tabelle 2.6) untersucht, wobei das Verfahren der Durchflusszyto-
metrie (2.3.5) angewandt wurde. Das allgemeine Prozedere und die gesetzten Rahmenbedin-
gungen für die Analyse der gemessenen Daten werden im Folgenden strukturiert eingeführt.

3.4.1 Grundlagen

Für alle durchflusszytometrischen Analysen wurde aufgrund der teilweise geringen Trans-
fektionseffizienzen besonders für NIH-3T3-Zellen (2.2.3) ausschließlich mit einem die sicher
transfizierten Zellen indizierenden Oberflächenmarker gearbeitet. Hierzu wurde für alle Ex-
perimente das H-2K^K-Protein verwendet, ein MHC-Protein der Klasse I (Maus). Die Ex-
pression wurde über die Kotransfektion mit dem entsprechenden *pMACS K^K.II*-Plasmid
bewirkt. Grundlage für dieses Vorgehen ist die allgemeine Beobachtung, dass bei der hier
verwendeten Transfektionsmethode (Kalzium-Phosphat) alle prinzipiell transfizierbaren Zel-
len im Intervall der eigentlichen Plasmid-Exposition nicht nur das im Überschuss vorhandene
Effektorplasmid (80%), sondern auch gleichzeitig mit ähnlicher Effizienz das Markerplasmid
(*pMACS K^K.II*, 20%) aufnehmen. Folglich beobachtet man eine proportional hohe Expres-
sion des Oberflächenmarkers in Zellen mit ebenfalls hoher Expression des Effektorplasmids
(fremde und eigene Beobachtung, für NIH-3T3-Zellen verifiziert, Daten nicht gezeigt).

Um die Zellen mit dem genannten Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie (im
Folgenden kurz FACS) identifizieren zu können, wurden diese Proteine mit einem Fluores-
zenz-Farbstoff gekoppelten Antikörper (H-2K^K-FITC) markiert (2.3.5). Das Emissionsspek-
trum dieses FITC-Farbstoffs ist in Abbildung 2.7 gezeigt, allgemein wurde dieser Farbstoff
in Kanal FL1 detektiert.

Abbildung 3.7 zeigt die für alle FACS-Analysen durchgeführte Selektion (engl. *Gating*),
vorbereitend für eine spezifische und unverfälschte Darstellung des eigentlich zu untersuchen-
den DNA-Profiles. In Teilbild (a) ist das übliche Diagramm für eine NIH-3T3-Zellpopulation

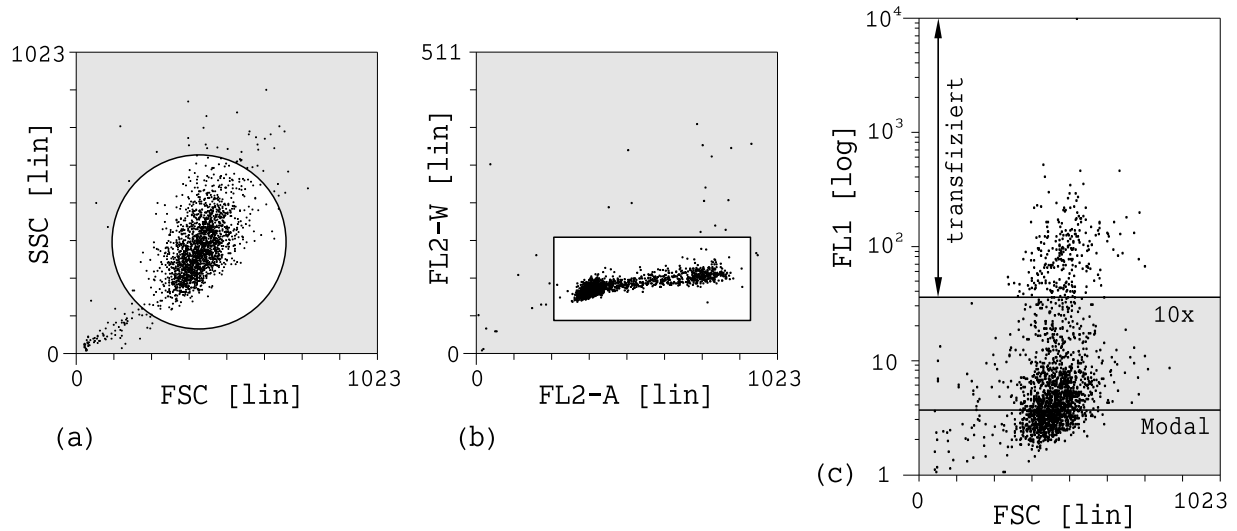


Abbildung 3.7: NIH-3T3-Zellen 24 h nach Ende der Transfektion mit *pSG5* (Leervektor). Übliche Selektionen gegen Zellschrott (a), Dubletten (b) und zur alleinigen Berücksichtigung transfizierter Zellen (c) (FITC-Farbstoff-Intensität in FL1). Die hellen Bereiche werden in die Analyse des DNA-Profiles einbezogen.

gezeigt, FSC (engl. *Forward Scatter*) gibt Auskunft über die Zellgröße, SSC (engl. *Side Scatter*) über Granularität und damit Komplexität der Zelle. Zellschrott (unten links im Diagramm), deutlich atypische oder ballonierte (sterbende) Zellen können so von der Analyse ausgeschlossen werden (graue Flächen in den Diagrammen werden nicht in die Analyse des DNA-Profiles einbezogen). Das Diagramm in Teilbild (b) gibt die Möglichkeit aneinander adhärierende Zellen (sog. Dubletten), die besonders bei der Fixierung entstehen, auszuwählen. Für die eigentliche Selektion der transfizierten Subpopulation wird das Diagramm in Teilbild (c) herangezogen. Wie bereits oben erwähnt wird in Kanal FL1 (530 nm) der über Markerprotein und Antikörper an den Zelloberflächen gebundene FITC-Farbstoff aufgenommen. Im Rahmen dieser Arbeit werden Zellen als ausreichend transfiziert angesehen, bei denen eine mehr als zehnfache FL1-Intensität als der Modalwert der gesamten (bzw. nicht transfizierten) Population detektiert wird. Die entsprechenden Selektionen (engl. *Gates*) wurden für jedes Telexperiment neu justiert, um Schwankungen bei der Transfektion und das unterschiedliche Verhalten verschiedener Zelltypen zu berücksichtigen.

Letztlich Ziel der FACS-Analysen war es, ein DNA-Profil der zu bewertenden Subpopulation zu generieren. Dafür wurde die zelluläre DNA nach Permeabilisierung der Zellmembranen durch Fixierung in Ethanol (2.3.5) mit Propidiumjodid (PI) gefärbt. Dieser Farbstoff kann (siehe Abbildung 2.7) in den Kanälen FL2 und FL3 gemessen werden, hier wurde Kanal

FL2 (585 nm) benutzt.

Bei gleichzeitiger Messung in zwei verschiedenen Kanälen entsteht das Problem, dass die eingesetzten Farbstoffe über einen breiten Spektralbereich emittieren können und somit Signale in einem Kanal verstärken, welcher möglichst spezifisch einen anderen Farbstoff detektieren soll. Dazu können in der verwendeten Software (2.6) Verknüpfungsfaktoren zwischen den einzelnen Kanälen angegeben werden, die direkt während der Messung einen Teil der sonst entstehenden Fehlinformation herausfiltern können. Anwendungsbeobachtungen (Dr. L. Wiebusch) und Erfahrungswerten unter www.molbio.princeton.edu/facility/flowcyt wurde hierbei Folge geleistet. Auch die einzelnen Vorverstärkungen der Kanäle wurden nach Erprobung und vorherigen Beobachtungen eingestellt.

Die nebenstehende Abbildung (3.8) zeigt das typische DNA-Profil einer mit *pSG5*-Leervektor transfizierten und 24 h nach Ende der Transfektion geernteten Zellpopulation. Der in FL2 gemessene DNA-Gehalt der Zellen ist auf der linear skalierten Abszisse aufgetragen. Zellen mit einfachem DNA-Gehalt (z. B. diploide Zellen in G_0 und G_1) stellen gewöhnlich den Hauptteil einer nach Transfektion frei zyklierenden 3T3-Population dar (hier etwa 62%, links im Bild grau unterlegt). Der Modalwert für Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt (z. B. tetraploide Zellen in G_2 und M) liegt bei der etwa doppelten Intensität in FL2 und entspricht der doppelten Anreicherung mit Propidiumjodid bei doppelter DNA-Menge. Dort finden sich in der Regel deutlich weniger Zellen (hier 22%, rechts grau unterlegt). Zellen mit intermediärem DNA-Gehalt (z. B. in der S-Phase) finden sich im plateauartigen Bereich in der Mitte (nicht unterlegt). Leider ist es mit dieser Methode nicht möglich, Zellen am Übergang in die bzw. aus der S-Phase von Zellen mit einfachem bzw. doppeltem DNA-Gehalt zu unterscheiden.

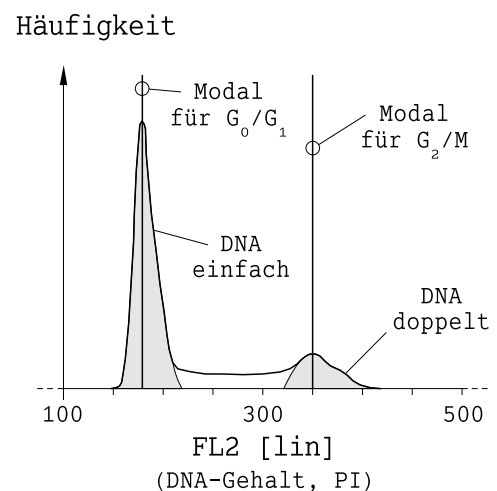


Abbildung 3.8: Typisches DNA-Profil leervektortransfizierter 3T3-Zellen. Subpopulationen mit einfachem und doppeltem DNA-Gehalt grau unterlegt.

Die im Folgenden gezeigten FACS-Analyse-Daten sind in jeweils mindestens drei gleich verlaufenden Experimenten überprüft worden, für die Abbildungen ist repräsentativ ein zu-

sammenhängender Datensatz aus einem experimentellen Ansatz gewählt. Nach Selektion wurden so 8–20 mal 10^3 Zellen als Basisdaten für die Häufigkeitsverteilungen herangezogen. Zahlen und Balkendiagramme führen Mittelwerte aus verschiedenen Ansätzen. Die Bestimmung der Zyklusphasen-Zugehörigkeit wurde sowohl manuell als auch automatisiert (2.6) durchgeführt.

3.4.2 Zellzyklusanalyse in 3T3-Zellen

Es sollte geklärt werden, ob eines der eingesetzten Effektorproteine (IE1, IE2, IE3, M82, M83 und M69) einen Einfluss auf den Zellzyklusverlauf hat. Zunächst wurde eine murine Zelllinie (NIH-3T3) untersucht. Wie weiter unten beschrieben wurden zum Vergleich auch andere (Mensch und Ratte) Zelllinien hinzugezogen (2.2.1).

Zum zeitlichen Ablauf dieses Experiments gibt Abbildung 3.9 einen orientierenden Überblick. 24 h nach dem Ausplattieren der Zellen (2.2.1) wurden sie mit den entsprechenden Plasmiden für 14 h transfiziert (2.2.2), gewaschen und weitere 24 h später geerntet und nach Fixierung und Färbung im FACS analysiert (2.3.5).

Abbildung 3.10 zeigt die DNA-Profile der so gemessenen Zellpopulationen. Dabei wurde den unter 3.4.1 genannten Grundlagen bei der Analyse und Aufbereitung der Daten Folge geleistet. Es wird von der Annahme ausgegangen, dass mögliche Genprodukte des *pSG5*-Leervektors keinen Einfluss auf den Zellzyklus der untersuchten Zelllinien haben. So kann dieses DNA-Profil als Vergleichspopulation betrachtet werden. Die in der oberen Reihe gezeigten Abbildungen für IE1, IE2 und M69 zeigten keinen nachvollziehbaren Unterschied in der prozentualen Verteilung (siehe Abbildung 3.12) der einzelnen Zellzykluskompartimente.

Dies galt ebenso für die hier nicht gezeigten Kurven von M82 und M83.

Für das als Positivkontrolle anzusehende IE2_{human} zeigte sich in diesen Ansätzen eine deutliche Akkumulation der Zellen mit einfachem DNA-Gehalt (breiter G₀/G₁-Gipfel) und ein Abfall von Zellen mit höherem DNA-Gehalt. Für das zu den eigentlich untersuchten Proteinen gehörende IE3 (welches die deutlichste Strukturähnlichkeit mit IE2_{human} hat, siehe 3.2) fand sich eine ähnlich geartete Verschiebung im Vergleich zum Leervektor. Bei deutlich gestie-

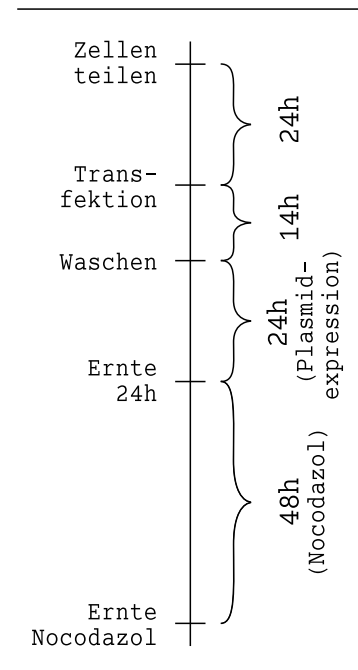


Abbildung 3.9: Zeitskala für die beschriebenen Experimente

genem Anteil von Zellen mit einfachem DNA-Gehalt fanden sich ein flaches S-Phase-Profil (im Gegensatz zur langsam abfallenden S-Phase bei IE2_{human}) und ein deutlich reduzierter Anteil an Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt.

Als weitere Positivkontrolle wurden Zellen mit pX_{myc} - $p16$ -Plasmid transfiziert (unten rechts). Das Genprodukt p16^{INK4a} arretierte als potenter Cdk-Inhibitor die Zellen erwartungsgemäß in G₁.

Von den initial untersuchten Kandidatengenlen führte deren Expression nur im Fall von IE3 zu einem reproduzierbaren Einfluss auf die Zyklusverteilung von NIH-3T3-Zellen. Die Produkte der anderen Plasmide blieben hier ohne sichtbaren Effekt.

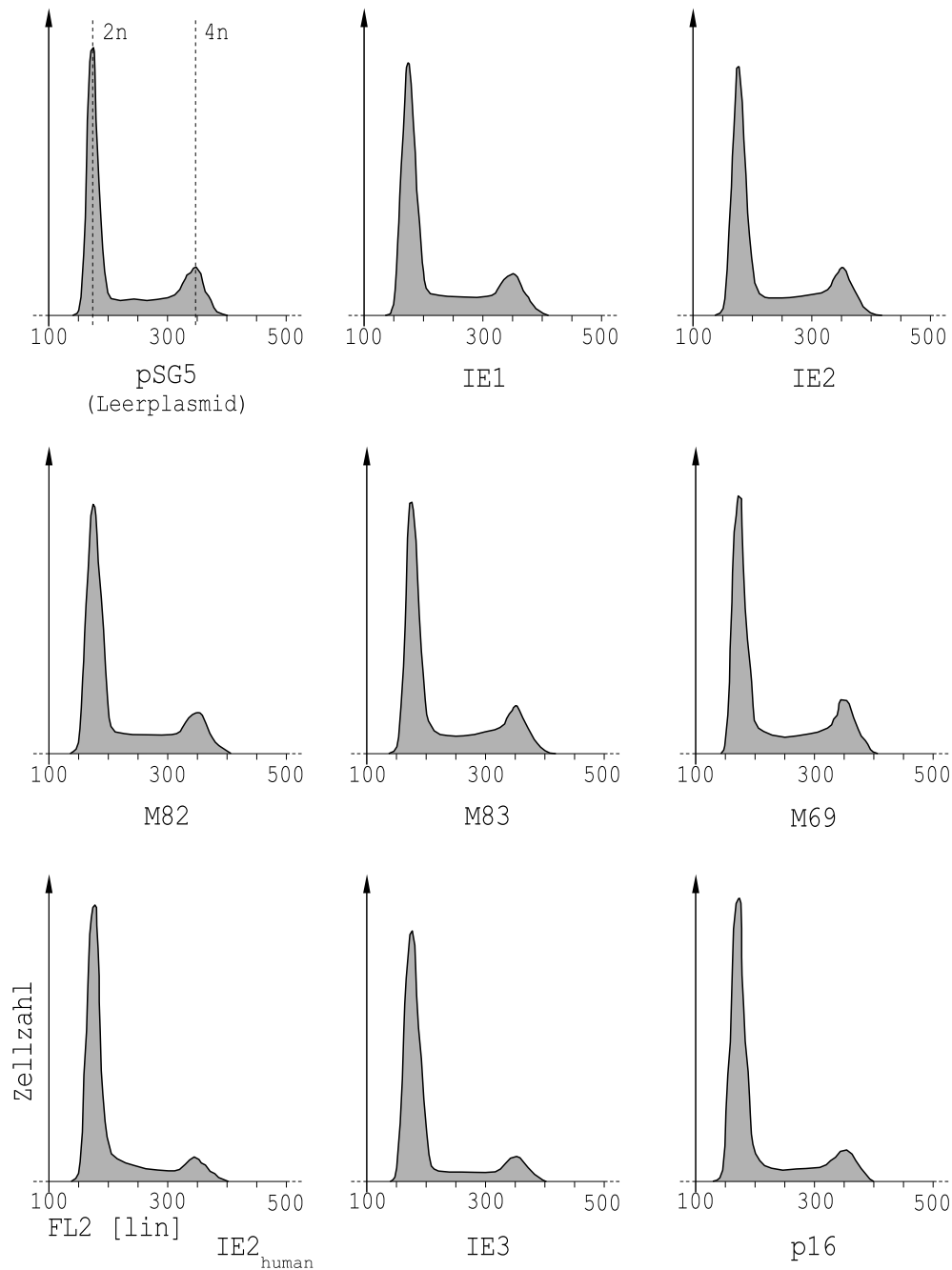


Abbildung 3.10: Zellzyklusanalyse im Durchflusszytometer. Aufgetragen ist die Zellzahl über den DNA-Gehalt (FL2). In der oberen Zeile sind Transfektionen gezeigt, die keinen sichtbaren Unterschied zur Kontrolltransfektion (pSG5, oben links) zeigten, unten Plasmide mit Einfluss auf die Zellzyklusverteilung. Quantifizierung in Folgegrafiken. Einfacher und doppelter Chromosomensatz $2n$ bzw. $4n$.

3.4.3 Nocodazol-Arrest

Aus den oben gezeigten Daten lässt sich noch keine Aussage darüber machen, ob die vermehrte G_1 -Population durch eine verlangsamte oder sogar vollständig blockierte G_1 -Progression

oder zum Beispiel durch einen beschleunigten Zellzyklusverlauf der anderen Phasen begründet ist. Zusätzlich wäre es besonders aussagekräftig, in der Vergleichspopulation (mit *pSG5* transfizierte Zellen) einen minimalen Anteil von Zellen mit einfachem DNA-Gehalt (bisher etwa 62%) als Ausgangswert vorzufinden. So könnte ein deutlicherer Einfluss der untersuchten MCMV-Proteine im Sinne eines fraglichen Arrestes beim Übergang von G_1 in die S-Phase gezeigt werden. Um dem Rechnung zu tragen wurde ein weiteres ähnliches Experiment durchgeführt. Dabei wurden wie in Abbildung 3.9 ersichtlich 24 h nach Ende der Transfektion die weiter in Kultur gehaltenen Zellen für 48 h mit Nocodazol (2.3.5) inkubiert. Nocodazol unterdrückt die Formierung der zur Durchführung der Mitose nötigen Mikrotubuli und blockiert so die Zyklusprogression aus der Prometaphase [135, 136].

Entsprechend dieser Erwartung konnte für NIH-3T3-Zellen nach Transfektion mit *pSG5*-Plasmid eine Akkumulation von Zellen mit zweifachem DNA-Gehalt beobachtet werden (Ab-

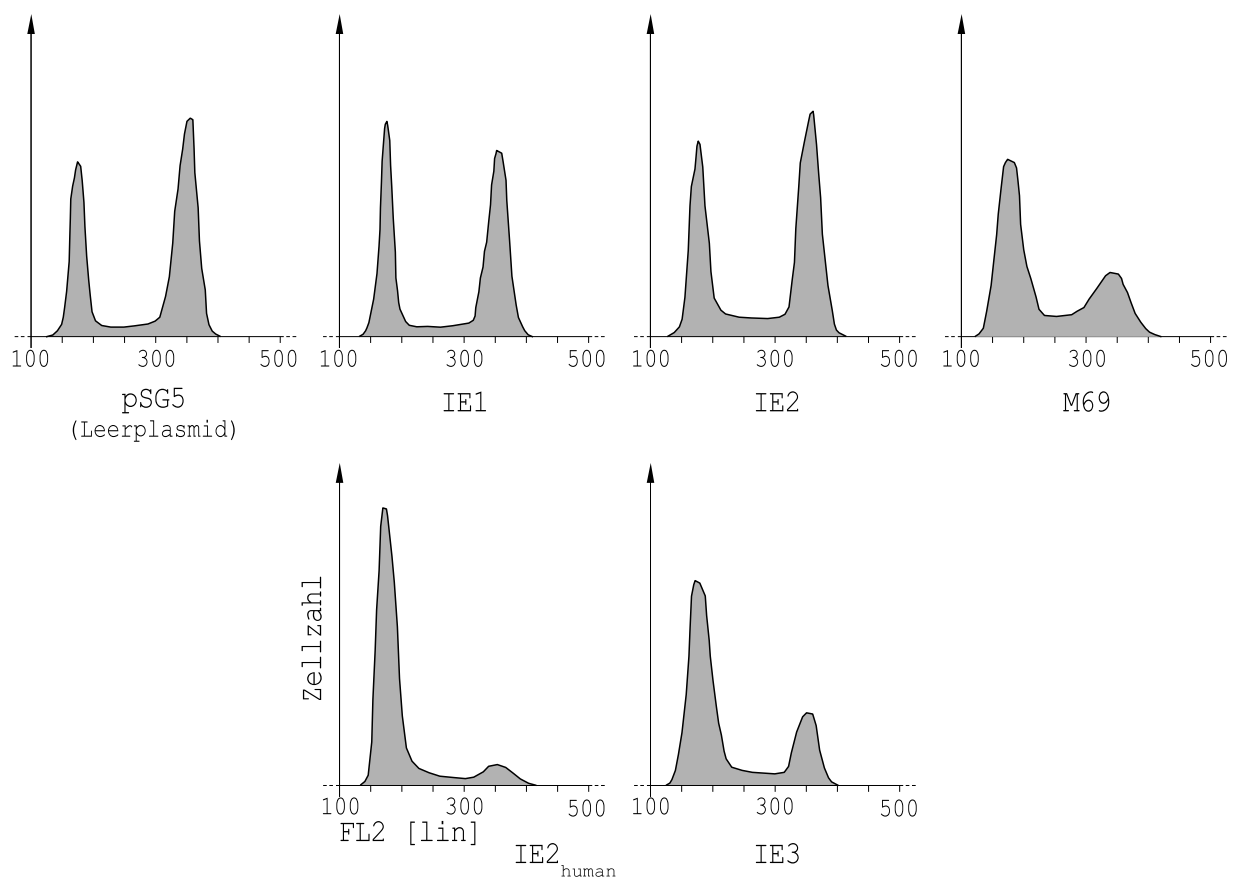


Abbildung 3.11: Die dunkel unterlegten Kurven zeigen DNA-Profile von NIH-3T3-Zellen nach Transfektion, wobei die Kulturen 24 h nach Ende der Transfektion bis zur Ernte für weitere 48 h mit Nocodazol inkubiert wurden. Es zeigte sich für **M69** eine Verschiebung gegenüber der Leerkontrolle.

bildung 3.11, links oben). Bei lediglich etwa 33% der Zellpopulation (statt vorher 62%) fand sich ein einfacher DNA-Gehalt. Für die daneben aufgeführten Abbildungen für IE1 und IE2 fand sich ein in der FACS-Analyse nicht zu unterscheidendes Verhalten.

Allerdings zeigte sich jedoch für M69 ein deutlicher Einfluss, der im initialen Experiment (3.4.2) nicht sichtbar war. Statt der eigentlich zu erwartenden 33% (siehe Abbildung 3.12) für G_0/G_1 fanden sich reproduzierbar deutlich mehr Zellen (etwa 55%) mit einfachem DNA-Gehalt.

Für das bereits als Positivkontrolle verwendete $IE2_{human}$ konnte auch in diesem Experiment ein deutlicher Einfluss auf den Zellzyklus ausgemacht werden. Es konnte davon ausgegangen werden, dass die Zellen bereits durch das $IE2_{human}$ -Protein vor Erreichen der G_2 -Phase arretiert wurden und so nicht durch den Nocodazol-Block mit doppeltem DNA-Gehalt akkumulierten. Einen ähnlichen wenn auch nicht derart vollständigen Einfluss hatte wiederum das MCMV-IE3-Protein. Hier konnte gegenüber der Leerkontrolle (*pSG5*) eine klarere Abgrenzung durch dieses Experiment erreicht werden. Es fanden sich etwa 68% der Zellen in G_0/G_1 . Darüber hinaus kam es durch die Nocodazol-Applikation auch zur Akkumulation in G_2/M (23%).

Neben der schon im ersten Experiment beobachteten Beeinflussung des Zellzyklus im Sinne eines Arrestes zwischen G_0/G_1 und der S-Phase durch das IE3-Protein, konnte hier auch ein Einfluss durch das M69-Protein sichtbar gemacht werden. Für die anderen untersuchten Proteine war auch hier keine Veränderung der Zellzyklusprogression zu erkennen.

Zusammenfassend sind die in diesen beiden Experimenten gewonnenen Daten nach entsprechender Aufbereitung (3.4.1) in Abbildung 3.12 in Form einer Balkenverteilung aufgetragen. Die gesamte Höhe des Diagramms entspricht 100% der bei Beurteilung der DNA-Profile berücksichtigten Zellen, nach jeweiligem DNA-Gehalt wurden diese dann mit Hilfe der Software *ModFit* (siehe Kapitel 2.6) weiter in drei Kompartimente untergliedert.

3.4.4 Zellzyklusanalyse anderer Zelllinien

Nachdem nun der Einfluss des IE3-Proteins auf den Zyklusverlauf von NIH-3T3-Zellen (immortalisierte Maus-Fibroblasten) gezeigt wurde, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt spezifisch ist für die Art (Maus-Zelllinie), den Typ (Fibroblasten) oder die vorhandenen Mutationen (in diesem Fall inaktives $p16^{INK4a}$). Um dies zu untersuchen wurde das zuerst beschriebene Experiment mit sämtlichen oben aufgeführten Parametern für alle in Tabelle 2.6

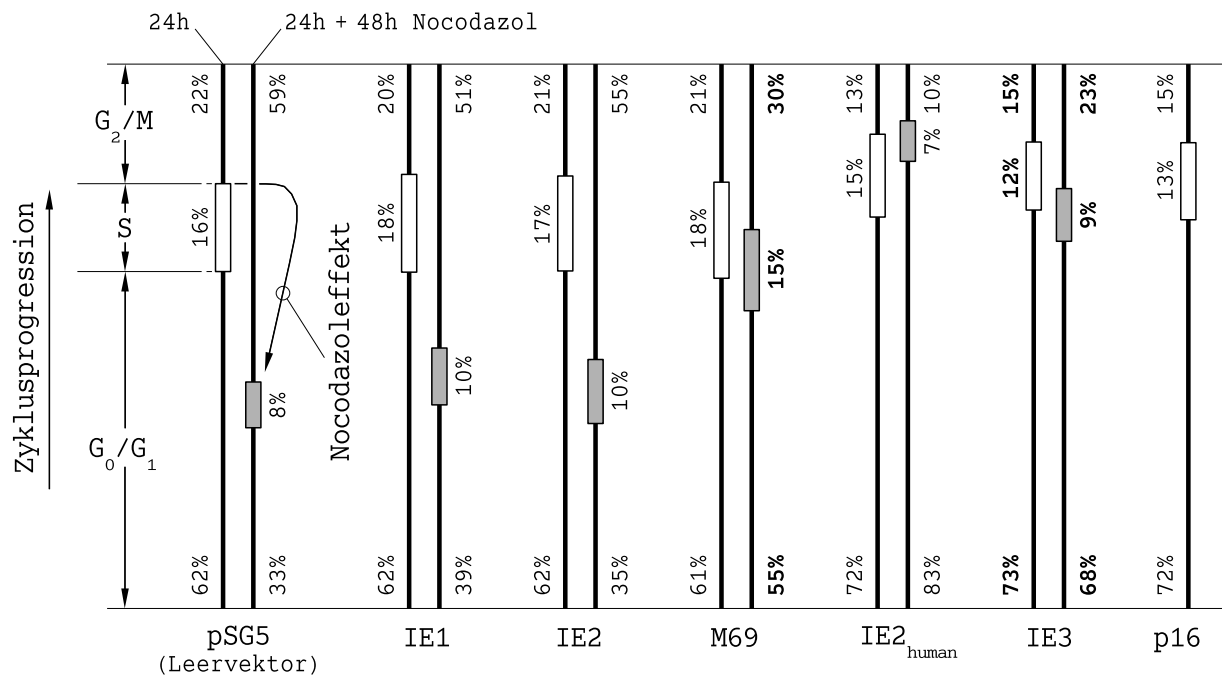


Abbildung 3.12: Zusammenfassend sind die in jeweils drei Kompartimente ausgewerteten Primärdaten aus den Abbildungen 3.10 und 3.11 gezeigt. Am Beispiel von pSG5 sind diese Kompartimente entsprechend benannt. Nicht ausgefüllte Balken repräsentieren das initiale Experiment mit direkter Ernte nach 24 h, grau unterlegte hingegen das Experiment mit zusätzlicher Nocodazol-Exposition. Für pSG5 ist der arretierende Effekt für Zellen mit doppelem DNA-Gehalt von Nocodazol gezeigt. Quantifizierung in Folgegrafiken.

genannten Zelllinien durchgeführt. Bedingt durch die sehr unterschiedlichen Teilungs- und damit Wachstumsraten dieser Zelllinien musste die für die Kalzium-Phosphat-vermittelte Transfektion optimale Zelldichte jeweils experimentell bestimmt werden. Die Ernte fand wie bisher unabhängig von der untersuchten Linie 24 h nach Ende der Transfektion statt.

Insgesamt wurden vier weitere Zelllinien mit menschlichem Ursprung und abschließend auch Ratten-Fibroblasten untersucht. Die primär aufgezeichneten DNA-Profile sind in Abbildung 3.13 dargestellt, dabei entsprechen die Zeilen jeweils einem Experiment mit der am linken Rand indizierten Zelllinie. In der ersten Spalte ist jeweils die Leerkontrolle (pSG5-Vektor), in der zweiten das in den Vorexperimenten den 3T3-Zellzyklus alterierende IE3 aufgeführt. Daneben finden sich die beiden als Positiv-Kontrollen angesehenen Proteine IE2_{human} und p16. Für alle weiteren untersuchten Proteine (IE1, IE2, M82, M83 sowie M69) sind die Primärdaten nicht gezeigt, da sich im Vergleich zur Leerkontrolle in keinem Fall eine Abweichung der DNA-Verteilung zeigte. Dies gilt auch für das im Nocodazol-Experiment auffällige M69-Protein, auch hier konnte ähnlich dem Ausgangsexperiment mit NIH-3T3-Zellen kein

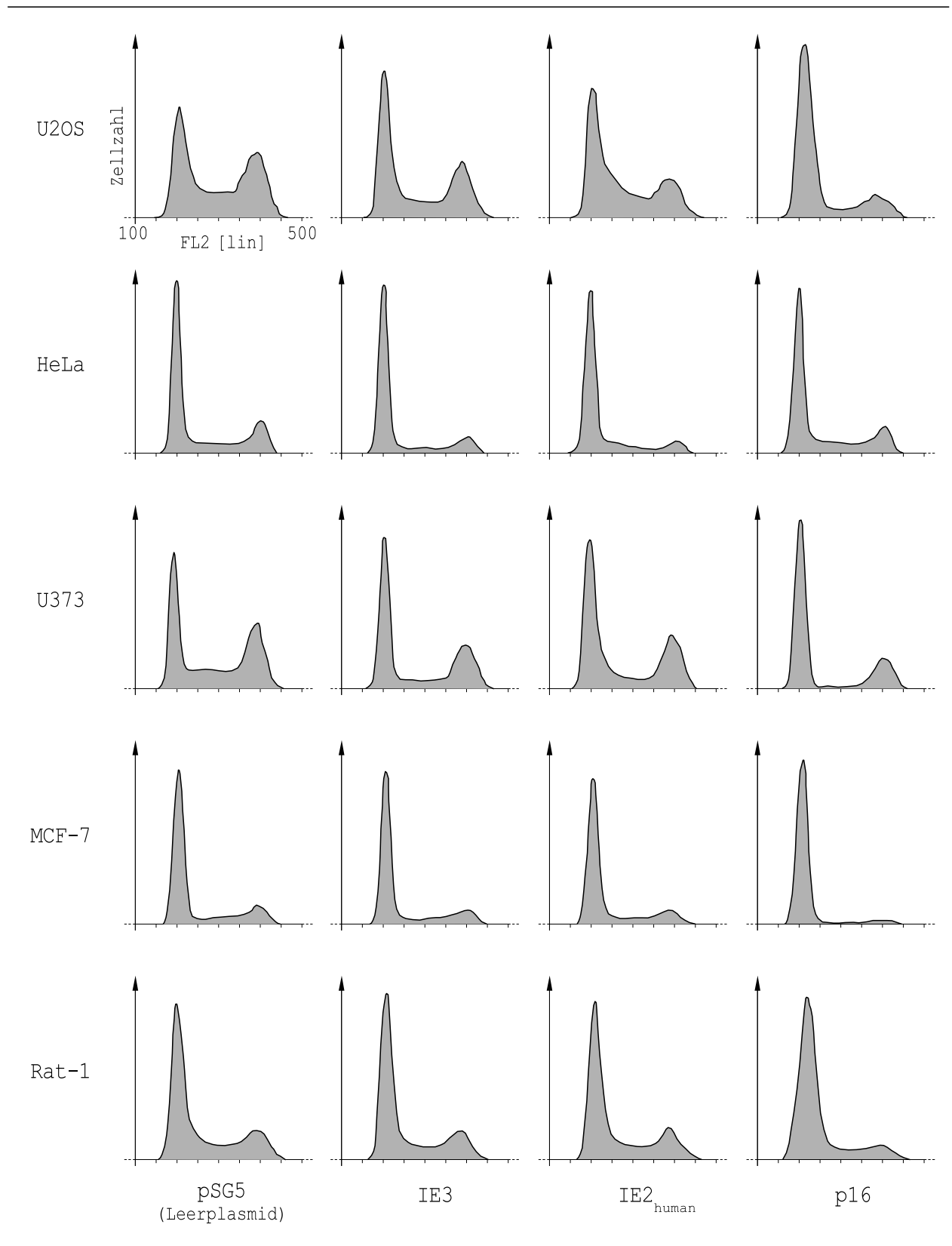


Abbildung 3.13: DNA-Profile der links bezeichneten Zelllinien, 24 h nach Ende der Transfektion mit den unten angegebenen Genen. Die prozentuale Auswertung hierzu ist in Abbildung 3.14 gezeigt.

Effekt ausgemacht werden.

Für das als Positivkontrolle verwendete IE2_{human} wurde für alle untersuchten Zelllinien in einer Vorarbeit [102] bereits ein Arrest zwischen G₀/G₁ und der S-Phase aufgezeigt.

Für die menschliche Osteosarkom-Zelllinie U2OS wurde ein deutlicher Anstieg von Zellen mit einfachem DNA-Gehalt aufgezeichnet (Überblick in Abbildung 3.14), sofern eines der beiden Proteine IE3 oder IE2_{human} exprimiert wurde (53% der Zellen in G₀/G₁ statt 39% in der Leerkontrolle). Noch deutlicher war diese Akkumulation bei der Expression von p16 in U2OS-Zellen, dabei ist zu beachten, dass in dieser Zelllinie ähnlich wie in NIH-3T3-Zellen kein funktionelles p16^{INK4a} vorliegt. Darüber hinaus ist hier auch das zellzyklusrelevante Protein p14^{ARF} nicht funktionell.

Auch für die menschlichen Adenokarzinomzellen HeLa konnte dieser Effekt für beide Proteine nachgewiesen werden, obgleich erschwerend auch schon in der Ausgangspopulation bei Leervektor-Transfektion ein großer Teil der Zellen in G₀/G₁ (60%) vorlagen. Der fehlende Effekt des sonst als Positivkontrolle gewerteten p16^{INK4a}-Proteins beruht auf der Inaktivierung

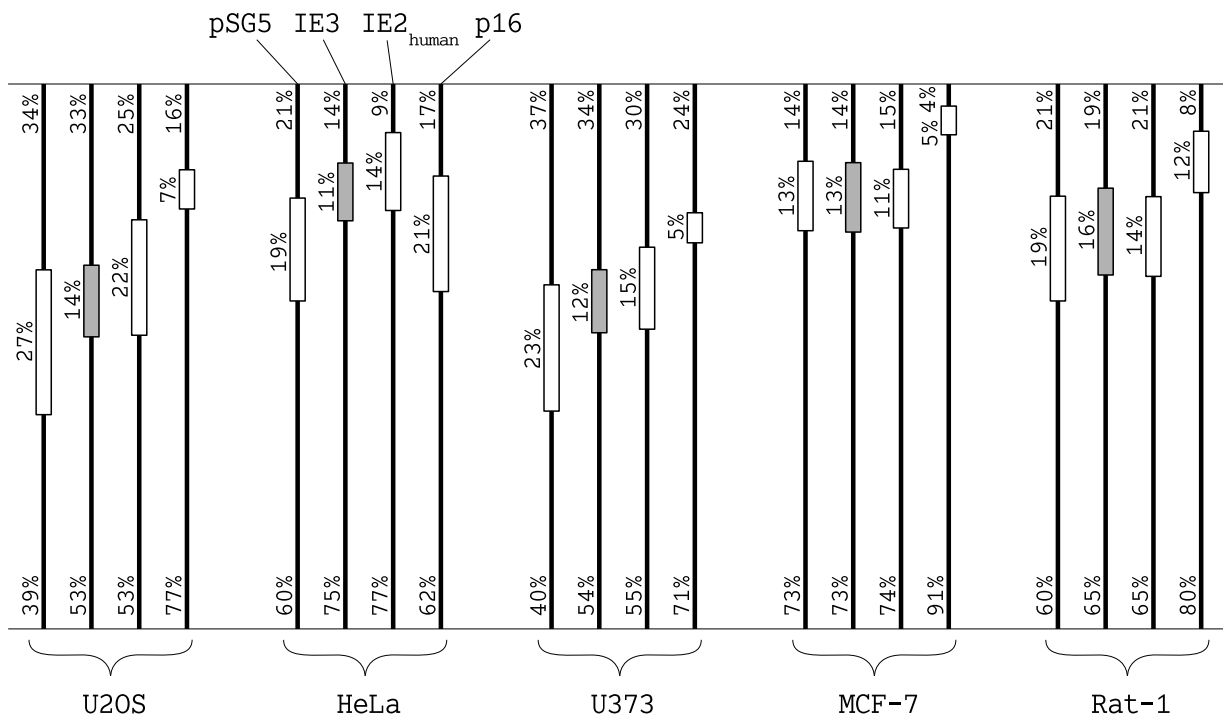


Abbildung 3.14: Nach Zelllinie gruppierte Auswertung der DNA-Profile, die vier Häufigkeitsbalken jeder Gruppe geben die Verteilung nach Transfektion der oben genannten Plasmide wieder. Auch hier wurden alle Ansätze in drei unabhängig nacheinander durchgeführten Experimenten reproduziert.

des Rb-Proteins in HeLa-Zellen, über welches p16 seine G_1 -arretierende Wirkung vermittelt. Zudem ist in dieser Zelllinie das p53-Protein inaktiv.

Auf U373-Zellen (menschliches Astrozytom) basiert ein großer Teil der grundlegenden Vorexperimente [102]. Ähnlich wie dort ($IE2_{\text{human}}$) konnte für IE3 eine Akkumulation der Zellen in G_0/G_1 gezeigt werden (54%/55% statt 40% bei *pSG5*). Für p16-transfizierte Zellen war der Effekt am deutlichsten.

Für MCF-7 (Mammakarzinom, Mensch) wurde für die beiden untersuchten Proteine kein Effekt detektiert, allerdings lagen auch schon in der Ausgangspopulation ein Anteil von 73% der Zellen mit einfachem DNA-Gehalt vor, so dass möglicherweise ein vorhandener Einfluss mit diesem Experiment nicht gezeigt werden kann. MCF-7-Zellen sind p16^{INK4a} und p14^{ARF} negativ.

Abschließend wurde die Rat-1-Zelllinie (Fibroblasten der Ratte, p21^{WAF} negativ) untersucht. Hier konnte kein deutlicher Effekt aufgezeigt werden. Bei positiver p16-Kontrolle stieg der Anteil von Zellen in G_0/G_1 von 60% (*pSG5*) auf 65% für IE3 und $IE2_{\text{human}}$.

Die qualitative Betrachtung der DNA-Profile (Abbildung 3.13) zeigt für U2OS, HeLa und U373 ähnlich wie für NIH-3T3-Zellen im Bereich der S-Phase einen wiedererkennbaren Unterschied zwischen IE3 und $IE2_{\text{human}}$. Während sich für IE3 das S-Phase-Plateau gleichförmig waagerecht findet, ist bei $IE2_{\text{human}}$ ein stetiger Übergang von Zellen des G_0/G_1 -Gipfels in eine dann abfallende S-Phase erkennbar.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass für U2OS, HeLa und U373 der für IE3 in 3T3-Zellen beobachtete Effekt auf das DNA-Profil in ähnlicher Weise zu finden ist, für MCF-7 ist dieser Effekt bei sehr großem G_0/G_1 -Gehalt der Ausgangspopulation jedoch nicht detektierbar. Für die den 3T3-Zellen ähnliche Zelllinie Rat-1 ist ein zwar reproduzierbarer, jedoch nur gering ausgeprägter Effekt zu erkennen. Somit konnte gezeigt werden, dass der bei 3T3-Zellen beobachtete Arrest nicht von Zelltyp, Spezies oder einer spezifischen Mutation abhängig ist. Darüber hinaus werden die jeweils nicht-funktionellen Zellzyklus-relevanten Tumor-Suppressor-Proteine p14^{ARF}, p16^{INK4a}, p53 und Rb offenbar nicht für den G_1 -Arrest von IE3 und $IE2_{\text{human}}$ benötigt.

3.5 Der Einfluss von IE3 auf das Zyklinkinasesystem

Um Einsicht in die Mechanismen der beobachteten Zellzyklus-Veränderungen durch IE3 zu erhalten, wurden in den folgenden Experimenten NIH-3T3-Zellen wie beschrieben transfiziert, geerntet und aufgrund der geringen Transfektionsrate einer Sortierung durch MACS-Säulen zugeführt. Nach erfolgreicher Anreicherung stark transfizierter Zellen wurden hieraus Proteinextrakte hergestellt und verschiedenen Analysen zugeführt. Im speziellen wurden die Expressionsniveaus der drei wichtigen Zykline E, A und B bestimmt und zusätzlich mit Hilfe einer Immunpräzipitation (sog. IP) die mit diesen Zyklinen assoziierten Kinaseaktivitäten untersucht, um den Einfluss veränderter Zyklin-Expression näher deuten zu können. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den drei folgenden Teilkapiteln dargestellt.

3.5.1 Zyklin E – Expression und Kinaseaktivität

Das hier dargestellte Vorgehen gilt in gleicher Weise auch für die Zykline A und B, wie in den folgenden Teilkapiteln ersichtlich. Alle hier gezeigten Daten wurden in Wiederholungsexperimenten bestätigt. Es wurden nur die drei MCMV-*Immediate Early*-Proteine IE1–3 und M69 untersucht. Für die Analyse der Zyklin E-Expressionsniveaus wurden Zellextrakte verwendet, sie wurden im SDS-Gel aufgetrennt und über die in Tabelle 2.7 (Seite 36) genannten spezifischen Antikörper markiert. Nach beschriebem Vorgehen konnten diese nun markiert und aufgezeichnet werden, entsprechende Ausschnitte dieser Aufzeichnungen sind in den Abbildungen dieser Teilkapitel gezeigt.

Die Immunpräzipitation zur Bestimmung der mit den untersuchten Zyklinen assoziierten

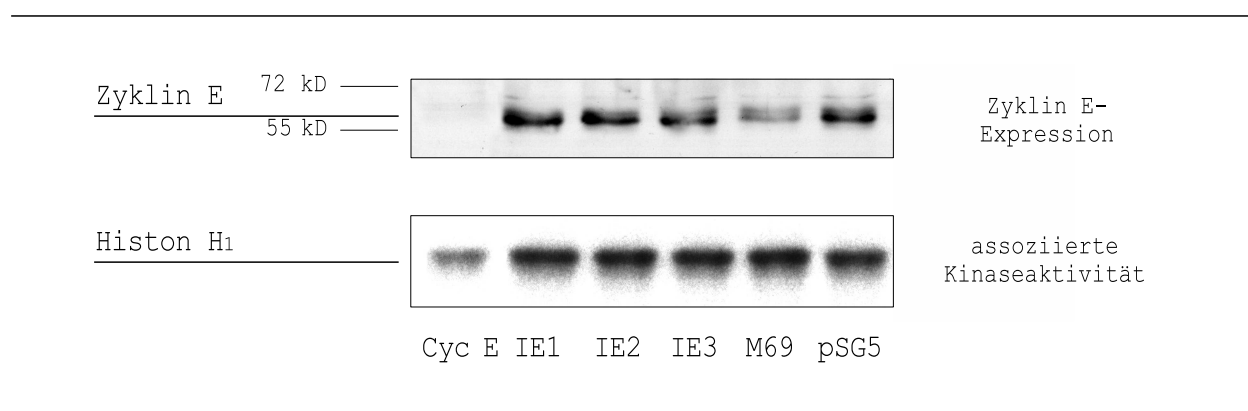


Abbildung 3.15: Ergebnisse der Western Blot-Analyse (oben) und des Kinase-Essays (unten) für Zyklin E und assoziierte Kinaseaktivität. pSG5 wird als Ausgangsniveau betrachtet. Erläuterung zu Proben und Kontrollen im Text.

Kinaseaktivitäten wurde aus den Extrakten wie beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden die gleichen Antikörper wie für die Bestimmung der Expressionsniveaus im Western Blot verwendet. Nach Präzipitation der Kinasekomplexe wurde deren Kinaseaktivität mit Histon H_1 als Substrat in einer halbstündigen Reaktion gemessen. Hierbei wurden die Histone phosphoryliert und durch Einsatz von γ - ^{32}P -ATP radioaktiv markiert. Nach Auftrennung im SDS-Gel konnte die radioaktive Strahlung autoradiographisch detektiert werden. Die entsprechenden Aufzeichnungen sind ebenfalls in den Abbildungen gezeigt.

Zusätzlich wurden immer verschiedene Kontrollextrakte parallel untersucht, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu gewährleisten. Für die untersuchten Zykline wurden so die drei Expressionsvektoren *Cyc E*, *Cyc A* und *Cyc B* (Tabelle 2.5, Seite 29) eingesetzt. Jedoch wird bei der Interpretation der Ergebnisse die Tatsache zu berücksichtigen sein, dass diese jeweils für das menschliche Zyklin kodieren. Für diese zwar stark konservierten Proteine standen keine Vektoren für die entsprechenden Maus-Zykline zur Verfügung.

Als Referenzwert (Leerkontrolle) wurde mit *pSG5-3HA*-Plasmid transfiziert, bei welchem keine Proteinexpression zu erwarten war. Darüber hinaus wurde in einem Ansatz $\text{IE2}_{\text{human}}$ exprimiert, für welches für verschiedene Zelllinien das Zyklin-System verändernde Effekte bereits beschrieben sind, im Einzelnen wird dies für das jeweilige Zyklin erläutert.

In Abbildung 3.15 sind die Ergebnisse für Zyklin E dargestellt. Verglichen mit der Leerkontrolle *pSG5-3HA* kann für die drei untersuchten *Immediate Early*-Proteine IE1–3 keine Veränderung der Zyklin-Expression oder der assoziierten Kinaseaktivität festgestellt werden. Für M69 fand sich ein erniedrigtes Expressionsniveau, die Kinaseaktivität blieb dem entgegen unverändert. Für die Transfektion mit menschlichem Zyklin E wurde in der Expression aber auch in der assoziierten Kinaseaktivität ein erniedrigtes Niveau gemessen. Dies ist durch die fehlende Affinität des eingesetzten Antikörpers gegen humanes Zyklin E verständlich. Es kann davon ausgegangen werden, dass durch starke Expression des menschlichen Zyklin E die endogene Zyklin E-Expression gegenläufig herunterreguliert wird. Dies könnte die geringe Expression und Zyklin-assoziierte Kinaseaktivität erklären.

3.5.2 Zyklin A – Expression und Kinaseaktivität

Bei Untersuchung der Zyklin A-Expression (Abbildung 3.16) konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben festgestellt werden. Lediglich für den Expressionsvektor für humanes Zyklin A fand sich eine zusätzliche Bande mit langsamerem Laufverhalten im

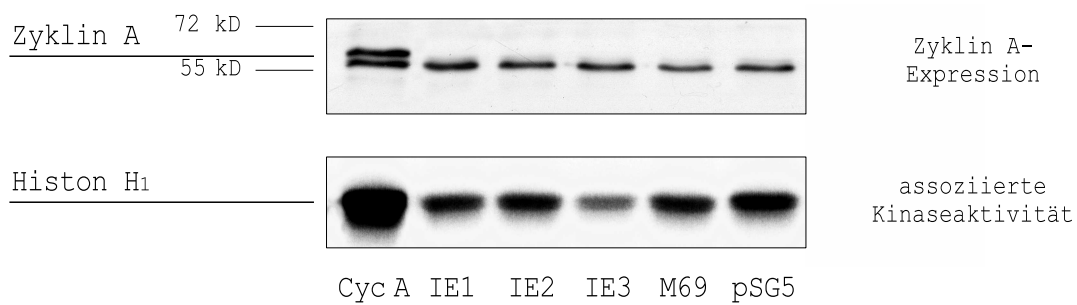


Abbildung 3.16: Ergebnisse der Analyse für Zyklin A-Expression (oben) und assoziierte Kinaseaktivität (unten). Vergleiche Abbildung 3.15.

SDS-Gel als die sonst detektierten Banden.

Für die Kinaseaktivitäten fanden sich für IE1, IE2 und M69 keine nachvollziehbare Veränderung gegenüber dem Leervektor (*pSG5-3HA*), jedoch eine signifikant geringere Aktivität für IE3. Die Kontrolle mit humanem Zyklin A zeigte eine deutlich erhöhte Kinaseaktivität.

3.5.3 Zyklin B – Expression und Kinaseaktivität

Abbildung 3.17 zeigt Expression und assoziierte Kinaseaktivitäten für Zyklin B. Für die untersuchten Proben IE1–3 und M69 konnte kein Unterschied zu *pSG5-3HA* auf Expressionsebene gefunden werden. Für die mit Zyklin B assoziierte Kinaseaktivität zeigte M69 eine leichte Erniedrigung. Die Transfektion mit dem Expressionsvektor für humanes Zyklin B zeigte eine deutlich erhöhte Expression, die Kinaseaktivität war nicht wesentlich verändert. Möglicherweise ist hier Cdk1 limitierender Faktor und entsprechend eine über den Leerwert erhöhte Zyklin B assoziierte Kinaseaktivität nicht zu erwarten. Insgesamt wird die Zyklin B-assozierte Kinaseaktivität durch eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen stabilisiert, und nur am G₂-M-Phase-Übergang kurzfristig aktiviert.

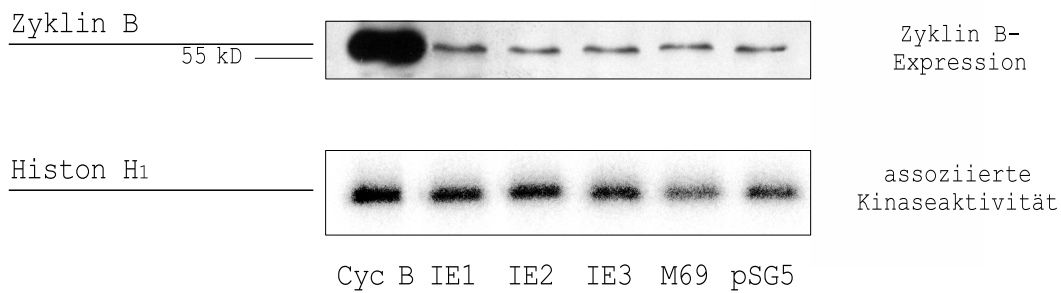


Abbildung 3.17: Ergebnisse der Analyse für Zyklin B-Expression (oben) und assoziierte Kinaseaktivität (unten). Vergleiche Abbildung 3.15.

3.6 RNAi als Werkzeug für zukünftige Analysen

Um für eine spätere – die Expression einzelner Proteine selektiv supprimierende – Knock-Down-Analyse entsprechende shRNA-Fragmente (engl. *small hairpin RNA*) zu identifizieren, wurden die vorhandenen 3HA-markierten Expressionsplasmide als Hilfsmittel verwendet. Für die drei *Immediate Early*-Proteine IE1, IE2 und IE3 wurden unter Mithilfe von Dr. Matthias Truss (Charité, Berlin) jeweils drei 21-Nukleotid-Sequenzen gewählt und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das Expressionsniveau der jeweiligen Proteine zu supprimieren. Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden wie in Kapitel 2.4 beschrieben hergestellt.

Um festzustellen, welche der zur Verfügung stehenden shRNA-Konstrukte die Protein-

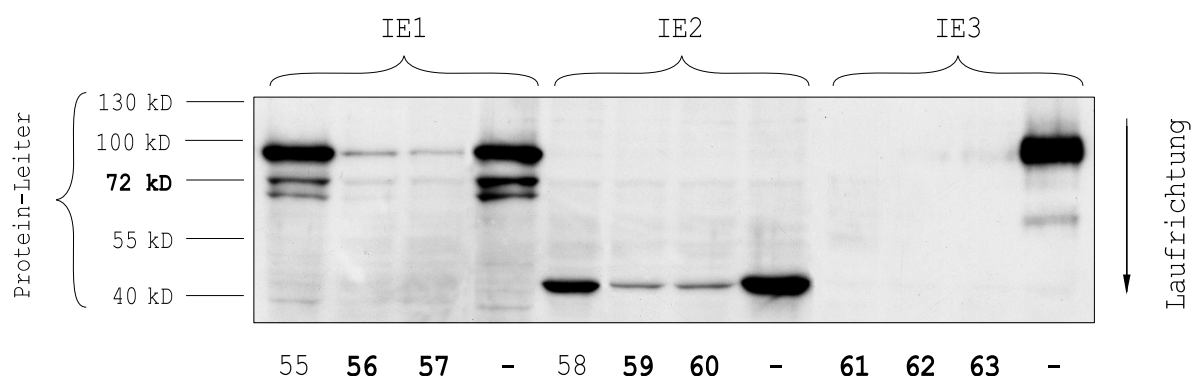


Abbildung 3.18: Kotransfektion zur Ermittlung der Tauglichkeit der verwendeten shRNA-Expressionsplasmide. Gruppen von vier Banden zeigen jeweils ein IE-Protein, Kontrollbanden mit Leervektor kombiniert. Proben: starke Schrift – gewünschter Knock-Down, normale Schrift – kein Effekt. 12%-SDS-Gel.

expression der Zielgene supprimiert, wurde eine transiente Transfektion in NIH-3T3-Zellen durchgeführt. Neben den shRNA-kodierenden Expressionsplasmiden (80% der eingesetzten DNA-Menge) wurden die entsprechenden Expressionsvektoren für 3HA-IE1, 3HA-IE2 und 3HA-IE3 kotransfiziert. Deren Expressionsniveau konnte über HA-Antikörper bestimmt werden. Abbildung 3.18 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Die Extrakte aus diesen Transfektionen (24 h nach Transfektionsende geerntet) sind in Vierer-Blöcken aufgetragen. Als Kontrolle wurde anstatt der shRNA-Expressionsplasmide der *pSG5-3HA*-Leervektor kotransfiziert. Diese Kontrollen zeigen das Expressionsniveau der *Immediate Early*-Proteine. Für die shRNAs 56 und 57 für IE1, 59 und 60 für IE2 sowie 61–63 für IE3 konnte das Expressionsniveau der kotransfizierten IE-Gene deutlich verringert werden, zwei shRNAs (55 und 58) bewirkten keinen Knock-Down.

Mit diesem Werkzeug wird es in Zukunft möglich sein, im Kontext der viralen Infektion mit MCMV die Expression der drei *Immediate Early*-Proteine IE1, IE2 und IE3 zu supprimieren, und so weitere Kenntnisse über die Funktion und Relevanz dieser Faktoren zu sammeln. Die vektorinterne Kopplung an ein Protein zur Vermittlung einer Resistenz gegen das Zellgift Puromycin erlaubt ebenfalls die Etablierung eines Systems mit stabiler Transfektion.

3.7 Deletionsanalyse von IE3

Für den im Sinne der Zellzyklusveränderung potentesten Faktor IE3 wurde eine Struktur-funktionsanalyse durchgeführt um die für den G₁-Arrest notwendigen Bereiche des Proteins zu bestimmen. Es wurden vier Deletionskonstrukte verwendet (Tabelle 2.5 auf Seite 29), in diesen ist die IE3-cDNA mit der cDNA für GFP (engl. *green fluorescent protein*) im Leseraster fusioniert (N-terminal GFP, C-terminal IE3). Als Positivkontrolle diente das parentale Wildtyp-IE3-GFP-Plasmid, als Negativkontrolle der entsprechende GFP-Vektor ohne IE3-cDNA.

Es wurden zunächst im Immuno-Blot die Expressionsniveaus der einzelnen IE3-Mutanten gegen den Wildtyp dargestellt. Die Zellzyklus-Verteilung der transfizierten Zellen in Gegenwart von Nocodazol wurde wie zuvor durchflusszytometrisch gemessen. Die Kopplung von IE3 an GFP machte die Kotransfektion eines Oberflächenmarkers verzichtbar und erlaubte eine direkte Darstellung der subzellulären Protein-Lokalisation im Fluoreszenzmikroskop.

Abbildung 3.19 zeigt eine HA-Immunoblotanalyse der Expression der IE3-Mutanten in 3T3-Zellen. Wie erwartet zeigte sich in Vergleich zu Wildtyp-IE3 für alle vier Mutanten eine höhere Mobilität im SDS-Page. Die Laufhöhe stimmte mit den nach theoretisch bekannter Größe erwarteten Proteingewichten überein. Es konnte von einer adäquaten Funktion der Plasmid-Konstrukte ausgegangen werden, wobei Expressionsniveaus für die verschiedenen Konstrukte unterschiedlich waren. Für die Mutanten $\Delta 37-99$ und $\Delta 360-611$ wurde eine geringere Expression beobachtet.

Abbildung 3.20 zeigt für die vier Mutanten entsprechende subzelluläre Lokalisation ei-

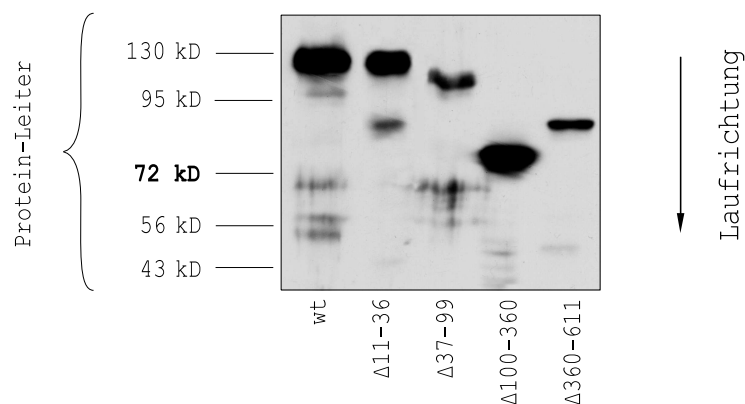


Abbildung 3.19: HA-Immunoblot. Höhere Mobilität für alle vier untersuchten Mutanten, ganz links zum Vergleich das Laufverhalten des Wildtyp-IE3 (wt). 8%-SDS-Gel.

niger beispielhaft gewählter Zellen nach Transfektion und Expression, kurz vor Ernte zur im vorigen Absatz beschriebenen Zellzyklusanalyse. Hierbei zeigen die Mutanten $\Delta 11-36$ und $\Delta 37-99$ ein ähnliches Muster mit auf relativ wenige Bereiche konzentrierter Expression. Die in der Zellzyklusanalyse (Abbildung 3.21) aufgefallene Mutante $\Delta 100-360$ zeigte eine feinere, dennoch in einzelnen Bereichen fokal konzentrierte Expression, wohin gegen die Expression der $\Delta 360-611$ -Mutante gleichmässig über den gesamten transfizierten Zellkern verteilt ist. Dies entsprach trotz des großen deletierten Bereichs am ehesten der Verteilung von Wildtyp-IE3.

Da sich das für die Mutante $\Delta 100-360$ gefundene Verteilungsmuster auch bei anderen, die Zellzyklusprogression nicht beeinflussenden Mutanten in ähnlicher Weise zeigte, lässt sich offenbar über die hier beschriebenen Muster kein Rückschluss auf die den Zellzyklus beeinflussende Aktivität ziehen.

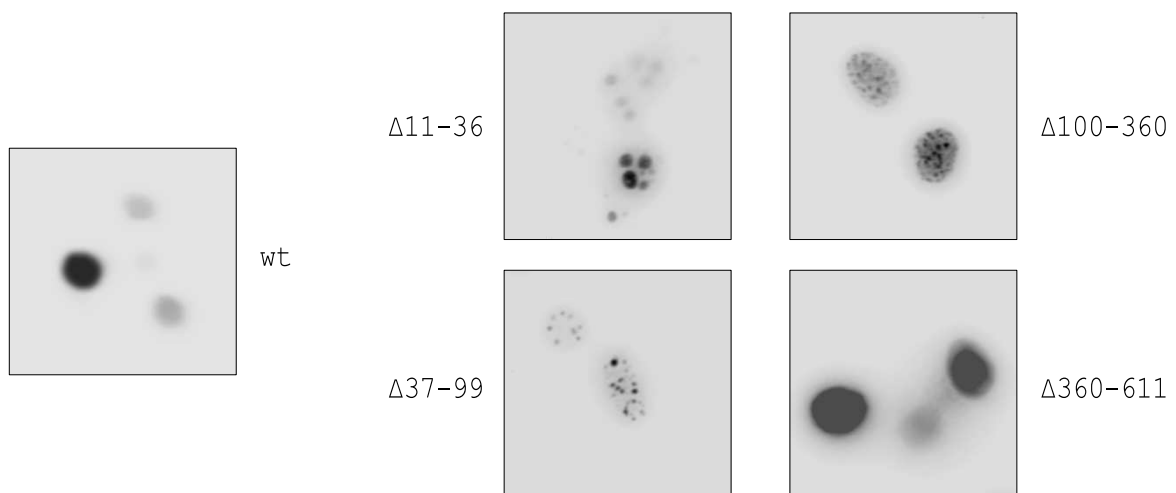


Abbildung 3.20:
Aufnahme der IE3-GFP-Fluoreszenz mit einem Zeiss Axiovert S100 Mikroskop.

Abbildung 3.21 zeigt die Verteilung der Zellen über den Zellzyklus, wobei Zellen mit einfachem DNA-Gehalt (G_0 und G_1) mit einem hellen Balken, Zellen mit teilweise oder vollständig verdoppeltem Chromosomensatz (S, G_2 und M) mit einem dunklen Balken dargestellt sind.

Zellen, die mit dem *GFP*-Plasmid transfiziert wurden, akkumulieren auf Grund der Nocodazol-Wirkung zu einem großen Anteil vor Abschluss des Zellzyklus mit doppeltem DNA-Gehalt (76%), hingegen werden – wie bereits in den ersten Experimenten in Kapitel 3.4.2 gezeigt – Zellen unter Einfluss des IE3-Proteins vor dem Übergang in die S-Phase arre-

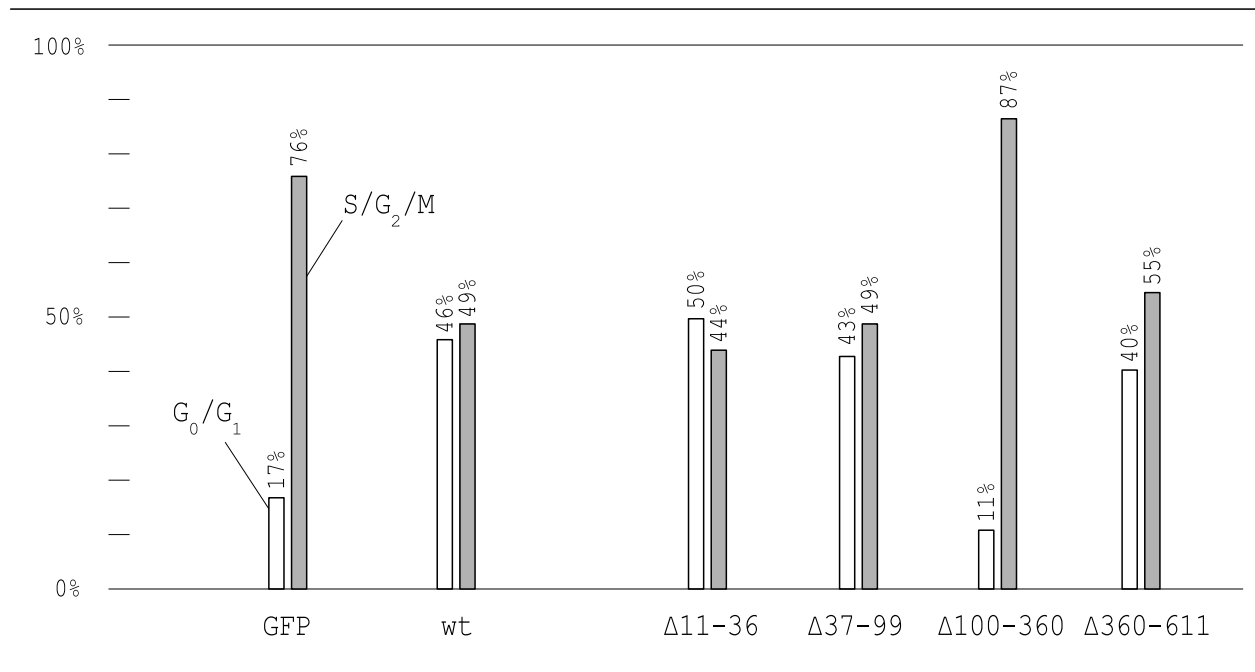


Abbildung 3.21: Relative Verteilungen der transfizierten Zellen, Ernte nach Nocodazol-Exposition. Der helle Balken repräsentiert Zellen mit einfachem, der dunkle Zellen mit teilweise oder vollständig verdoppeltem DNA-Gehalt. Daten aus Zellzyklusanalyse in der Durchflusszytometrie.

tiert (nur 49%). Im Vergleich zu diesen beiden Ausgangsverteilungen verhielten sich die drei Mutanten $\Delta 11-36$, $\Delta 37-99$ und $\Delta 360-611$ ähnlich der Verteilung des Wildtyp-IE3, lediglich die Mutante $\Delta 100-360$ zeigte keinen G_1 -Arrest mehr sondern verhielt sich ähnlich wie die GFP-Negativkontrolle. Diese Mutante zeigte sogar eine erhöhte Population mit doppeltem Chromosomensatz, möglicherweise ein Hinweis auf die Multifunktionalität des IE3-Proteins mit die Zyklusprogression fördernden neben hemmenden bzw. arretierenden Bereichen.

Kapitel 4

Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, anknüpfend an eine Vorarbeit [88], wo erstmals direkt die Einflüsse von Maus-Zytomegalieviren auf den Zellzyklus der Wirtszelle beschrieben worden sind, die hierbei beobachteten Effekte auf die Wirkung einzelner Proteine dieses Virus zurückführen zu können, um letztendlich eine Aussage darüber treffen zu können, in wie weit MCMV als Tiermodell auch auf molekularer Ebene vergleichbar zu HCMV eingesetzt werden kann.

Erstmals wurde in dieser Arbeit die den Zellzyklus arretierende Wirkung des IE3-Proteins von MCMV beschrieben. Ähnlich wie für das homologe HCMV IE2-Protein ist IE3 in der Lage die Zellzyklusprogression der Wirtszelle vor Erreichen der S-Phase zu arretieren. Dieser Effekt ist konsistent mit dem bei MCMV-Infektion beobachteten Arrest [88]. So ergibt sich ein Hinweis, dass IE3 ein wichtiger Regulator von MCMV ist, um den physiologischen Zyklusverlauf zu verändern und möglicherweise für eine optimale Virus-Replikation anzupassen.

Bei Analyse der Zyklinkinaseaktivitäten in IE3-transfizierten Zellen zeigte sich, ähnlich wie es für IE2_{human} beschrieben ist [102], ein vermindertes Niveau Zyklin A-assoziiierter Aktivität bei gleich hoher Proteinexpression, möglicherweise auf Grund posttranslationaler Modifikation. Dies wurde als Ursache für den beobachteten G₁-Arrest diskutiert. Nach Infektion mit MCMV fand sich jedoch eine erhöhte Aktivität bei erhaltener Arrest-Funktion [88].

Das M69-Protein scheint an der Modulation des Zellzyklus ebenfalls beteiligt zu sein, es wurde verminderte Zyklin B-assoziierte Aktivität und eine verminderte Zyklin E-Expression durch M69 aufgezeichnet.

Zu IE3 war es möglich eine Mutante zu finden, welche die G₁-arretierende Wirkung verloren hatte (engl. *loss of function*). Diese kann als Werkzeug für die Analyse in vivo

verwendet werden, um die Wichtigkeit des IE3-Proteins für den Ablauf der Infektion näher zu charakterisieren.

Für die mit den Zyklinen E und B assoziierte Aktivität fand sich keine Veränderung durch IE3.

Im Folgenden werden die gemachten Beobachtungen zusammengefasst und in ihrer Bedeutung in den Kontext der bisherigen Kenntnisse über die Zellzyklusveränderungen durch humane und murine Zytomegalieviren sowie durch einzelne HCMV-Proteine gesetzt.

4.1 IE3 und M69 bewirken Zellzyklusarrest

Initiale Untersuchungen beschreiben wie HCMV in der Lage ist, quieszente Zellen (G_0) zum Eintritt in den Zellzyklus zu stimulieren, die Zellen dann jedoch mit einem G_1 -DNA-Gehalt zu arretieren [57, 62–64]. Diese Untersuchungen wurden in primären humanen Lungenfibroblasten durchgeführt, welche für eine Infektion mit HCMV permissiv sind. Darauf hin wurde die Suche nach viralen Faktoren begonnen, welche für den Zellzyklusarrest verantwortlich sind. Die beiden Proteine IE2 und UL69 wurden in dieser Funktion kontrovers diskutiert. Die Erkenntnisse über IE2 stützen sich auf Untersuchungen in der transformierten U373-Zelllinie und primären Zellen [140]. Zusätzlich konnte dieser Effekt auch in einer Reihe anderer Zellen mit sehr unterschiedlichen Mutationen bestätigt werden, sogar in Zellen nicht-menschlicher Herkunft. In Übereinstimmung damit sind auch die Schwierigkeiten zu sehen, IE2 in einer Zelllinie konstitutiv zu exprimieren, so um z. B. IE2-deletierte Viren zu propagieren [18, 141]. Offenbar ist der Einfluss auf den Zellzyklus zu gravierend.

In einer Vorarbeit [88] wurden mögliche Zellzyklusveränderungen für Maus-Zytomegalieviren untersucht. Hierbei wurde der für HCMV bekannte Arrest wiedergefunden, darüber hinaus eine Blockade der Zyklusprogression in G_2 .

Um diese Beobachtungen nun wiederum in den Kontext der sie bewirkenden Faktoren stellen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene MCMV-Proteine untersucht. Die initiale Homologie-Suche zeigte sechs verschiedene Faktoren auf, die als potenzielle Akteure für die von MCMV bewirkten Zellzyklusveränderungen analysiert werden sollten. Für die Proteine IE3 und in eingeschränktem Maß M69 konnte erstmals ein solches Potenzial gezeigt werden. Das dem IE2 (HCMV) homologe IE3 bewirkte nach Transfektion in eine Reihe verschiedener Zelllinien (NIH-3T3, U2OS, HeLa und U373) eine Akkumulation

von Zellen mit einfachem DNA-Gehalt (G_0 , G_1 oder frühe S-Phase). Dies entsprach den gemachten Beobachtungen für die Infektion mit MCMV [88], aber auch dem von HCMV oder IE2_{human} bewirkten Arrest. Der Effekt wurde durch Einsatz des Mitose-Hemmers Nocodazol noch deutlicher, es konnte hiermit gezeigt werden, dass es sich um einen echten Arrest und nicht lediglich um eine Verzögerung handelt. Aus den vorliegenden Daten ist der genaue Zeitpunkt am G_1 -S-Phase-Übergang des Arrestes nicht zu bestimmen.

IE3 ist darüber hinaus in der Lage, seine Wirkung in humanen Zelllinien zu entfalten, jedoch nicht in dem bei IE2_{human} beobachteten Maß, umgekehrt bewirkte IE2_{human} auch einen Arrest in NIH-3T3-Zellen. Diese Funktion von IE3 scheint — wie für IE2_{human} bereits beschrieben [102, 104] — eine vom Zelltyp weitgehend unabhängige zu sein, da auch bei Zellen mit unterschiedlichen Mutationen (siehe Tabelle 2.6, Seite 30) und unterschiedlicher Spezies ein ähnliches Veränderungsmuster bestehen bleibt.

In der Mutationsanalyse des IE3-Proteins konnte für die Mutante $\Delta 100-360$ der Verlust der zyklusarretierenden Wirkung nachgewiesen werden. Dementgegen wird aus dem Sequenzvergleich (Abbildung 3.3 auf Seite 47) diese Funktion am C-Terminus des Proteins angenommen [104]. Für die IE3-Mutante mit Verlust dieses Bereichs ($\Delta 360-611$) war ein Zyklusarrest zu beobachten, in der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich ein dem Wildtyp (wt) ähnliches Verteilungsmuster der Protein-Expression.

Für das Tegument-Protein M69, welches Homologie zu pUL69 (HCMV) zeigt, konnte unter Nocodazol-Arrest ebenfalls eine Akkumulation von Zellen mit einfachem DNA-Gehalt aufgezeichnet werden, jedoch deutlich weniger ausgeprägt als für IE3. Hiermit zeigt sich für M69 eine den Wirtszellzyklus beeinflussende Funktion. Das deutet darauf hin, dass die für pUL69 beobachteten Fähigkeit Zellen in G_1 zu arretieren, bei M69 konserviert ist [72, 73].

Dort verlief die Infektion mit pUL69-deletiertem HCMV deutlich abgeschwächt, konnte aber nach Einführung eines das entsprechende Gen tragenden Expressionsvektors wieder rekonstituiert werden [73]. Für M69 konnte eine Arrest-Funktion jedoch nur für Maus-Zellen (NIH-3T3) gezeigt werden, nicht in den sonst untersuchten menschlichen Zelllinien. Möglicherweise ist M69 in der Lage den Zellzyklus an mehreren Stellen des Zellzyklus zu arretieren, da eine Veränderung des DNA-Profiles nur unter Einfluss von Nocodazol gemessen werden konnte.

Insgesamt betrachtet scheinen die beiden Proteine IE3 und M69 für MCMV eine ähnliche Funktion wie es für die Homologen des HCMV beschrieben ist zu übernehmen. Der durch

sie bewirkte Arrest ist möglicherweise die Grundlage der bei MCMV-Infektion beobachteten Zellzyklusveränderung. Um diese Zusammenhänge weiter zu ergründen, wären Knock-Down-Experimente oder der Einsatz der beschriebenen Loss-of-function-Mutante hilfreich. Es ist sicher sinnvoll diesen Bereich noch feiner zu mutieren, um so die Gefahr zu minimieren, andere Funktionen des Proteins mit zu deletieren.

Tabelle 4.1 fasst nun bisher bekannte und neu gewonnene Erkenntnisse zusammen.

HCMV	Virus Arrest in G_1 vor Erreichen der S-Phase (in PLF) [62–64] Stimulation aus G_0 [63]	IE2 und pUL69 Arrest am G_1 -S-Übergang (in U373 u. a.) [19, 102]
MCMV	Virus G_1 -Arrest (Rat-1 und NIH-3T3) [88] Arrest in G_2 [88]	IE3 und M69 Arrest vor Erreichen der S-Phase (in 3T3 u. a.) Abb. 3.10, 3.11 und 3.13

Tabelle 4.1: Veränderungen des Zellzyklusverlaufs durch humane und murine Zytomegalieviren und durch das wichtige *Immediate Early*-Protein IE2 bzw. IE3. Direkte Verweise auf das Literaturverzeichnis.

4.2 Mechanismen des Zellzyklusarrestes

HCMV ist in der Lage in das System der Zyklin-abhängigen Kinasen und verschiedener damit assoziierter Regulationsproteine einzugreifen. So wird nach Infektion eine erhöhte Zyklin E-Expression und entsprechend eine erhöhte damit assoziierte Kinaseaktivität gefunden [61, 85]. Für die Zykline A und B findet sich ein Abfall bzw. keine Veränderung, im späteren Verlauf der Infektion auch ein Anstieg. Es wird der Zyklin E-Dysregulation und der auch beobachteten Akkumulation von hyperphosphoryliertem pRb eine zentrale Rolle zugeschrieben. Es wird vermutet, dass die erniedrigte Zyklin A-assozierte Aktivität für den beobachteten Arrest ursächlich ist.

Ein ganz ähnliches Muster zeigte sich bei der Analyse der $IE2_{\text{human}}$ -Funktion [19, 102, 142], im Besonderen war das Protein alleine in der Lage ebenfalls erhöhte Zyklin E-Expression zu induzieren und damit auch eine erhöhte Kinaseaktivität zu bewirken. Mit den Zyklinen A und B assoziierte Kinasen wurde dort in nahezu unveränderter Aktivität gefunden, obgleich deren Expression wenig verändert war. Die Zyklin E-Hochregulation wird bei HCMV maßgeblich

HCMV	ganzes Virus	IE2
	Zyklin E: \uparrow (\uparrow) [61, 63, 85]	Zyklin E: \uparrow (\uparrow) [20, 102, 142]
	Zyklin A: \searrow ($-$) spät \nearrow (\nearrow) [61, 85]	Zyklin A: $-$ (\searrow) [102]
	Zyklin B: spät \nearrow (\nearrow) [61, 85]	Zyklin B: $-$ (\searrow) [102]
MCMV	ganzes Virus	IE3 und M69
	Zyklin E: \downarrow (\nearrow) [88]	Zyklin E: $-$ (\downarrow durch M69) Abb. 3.15
	Zyklin A: \uparrow (\nearrow) [88]	Zyklin A: \downarrow durch IE3 ($-$) Abb. 3.16
	Zyklin B: \uparrow (\nearrow) [88]	Zyklin B: \downarrow durch M69 ($-$) Abb. 3.17

Tabelle 4.2: Veränderungen des Zyklin-Zyklinkinase-Systems durch humane und murine Zytomegalieviren und durch *Immediate Early*-Protein IE2 und IE3. Pfeile indizieren beobachtete Kinase-Aktivität, in der Klammer Zyklin-Expression. Direkte Verweise auf das Literaturverzeichnis.

durch IE2_{human} über die transkriptionelle Aktivierung von Zyklin E bewirkt [81, 84, 142]. Für den IE2-induzierten G₁-Arrest ist bisher kein Wirkmechanismus beschrieben worden.

Für Maus-CMV wurden teilweise andere Veränderungen im Kinase-System beobachtet [88]. Während dort für MCMV die Zyklin E-assoziierten Kinasen weniger aktiv waren als ohne Infektion, fand sich trotzdem eine erhöhte Zyklin E-Expression. Entgegen den Beobachtungen an HCMV und IE2_{human} waren Expression und Kinaseaktivität für Zyklin A und B erhöht. Offenbar greift MCMV ebenfalls in den Ablauf des Wirtszellzyklus ein, die einzelnen Mechanismen scheinen jedoch andere zu sein.

Für IE3 konnte eine erniedrigte Zyklin A-Kinaseaktivität, jedoch ohne veränderte Expression von Zyklin A detektiert werden. Hier liegt offenbar nicht die Ursache des bei MCMV-Infektion beobachteten Effekts, verhält sich dieses Protein doch eher wie IE2_{human} oder der bei HCMV-Infektion beobachteten Zyklin A-Erniedrigung. Expressionshöhe und assoziierte Kinaseaktivität der anderen Zykline wurden durch IE3 nicht nennenswert beeinflusst. Die Beobachtung, dass IE3 nur einen geringer ausgeprägten Arrest als IE2_{human} bewirken kann, legt die Vermutung nahe, dass die Zellzyklus arretierende Funktion von IE3 schwächer ist.

Auch M69 bewirkt Veränderungen im Kinase-System. Es findet sich eine erniedrigte Zyklin E-Expression. Darüber hinaus erniedrigt M69 die mit Zyklin B assoziierte Kinaseaktivität. Es zeigt sich, dass Veränderungen der Zyklin-Expression bzw. der damit verbundenen Kinaseaktivitäten eine Spezies-übergreifende Methode von DNA-Viren allgemein, von Herpes- bzw. Zytomegalieviren im Speziellen sind, die entsprechenden Akteure scheinen jedoch wenig konserviert.

4.3 Die Bedeutung für den Infektions-Zyklus

Bereits frühere Untersuchungen erkannten den interessanten Einfluss, den HCMV auf den Zellzyklus der Wirtszelle hat [102]. Auf der einen Seite ist das Virus in der Lage quieszente Zellen prozyklierend zu stimulieren, jedoch auf der anderen Seite die zelluläre DNA-Synthese zu blockieren [20]. Dieses Milieu scheint besonders geeignet für die virale DNA-Replikation zu sein, da zelluläre Replikationsfaktoren von der Zelle bereitgestellt werden, und unter der Infektion selektiv für die virale DNA-Synthese zur Verfügung stehen. Das von HCMV bekannte IE2 übernimmt offenbar einige dieser gegenläufigen Funktionen, und wurde so als essenzieller Faktor durch Zellzyklus-Modulation für eine effektive Infektion charakterisiert. Auch für MCMV wurden Hinweise für eine derartig ausgefeilte Regulation beschrieben, so z. B. die Induktion wichtiger Proteine für die DNA-Synthese durch das Virus [32].

Es konnte gezeigt werden, dass einige dieser Funktionen bei HCMV gleichzeitig durch das multifunktionelle IE2-Protein vermittelt werden [19, 20]. Es wurde damit erstmals ein Protein mit der Kombination der beschriebenen Funktionen charakterisiert. In dieser Arbeit konnte für das homologe IE3 diese wichtige Bedeutung teilweise bestätigt werden, jedoch scheint dessen Einfluss auf den Zellzyklus weniger ausgeprägt zu sein. Es ist aber alleine in der Lage der Infektion ähnliche Veränderungen zu bewirken. Es wurde gezeigt, dass es sich bei IE3 auch um ein essenziell bedeutsames Protein für den Infektions-Zyklus handelt. Die Replikationsfähigkeit von MCMV zeigt, dass es für eine produktive Replikation keines derart speziellen zyklusgebundenen Milieus bedarf. Demnach kann es möglich sein, dass Proteine ähnlicher Funktion entsprechend geringer ausgeprägtes Einflusspotenzial mitbringen.

4.4 Ein Tiermodell für die CMV-Infektion

Eine wichtige auch dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung ist, ob sich MCMV und die durch dieses Virus hervorgerufenen Erkrankungen [21, 22] als Modell für das Verständnis der Pathogenese und möglicher Therapiestrategien eignet. Nachdem für einige Erkrankungen aus klinischer Sicht äquivalente Abläufe bei MCMV beschrieben worden sind, so scheint es mit weiterem Vordringen in detailliertere Betrachtungen immer unsicherer, ob überhaupt ein Vergleich nachvollziehbar durchgeführt werden kann. Auf Ebene allgemeiner morphologischer Zellpathologie zeigen Zytomegalieviren verschiedener Spezies noch ein recht einheitliches Bild, schärfen sich die Unterschiede doch bei Betrachtung der Zellzyklusveränderungen. Es

fanden sich z. B. für Nager-CMV deutliche Hinweise auf einen G_2 -Arrest [88], welcher für HCMV nicht beobachtet werden konnte. Dringt man nun, wie es auch Ziel dieser Arbeit war, auf die Ebene einzelner viraler Faktoren, so finden sich zwar allgemein ähnliche Ansätze, wie z. B. die Einflussnahme über das Zyklinkinase-System und assoziierte regulatorische Proteine, welche in der langen Evolution der Zytomegalieviren parallel zur Differenzierung der einzelnen Wirts-spezies als Prinzip konserviert wiederkehren, die zugrunde liegenden Mechanismen scheinen sich jedoch sehr unterschiedlich entwickelt zu haben.

So stellt sich die Frage nach der Vergleichbarkeit, wenn es z. B. um die Erprobung von spezifisch gegen essenzielle virale Faktoren gerichtete Therapieansätze geht, wie etwa beim Einsatz der sog. Antisense-Oligonukleotide wie Fomivirsen [17]. Ob dann das Tiermodell als guter Prädiktor für den später im klinischen Einsatz zu erwartenden Ausgang der experimentellen Therapie fungieren kann, ist weiterhin unsicher. Dazu kommt, dass es bisher sowohl für HCMV als auch für CMV anderer Spezies kein Modell gibt, in welchem die einzelnen Faktoren und deren Funktionen z. B. auch in Hinsicht auf Zellzyklusveränderungen in ihrer Bedeutung für die Pathogenese der Erkrankung und der jeweiligen Organschädigung in vivo untersucht werden konnten. Für ein bei dieser Fragestellung sicher hilfreiches Tiermodell ist MCMV den oben genannten Gründen nach nur bedingt geeignet.

4.5 Ausblick

Von den sechs MCMV-Proteinen welche in dieser Arbeit untersucht worden sind, konnte für IE3 und M69 ein eindeutiger Einfluss auf den Zellzyklus der Wirtszelle festgestellt werden. Für die nach den verwendeten Methoden nicht-funktionell erscheinenden Proteine IE1 und IE2 sowie M82 und M83 konnte keinerlei Einfluss aufgezeichnet werden, wobei für die letztgenannten Tegument-Proteine bereits bekannt war, dass diese zumindest nicht essenziell für die virale Replikation sind [143]. Für HCMV sind bereits vier Faktoren (IE2, IE1, pUL69 und pp71) identifiziert, die in den Zyklusablauf der Wirtszelle eingreifen können, so stellt sich die Frage, ob es noch weitere hier nicht identifizierte Proteine bei MCMV gibt, die die bei MCMV-Infektion beobachteten Veränderungen [88] bewirken. Dazu kommt, dass das zu IE2_{human} homologe IE3 offenbar auf andere Weise in den Zellzyklus eingreift, was ebenfalls die Fragen nach weiteren Akteuren offen hält. Die Replikationsfähigkeit von MCMV in der S-Phase bzw. in G_2 [88] gibt einen Hinweis darauf, dass es nicht so stark auf ein besonders

austarriertes Milieu angewiesen ist.

Die Untersuchung der Einflüsse auf das Zyklin-Zyklinkinase-System zeigte, dass es sich hierbei um eine gemeinsame Strategie von Zytomegalieviren handelt, in den Zellzyklus einzugreifen. Der Vergleich zwischen CMV-Spezies und zwischen homologen Proteinen verschiedener CMV machte deutlich, dass sich sehr unterschiedliche, zum Teil gegenläufige Effekte etabliert haben, auch konnte für den bei MCMV beobachteten Arrest kein molekularer Mechanismus gefunden werden.

Da MCMV offenbar in anderer Weise auf einen Arrest angewiesen ist, und hierfür auch unterschiedliche Mechanismen vermutet werden müssen, ist der Einsatz der gewonnenen Erkenntnisse beim Vergleich mit HCMV z. B. für das Tiermodell durchaus fraglich. Für das Verständnis des viralen Replikationszyklus kann natürlich gerade diese Unterschiedlichkeit dabei helfen zu verstehen, warum für HCMV die spezifische Zyklusblockade derart wichtig ist, und welche sonstigen Unterschiede zu MCMV hierbei eine Rolle spielen.

Allgemein bietet die Kenntnis der sich sehr schnell und komplex entwickelnden viralen Proteine, besonders wenn ihre Einflussnahme auf die Wirtszelle genauer charakterisiert werden kann, die Möglichkeit diese als Werkzeuge für das weitere Verständnis der beeinflussten Systeme zu verwenden [144]. Der direkte Vergleich zweier homologer aber dennoch recht unterschiedlicher Proteine — wie z. B. IE2_{human} und IE3 — kann tiefere Einsichten in den Zusammenhang zwischen Struktur und den entsprechenden Wirkungsweisen gewähren.

Auch für das Verständnis der Virus-Wirts-Beziehung in Hinblick auf die Anpassungen des Virus an die Veränderungen des Wirtsorganismus über die Evolution hilft der direkte Vergleich zwischen strukturhomologen viralen Proteinen, welche jedoch nur bedingte Funktionshomologie teilen. Für Zytomegalieviren scheint es einen starken Antrieb für die Entwicklung von Mechanismen zur Zellzyklusveränderung zu geben, so erklärt sich, dass offenbar unterschiedliche Mechanismen unabhängig voneinander entstanden sind.

Die Fragestellung dieser Arbeit nach der Identifikation möglicher Akteure für die bei verschiedenen Nager-Zytomegalieviren beobachteten Zellzyklusveränderungen konnte mit den Proteinen IE3 und M69 (MCMV) beantwortet werden. Beide zeigten einen Einfluss nach Transfektion entsprechender Expressionsplasmide. Sie bewirkten eine Veränderung im Zyklinkinase-System der Wirtszelle. Im direkten Vergleich mit HCMV finden sich für beide Proteine Strukturhomologe für die bereits ähnliche Zyklusveränderungen, jedoch ein anderes Verhalten in Bezug auf das Zyklinkinase-System bekannt waren.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Für Infektionen mit Zytomegalieviren (CMV) gibt es derzeit keine gut verträgliche effektive Therapie. Insbesondere reaktivierte Infektionen unter Immunsuppression in der Onkologie und nach Organtransplantationen können neben den Infektionen in utero schwer zu beherrschende Krankheiten darstellen.

Das Zytomegalievirus ist in der Lage den Zellzyklus der infizierten Zelle zu arretieren, wodurch ein für die Replikation optimales Milieu zelleigener Proteine und Substrate garantiert wird. Diese Funktion wird durch das früh im Infektionszyklus exprimierte Protein IE2 vermittelt. Ohne IE2 ist eine Virusvermehrung nicht möglich, daher rückt es als Angriffspunkt für neue Medikamente in den Mittelpunkt.

Das humanpathogene Zytomegalievirus (HCMV) ist streng speziesspezifisch. Daher muss auf verwandte Zytomegalieviren, zum Beispiel der Maus (MCMV), für Tiermodelle zurückgegriffen werden. Auch MCMV ist in der Lage in den Zellzyklus arretierend einzugreifen, bisher ist jedoch noch kein MCMV-Protein mit dieser Funktion beschrieben. Um Ergebnisse aus dem Tiermodell auf die Infektion beim Menschen übertragen zu können sind Kenntnisse über Gemeinsamkeiten und Unterschiede von großer Bedeutung.

Es war Ziel der vorliegenden Arbeit ein Protein zu identifizieren, welches in den Zellzyklus der infizierten Zelle arretierend eingreifen kann. Darüber hinaus sollte untersucht werden, wie dieser Arrest auf molekularer Ebene vermittelt wird.

Es wurden sechs verschiedene MCMV-Gene zur Analyse ausgewählt. Die Entscheidung basierte auf Sequenzhomologien zu HCMV-Genen, für welche bereits Zellzyklus-Aktivität bekannt ist. Es wurden die drei *Tegumentproteine* M82, M83 und M69 sowie die drei *Immediate Early* Proteine IE1, IE2 und IE3 ausgewählt. Die Gene wurden in eukaryontische

Expressionsplasmide kloniert und die Proteine in der Zellkultur exprimiert. Es zeigte sich in der Durchflusszytometrie für das IE3-Protein eine deutliche Veränderung des DNA-Profiles. Dieses Protein hat starke Sequenzhomologie zu dem oben genannten HCMV-Protein IE2. Die transfizierten Zellen akkumulierten in der G0/G1-Phase. Auch bei der Untersuchung verschiedener Zelllinien blieb diese DNA-Verteilung bestehen.

Die anschließende Analyse des Zyklinkinase-Systems in IE3-exprimierenden Zellen zeigte verminderte Zyklin-A-assoziierte Kinaseaktivität, was für das HCMV-Protein IE2 ebenfalls beschrieben ist. Für MCMV-infizierte Zellen ist dem entgegen eine vermehrte Aktivität sowie gesteigerte Zyklin-A-Expression bekannt.

Darüber hinaus wurde in einer Struktur-Funktionsanalyse für das Protein IE3 ein Bereich identifiziert, welcher für die beobachtete Arrest-Funktion notwendig ist. Dieser liegt außerhalb des Abschnittes mit hoher Sequenzhomologie zum IE2-Protein, welcher diese Funktion bei HCMV beeinflusst. Es scheinen sich daher HCMV und MCMV neben konservierten Aktivitäten auch unterschiedliche Mechanismen zur Kontrolle der Zellzyklus-Progression ausgeprägt zu haben.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Diversität der Strategien, mit denen unterschiedliche CMV-Spezies den Zellzyklus der Wirtszelle kontrollieren. Die Vergleichbarkeit zwischen der CMV-Infektion des Menschen und vorhandenen Tiermodellen ist für den Punkt der Zellzyklusregulation nur in bestimmten Aspekten gegeben. Zum Verständnis der eukaryontischen Zellzyklusregulation ist die Familie der Zytomegalieviren mit ihren unterschiedlichen Proteinen in der Grundlagenforschung ein lehrreiches System. Das IE2-Protein von HCMV sowie das in dieser Arbeit als in Teilen funktionshomolog identifizierte IE3 von MCMV stellen elegante Werkzeuge für die weiterführende virologisch-experimentelle Forschung dar. Dieser Weg sollte tiefere Einblicke in die Pathogenese der durch Zytomegalieviren vermittelten Erkrankungen gewähren.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Vochem. [cmv infections of the neonate: prevalence, diagnosis, therapy]. *Z Geburtshilfe Neonatol*, 207(3):114–8, 2003. 0948-2393 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [2] Fields. *Virology*, volume 2. Lippincott Williams and Wilkins, 4th edition.
- [3] S. B. Boppana, R. F. Pass, W. J. Britt, S. Stagno, and C. A. Alford. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J*, 11(2):93–9, 1992. 0891-3668 Journal Article.
- [4] Nelson. *Textbook of Pediatrics*. Saunders, 16th edition, 2000.
- [5] S. Stagno, R. F. Pass, G. Cloud, W. J. Britt, R. E. Henderson, P. D. Walton, D. A. Veren, F. Page, and C. A. Alford. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *Jama*, 256(14):1904–8, 1986. 0098-7484 Journal Article.
- [6] F. Zanghellini, S. B. Boppana, V. C. Emery, P. D. Griffiths, and R. F. Pass. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis*, 180(3):702–7, 1999. 0022-1899 Journal Article.
- [7] K. B. Fowler, F. P. McCollister, A. J. Dahle, S. Boppana, W. J. Britt, and R. F. Pass. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*, 130(4):624–30, 1997. 0022-3476 Journal Article.
- [8] M. K. Gandhi and R. Khanna. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis*, 4(12):725–38, 2004. 1473-3099 Journal Article Review.
- [9] A. T. Rowshani, F. J. Bemelman, E. M. van Leeuwen, R. A. van Lier, and I. J. ten Berge. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation*, 79(4):381–6, 2005. 0041-1337 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [10] J. M. Goodrich, M. Boeckh, and R. Bowden. Strategies for the prevention of cytomegalovirus disease after marrow transplantation. *Clin Infect Dis*, 19(2):287–98, 1994. 1058-4838 Journal Article Review.

- [11] M. K. Gandhi, M. R. Wills, J. G. Sissons, and A. J. Carmichael. Human cytomegalovirus-specific immunity following haemopoietic stem cell transplantation. *Blood Rev*, 17(4):259–64, 2003. 0268-960x Journal Article Review Review, Tutorial.
- [12] M. A. Jacobson. Treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, 337(2):105–14, 1997. 0028-4793 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [13] Y. F. Zhou, M. B. Leon, M. A. Waclawiw, J. J. Popma, Z. X. Yu, T. Finkel, and S. E. Epstein. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med*, 335(9):624–30, 1996. 0028-4793 Journal Article.
- [14] E. De Clercq. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol*, 30(2):115–33, 2004. 1386-6532 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [15] D. W. Kimberlin. Antiviral therapy for cytomegalovirus infections in pediatric patients. *Semin Pediatr Infect Dis*, 13(1):22–30, 2002. 1045-1870 Journal Article.
- [16] J. M. Cherrington, M. D. Fuller, P. D. Lamy, R. Miner, J. P. Lalezari, S. Nuesse, and W. L. Drew. In vitro antiviral susceptibilities of isolates from cytomegalovirus retinitis patients receiving first- or second-line cidofovir therapy: relationship to clinical outcome. *J Infect Dis*, 178(6):1821–5, 1998. 0022-1899 Journal Article.
- [17] L. R. Grillone and R. Lanz. Fomivirsen. *Drugs Today (Barc)*, 37(4):245–255, 2001. 0025-7656 Journal article.
- [18] A. Marchini, H. Liu, and H. Zhu. Human cytomegalovirus with ie-2 (ul122) deleted fails to express early lytic genes. *J Virol*, 75(4):1870–8, 2001. 0022-538x Journal Article.
- [19] L. Wiebusch and C. Hagemeier. Human cytomegalovirus 86-kilodalton ie2 protein blocks cell cycle progression in g(1). *J Virol*, 73(11):9274–83, 1999. 0022-538x Journal Article.
- [20] L. Wiebusch and C. Hagemeier. The human cytomegalovirus immediate early 2 protein dissociates cellular dna synthesis from cyclin-dependent kinase activation. *Embo J*, 20(5):1086–98, 2001. 0261-4189 Journal Article.
- [21] C. Sweet. The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiol Rev*, 23(4):457–82, 1999. 0168-6445 Journal Article Review.
- [22] A. Krmpotic, I. Bubic, B. Polic, P. Lucin, and S. Jonjic. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect*, 5(13):1263–77, 2003. 1286-4579 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [23] J. Nicholas. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus. *J Virol*, 70(9):5975–89, 1996. 0022-538x Journal Article.

- [24] A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, M. S. Chee, 3rd Hutchison, C. A., T. Kouzarides, J. A. Martignetti, E. Preddie, and et al. The dna sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq*, 2(1):1–12, 1991. 1042-5179 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [25] W. D. Rawlinson, H. E. Farrell, and B. G. Barrell. Analysis of the complete dna sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol*, 70(12):8833–49, 1996. 0022-538x Journal Article.
- [26] M. S. Chee, A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, 3rd Hutchison, C. A., T. Kouzarides, J. A. Martignetti, and et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain ad169. *Curr Top Microbiol Immunol*, 154:125–69, 1990. 0070-217x Journal Article Review.
- [27] E. Murphy, D. Yu, J. Grimwood, J. Schmutz, M. Dickson, M. A. Jarvis, G. Hahn, J. A. Nelson, R. M. Myers, and T. E. Shenk. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25):14976–81, 2003. 0027-8424 Journal Article.
- [28] E. Murphy, I. Rigoutsos, T. Shibuya, and T. E. Shenk. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23):13585–90, 2003. 0027-8424 Journal Article.
- [29] B. Liu and M. F. Stinski. Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream atf and ap-1 cis-acting elements. *J Virol*, 66(7):4434–44, 1992. 0022-538x Journal Article.
- [30] W. Gibson. Structure and assembly of the virion. *Intervirology*, 39(5-6):389–400, 1996. 0300-5526 Journal Article Review.
- [31] W. J. Britt and M. Mach. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*, 39(5-6):401–12, 1996. 0300-5526 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [32] R. Cavallo, D. Lembo, G. Gribaudo, and S. Landolfo. Murine cytomegalovirus infection induces cellular folypolyglutamate synthetase activity in quiescent cells. *Intervirology*, 44(4):224–6, 2001. 0300-5526 Journal Article.
- [33] D. Lembo, A. Angeretti, M. Gariglio, and S. Landolfo. Murine cytomegalovirus induces expression and enzyme activity of cellular dihydrofolate reductase in quiescent cells. *J Gen Virol*, 79 (Pt 11):2803–7, 1998. 0022-1317 Journal Article.
- [34] W. A. Bresnahan and T. Shenk. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science*, 288(5475):2373–6, 2000. 0036-8075 Journal Article.
- [35] A. E. Greijer, C. A. Dekkers, and J. M. Middeldorp. Human cytomegalovirus virions differentially incorporate viral and host cell rna during the assembly process. *J Virol*, 74(19):9078–82, 2000. 0022-538x Journal Article.

- [36] C. A. Stoddart, R. D. Cardin, J. M. Boname, W. C. Manning, G. B. Abenes, and E. S. Mocarski. Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J Virol*, 68(10):6243–53, 1994. 0022-538x Journal Article.
- [37] T. M. Collins, M. R. Quirk, and M. C. Jordan. Biphasic viremia and viral gene expression in leukocytes during acute cytomegalovirus infection of mice. *J Virol*, 68(10):6305–11, 1994. 0022-538x Journal Article.
- [38] T. A. Banks and B. T. Rouse. Herpesviruses—immune escape artists? *Clin Infect Dis*, 14(4):933–41, 1992. 1058-4838 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [39] R. Thale, U. Szepan, H. Hengel, G. Geginat, P. Lucin, and U. H. Koszinowski. Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class i molecule transport. *J Virol*, 69(10):6098–105, 1995. 0022-538x Journal Article.
- [40] M. del Val, H. Hengel, H. Hacker, U. Hartlaub, T. Ruppert, P. Lucin, and U. H. Koszinowski. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class i molecules into the medial-golgi compartment. *J Exp Med*, 176(3):729–38, 1992. 0022-1007 Journal Article.
- [41] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Zipursky, and J. Darnell. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, 5th edition, 2004.
- [42] C. J. Sherr and J. M. Roberts. Cdk inhibitors: positive and negative regulators of g1-phase progression. *Genes Dev*, 13(12):1501–12, 1999. 0890-9369 Journal Article Review.
- [43] J. W. Harbour and D. C. Dean. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2(4):E65–7, 2000. 1465-7392 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [44] J. R. Nevins. Toward an understanding of the functional complexity of the e2f and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ*, 9(8):585–93, 1998. 1044-9523 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [45] Y. Geng, E. N. Eaton, M. Picon, J. M. Roberts, A. S. Lundberg, A. Gifford, C. Sardet, and R. A. Weinberg. Regulation of cyclin e transcription by e2fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*, 12(6):1173–80, 1996. 0950-9232 Journal Article.
- [46] J. Bartek, J. Bartkova, and J. Lukas. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*, 8(6):805–14, 1996. 0955-0674 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [47] L. Busino, M. Chiesa, G. F. Draetta, and M. Donzelli. Cdc25a phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene*, 23(11):2050–6, 2004. 0950-9232 Journal Article Review.

- [48] J. Pines and T. Hunter. Human cyclin a is adenovirus e1a-associated protein p60 and behaves differently from cyclin b. *Nature*, 346(6286):760–3, 1990. 0028-0836 Journal Article.
- [49] M. R. Jackman and J. N. Pines. Cyclins and the g2/m transition. *Cancer Surv*, 29:47–73, 1997. 0261-2429 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [50] H. Nojima. Cell cycle checkpoints, chromosome stability and the progression of cancer. *Hum Cell*, 10(4):221–30, 1997. 0914-7470 Journal Article Review.
- [51] Y. Shiloh. Atm and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, 3(3):155–68, 2003. 1474-175x Journal Article Review.
- [52] R. Agami and R. Bernards. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce g1 cell cycle arrest in response to dna damage. *Cell*, 102(1):55–66, 2000. 0092-8674 Journal Article.
- [53] A. Di Leonardo, S. P. Linke, K. Clarkin, and G. M. Wahl. Dna damage triggers a prolonged p53-dependent g1 arrest and long-term induction of cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev*, 8(21):2540–51, 1994. 0890-9369 Journal Article.
- [54] V. Dulic, W. K. Kaufmann, S. J. Wilson, T. D. Tlsty, E. Lees, J. W. Harper, S. J. Elledge, and S. I. Reed. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced g1 arrest. *Cell*, 76(6):1013–23, 1994. 0092-8674 Journal Article.
- [55] L. M. Schang. The cell cycle, cyclin-dependent kinases, and viral infections: new horizons and unexpected connections. *Prog Cell Cycle Res*, 5:103–24, 2003. 1087-2957 Journal Article Review.
- [56] K. H. Vousden. Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins. *Semin Cancer Biol*, 6(2):109–16, 1995. 1044-579x Journal Article Review Review, Tutorial.
- [57] R. F. Kalejta and T. Shenk. Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus. *Front Biosci*, 7:d295–306, 2002. 1093-4715 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [58] E. K. Flemington. Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments. *J Virol*, 75(10):4475–81, 2001. 0022-538x Journal Article Review Review, Tutorial.
- [59] I. Boldogh, S. AbuBakar, and T. Albrecht. Activation of proto-oncogenes: an immediate early event in human cytomegalovirus infection. *Science*, 247(4942):561–4, 1990. 0036-8075 Journal Article.
- [60] I. Boldogh, S. AbuBakar, C. Z. Deng, and T. Albrecht. Transcriptional activation of cellular oncogenes fos, jun, and myc by human cytomegalovirus. *J Virol*, 65(3):1568–71, 1991. 0022-538x Journal Article.

- [61] F. M. Jault, J. M. Jault, F. Ruchti, E. A. Fortunato, C. Clark, J. Corbeil, D. D. Richman, and D. H. Spector. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol*, 69(11):6697–704, 1995. 0022-538x Journal Article.
- [62] M. Lu and T. Shenk. Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from g1 to s. *J Virol*, 70(12):8850–7, 1996. 0022-538x Journal Article.
- [63] W. A. Bresnahan, I. Boldogh, E. A. Thompson, and T. Albrecht. Human cytomegalovirus inhibits cellular dna synthesis and arrests productively infected cells in late g1. *Virology*, 224(1):150–60, 1996. 0042-6822 Journal Article.
- [64] D. Dittmer and E. S. Mocarski. Human cytomegalovirus infection inhibits g1/s transition. *J Virol*, 71(2):1629–34, 1997. 0022-538x Journal Article.
- [65] L. Wiebusch, R. Uecker, and C. Hagemeier. Human cytomegalovirus prevents replication licensing by inhibiting mcm loading onto chromatin. *EMBO Rep*, 4(1):42–6, 2003. 1469-221x Journal Article.
- [66] W. A. Bresnahan, I. Boldogh, P. Chi, E. A. Thompson, and T. Albrecht. Inhibition of cellular cdk2 activity blocks human cytomegalovirus replication. *Virology*, 231(2):239–47, 1997. 0042-6822 Journal Article.
- [67] H. Zhu, J. P. Cong, G. Mamtora, T. Gingeras, and T. Shenk. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24):14470–5, 1998. 0027-8424 Journal Article.
- [68] P. Muganda, O. Mendoza, J. Hernandez, and Q. Qian. Human cytomegalovirus elevates levels of the cellular protein p53 in infected fibroblasts. *J Virol*, 68(12):8028–34, 1994. 0022-538x Journal Article.
- [69] E. A. Fortunato and D. H. Spector. p53 and rpa are sequestered in viral replication centers in the nuclei of cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol*, 72(3):2033–9, 1998. 0022-538x Journal Article.
- [70] E. A. Fortunato, A. K. McElroy, I. Sanchez, and D. H. Spector. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol*, 8(3):111–9, 2000. 0966-842x Journal Article Review Review, Tutorial.
- [71] J. M. DeMarchi and A. S. Kaplan. The role of defective cytomegalovirus particles in the induction of host cell dna synthesis. *Virology*, 82(1):93–9, 1977. 0042-6822 Journal Article.
- [72] M. Lu and T. Shenk. Human cytomegalovirus ul69 protein induces cells to accumulate in g1 phase of the cell cycle. *J Virol*, 73(1):676–83, 1999. 0022-538x Journal Article.
- [73] M. L. Hayashi, C. Blankenship, and T. Shenk. Human cytomegalovirus ul69 protein is required for efficient accumulation of infected cells in the g1 phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6):2692–6, 2000. 0027-8424 Journal Article.

- [74] R. F. Kalejta and T. Shenk. Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(6):3263–8, 2003. 0027-8424 Journal Article.
- [75] R. F. Kalejta, J. T. Bechtel, and T. Shenk. Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors. *Mol Cell Biol*, 23(6):1885–95, 2003. 0270-7306 Journal Article.
- [76] R. F. Kalejta and T. Shenk. The human cytomegalovirus ul82 gene product (pp71) accelerates progression through the g1 phase of the cell cycle. *J Virol*, 77(6):3451–9, 2003. 0022-538x Journal Article.
- [77] J. P. Castillo and T. F. Kowalik. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene*, 290(1-2):19–34, 2002. 0378-1119 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [78] R. A. Johnson, A. D. Yurochko, E. E. Poma, L. Zhu, and E. S. Huang. Domain mapping of the human cytomegalovirus ie1-72 and cellular p107 protein-protein interaction and the possible functional consequences. *J Gen Virol*, 80 (Pt 5):1293–303, 1999. 0022-1317 Journal Article.
- [79] M. J. Margolis, S. Pajovic, E. L. Wong, M. Wade, R. Jupp, J. A. Nelson, and J. C. Azizkhan. Interaction of the 72-kilodalton human cytomegalovirus ie1 gene product with e2f1 coincides with e2f-dependent activation of dihydrofolate reductase transcription. *J Virol*, 69(12):7759–67, 1995. 0022-538x Journal Article.
- [80] M. Nevels, C. Paulus, and T. Shenk. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(49):17234–9, 2004. 0027-8424 Journal Article.
- [81] E. A. Fortunato, M. H. Sommer, K. Yoder, and D. H. Spector. Identification of domains within the human cytomegalovirus major immediate-early 86-kilodalton protein and the retinoblastoma protein required for physical and functional interaction with each other. *J Virol*, 71(11):8176–85, 1997. 0022-538x Journal Article.
- [82] C. Hagemeier, R. Caswell, G. Hayhurst, J. Sinclair, and T. Kouzarides. Functional interaction between the hcmv ie2 transactivator and the retinoblastoma protein. *Embo J*, 13(12):2897–903, 1994. 0261-4189 Journal Article.
- [83] Y. J. Song and M. F. Stinski. Effect of the human cytomegalovirus ie86 protein on expression of e2f-responsive genes: a dna microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5):2836–41, 2002. 0027-8424 Journal Article.
- [84] W. A. Bresnahan, T. Albrecht, and E. A. Thompson. The cyclin e promoter is activated by human cytomegalovirus 86-kda immediate early protein. *J Biol Chem*, 273(34):22075–82, 1998. 0021-9258 Journal Article.

- [85] B. S. Salvant, E. A. Fortunato, and D. H. Spector. Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J Virol*, 72(5):3729–41, 1998. 0022-538x Journal Article.
- [86] R. Caswell, C. Hagemeier, C. J. Chiou, G. Hayward, T. Kouzarides, and J. Sinclair. The human cytomegalovirus 86k immediate early (ie) 2 protein requires the basic region of the tata-box binding protein (tbp) for binding, and interacts with tbp and transcription factor tfiib via regions of ie2 required for transcriptional regulation. *J Gen Virol*, 74 (Pt 12):2691–8, 1993. 0022-1317 Journal Article.
- [87] M. C. Pizzorno and G. S. Hayward. The ie2 gene products of human cytomegalovirus specifically down-regulate expression from the major immediate-early promoter through a target sequence located near the cap site. *J Virol*, 64(12):6154–65, 1990. 0022-538x Journal Article.
- [88] A. Neuwirth. *Nager CMV*. PhD thesis, Humboldt University, 2005.
- [89] A. Neuwirth. S phase evasion.
- [90] G. M. Keil, A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski. Immediate-early genes of murine cytomegalovirus: location, transcripts, and translation products. *J Virol*, 61(2):526–33, 1987. 0022-538x Journal Article.
- [91] G. M. Keil, A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski. Sequence and structural organization of murine cytomegalovirus immediate-early gene 1. *J Virol*, 61(6):1901–8, 1987. 0022-538x Journal Article.
- [92] M. Messerle, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski. Structure and expression of murine cytomegalovirus immediate-early gene 2. *J Virol*, 65(3):1638–43, 1991. 0022-538x Journal Article.
- [93] M. Messerle, B. Buhler, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. *J Virol*, 66(1):27–36, 1992. 0022-538x Journal Article.
- [94] U. H. Koszinowski, G. M. Keil, H. Volkmer, M. R. Fibi, A. Ebeling-Keil, and K. Munch. The 89,000-mr murine cytomegalovirus immediate-early protein activates gene transcription. *J Virol*, 58(1):59–66, 1986. 0022-538x Journal Article.
- [95] J. Schickedanz, L. Philipson, W. Ansorge, R. Pepperkok, R. Klein, and U. H. Koszinowski. The 89,000-mr murine cytomegalovirus immediate-early protein stimulates c-fos expression and cellular dna synthesis. *J Virol*, 62(9):3341–7, 1988. 0022-538x Journal Article.
- [96] R. D. Cardin, G. B. Abenes, C. A. Stoddart, and E. S. Mocarski. Murine cytomegalovirus ie2, an activator of gene expression, is dispensable for growth and latency in mice. *Virology*, 209(1):236–41, 1995. 0042-6822 Journal Article.

- [97] A. Angulo, P. Ghazal, and M. Messerle. The major immediate-early gene ie3 of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth. *J Virol*, 74(23):11129–36, 2000. 0022-538x Journal Article.
- [98] L. D. Cranmer, C. L. Clark, C. S. Morello, H. E. Farrell, W. D. Rawlinson, and D. H. Spector. Identification, analysis, and evolutionary relationships of the putative murine cytomegalovirus homologs of the human cytomegalovirus ul82 (pp71) and ul83 (pp65) matrix phosphoproteins. *J Virol*, 70(11):7929–39, 1996. 0022-538x Journal Article.
- [99] Sambrook, Fritsch, and Maniatis. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2nd edition, 1989.
- [100] J. Field, J. Nikawa, D. Broek, B. MacDonald, L. Rodgers, I. A. Wilson, R. A. Lerner, and M. Wigler. Purification of a ras-responsive adenylyl cyclase complex from *saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol*, 8(5):2159–65, 1988. 0270-7306 Journal Article.
- [101] M. Tyers, G. Tokiwa, R. Nash, and B. Futcher. The *cln3-cdc28* kinase complex of *s. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *Embo J*, 11(5):1773–84, 1992. 0261-4189 Journal Article.
- [102] L. Wiebusch. *Entdeckung und Charakterisierung eines ungewöhnlichen Zellzyklus-arrests hervorgerufen durch das IE2-Protein des humanen Zytomegalovirus (HCMV)*. PhD thesis, 2000.
- [103] H. Volkmer, C. Bertholet, S. Jonjic, R. Wittek, and U. H. Koszinowski. Cytolytic t lymphocyte recognition of the murine cytomegalovirus nonstructural immediate-early protein pp89 expressed by recombinant vaccinia virus. *J Exp Med*, 166(3):668–77, 1987. 0022-1007 Journal Article.
- [104] J. Asmar, L. Wiebusch, M. Truss, and C. Hagemeier. The putative zinc finger of the human cytomegalovirus ie2 86-kilodalton protein is dispensable for dna binding and autorepression, thereby demarcating a concise core domain in the c terminus of the protein. *J Virol*, 78(21):11853–64, 2004. 0022-538x Journal Article.
- [105] P. Chomczynski and N. Sacchi. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156–9, 1987. 0003-2697 Journal Article.
- [106] P. Chomczynski. A reagent for the single-step simultaneous isolation of rna, dna and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3):532–4, 536–7, 1993. 0736-6205 Journal Article.
- [107] M. A. Frohman, M. K. Dush, and G. R. Martin. Rapid production of full-length cdnas from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(23):8998–9002, 1988. 0027-8424 Journal Article.
- [108] T. Compton. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., 1990.

- [109] C. Muelhardt. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum AKADEMISCHER VERLAG, 3rd edition, 2002.
- [110] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. Specific enzymatic amplification of dna in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263–73, 1986. 0091-7451 Journal Article.
- [111] Z. Ahmad and K. P. Huang. Dephosphorylation of rabbit skeletal muscle glycogen synthase (phosphorylated by cyclic amp-independent synthase kinase 1) by phosphatases. *J Biol Chem*, 256(2):757–60, 1981. 0021-9258 Journal Article.
- [112] B. Weiss, T. R. Live, and C. C. Richardson. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. v. end group labeling and analysis of deoxyribonucleic acid containing single stranded breaks. *J Biol Chem*, 243(17):4530–42, 1968. 0021-9258 Journal Article.
- [113] W. J. Dower, J. F. Miller, and C. W. Ragsdale. High efficiency transformation of e. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16(13):6127–45, 1988. 0305-1048 Journal Article.
- [114] K. S. Lundberg, D. D. Shoemaker, M. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge, and E. J. Mathur. High-fidelity amplification using a thermostable dna polymerase isolated from *pyrococcus furiosus*. *Gene*, 108(1):1–6, 1991. 0378-1119 Journal Article.
- [115] P. Keohavong and W. G. Thilly. Fidelity of dna polymerases in dna amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(23):9253–7, 1989. 0027-8424 Journal Article.
- [116] K. R. Tindall and T. A. Kunkel. Fidelity of dna synthesis by the *thermus aquaticus* dna polymerase. *Biochemistry*, 27(16):6008–13, 1988. 0006-2960 Journal Article.
- [117] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson. Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–7, 1977. 0027-8424 Journal Article.
- [118] L. Alphey. *DNA-Sequenzierung*. Spektrum AKADEMISCHER VERLAG, 1997.
- [119] H. C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acids Res*, 7(6):1513–23, 1979. 0305-1048 Journal Article.
- [120] F. J. Stott, S. Bates, M. C. James, B. B. McConnell, M. Starborg, S. Brookes, I. Palmero, K. Ryan, E. Hara, K. H. Vousden, and G. Peters. The alternative product from the human *cdkn2a* locus, p14(arf), participates in a regulatory feedback loop with p53 and mdm2. *Embo J*, 17(17):5001–14, 1998. 0261-4189 Journal Article.
- [121] M. Scheffner, K. Munger, J. C. Byrne, and P. M. Howley. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(13):5523–7, 1991. 0027-8424 Journal Article.

- [122] P. Hainaut, T. Hernandez, A. Robinson, P. Rodriguez-Tome, T. Flores, M. Hollstein, C. C. Harris, and R. Montesano. Iarc database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res*, 26(1):205–13, 1998. 0305-1048 Journal Article.
- [123] D. L. Spector, Goldman R. D., and Leinwand L. A. *Cells - A Laboratory Manual*. CSHL Press.
- [124] J. T. Reston, S. Gould-Fogerite, and R. J. Mannino. Aspects of cellular physiology that influence dna-mediate gene transfer in nih3t3 cells. *Mol Cell Biochem*, 145(2):169–75, 1995. 0300-8177 Journal Article.
- [125] W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Mikos. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res*, 45(3):268–75, 1999. 0021-9304 Journal Article.
- [126] O. Boussif, F. Lezoualc’h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16):7297–301, 1995. 0027-8424 Journal Article.
- [127] J. Renzing and D. P. Lane. p53-dependent growth arrest following calcium phosphate-mediated transfection of murine fibroblasts. *Oncogene*, 10(9):1865–8, 1995. 0950-9232 Journal Article.
- [128] C. Chen and H. Okayama. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid dna. *Mol Cell Biol*, 7(8):2745–52, 1987. 0270-7306 Journal Article.
- [129] S. Miltenyi, W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch. High gradient magnetic cell separation with macs. *Cytometry*, 11(2):231–8, 1990. 0196-4763 Journal Article.
- [130] J. H. Waterborg and H. R. Matthews. The lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 32:1–4, 1994. 1064-3745 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [131] H. R. Pelham and R. J. Jackson. An efficient mrna-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, 67(1):247–56, 1976. 0014-2956 Journal Article.
- [132] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–5, 1970. 0028-0836 Journal Article.
- [133] E. Harlow and D. Lane. *Using Antibodies - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1998.
- [134] J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, Margulies D. H., E. M. Shevach, and W. Strober. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, New York, 1991.
- [135] M. J. De Brabander, R. M. Van de Veire, F. E. Aerts, M. Borgers, and P. A. Jansen. The effects of methyl (5-(2-thienylcarbonyl)-1h-benzimidazol-2-yl) carbamate, (r 17934; nsc 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured in vitro. *Cancer Res*, 36(3):905–16, 1976. 0008-5472 Journal Article.

- [136] G. W. Zieve, D. Turnbull, J. M. Mullins, and J. R. McIntosh. Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. nocodazole accumulated mitotic cells. *Exp Cell Res*, 126(2):397–405, 1980. 0014-4827 Journal Article.
- [137] G. J. Hannon. Rna interference. *Nature*, 418(6894):244–51, 2002. 0028-0836 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [138] L. Wiebusch, M. Truss, and C. Hagemeier. Inhibition of human cytomegalovirus replication by small interfering rnas. *J Gen Virol*, 85(Pt 1):179–84, 2004. 0022-1317 Journal Article.
- [139] Y. K. Yu, J. C. Wootton, and S. F. Altschul. The compositional adjustment of amino acid substitution matrices. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26):15688–93, 2003. 0027-8424 Journal Article.
- [140] M. Kronschnabl, M. Marschall, and T. Stamminger. Efficient and tightly regulated expression systems for the human cytomegalovirus major transactivator protein ie2p86 in permissive cells. *Virus Res*, 83(1-2):89–102, 2002. Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t Netherlands.
- [141] D. T. Petrik, K. P. Schmitt, and M. F. Stinski. Inhibition of cellular dna synthesis by the human cytomegalovirus ie86 protein is necessary for efficient virus replication. *J Virol*, 80(8):3872–83, 2006. Ai-13562/ai/niaid Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural United States.
- [142] L. Wiebusch, J. Asmar, R. Uecker, and C. Hagemeier. Human cytomegalovirus immediate-early protein 2 (ie2)-mediated activation of cyclin e is cell-cycle-independent and forces s-phase entry in ie2-arrested cells. *J Gen Virol*, 84(Pt 1):51–60, 2003. 0022-1317 Journal Article.
- [143] C. S. Morello, L. D. Cranmer, and D. H. Spector. In vivo replication, latency, and immunogenicity of murine cytomegalovirus mutants with deletions in the m83 and m84 genes, the putative homologs of human cytomegalovirus pp65 (ul83). *J Virol*, 73(9):7678–93, 1999. 0022-538x Journal Article.
- [144] R. F. Kalejta. Human cytomegalovirus pp71: a new viral tool to probe the mechanisms of cell cycle progression and oncogenesis controlled by the retinoblastoma family of tumor suppressors. *J Cell Biochem*, 93(1):37–45, 2004. 0730-2312 Journal Article Review Review, Tutorial.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Linus Grabenhenrich, erkläre an Eides statt, dass ich die im Fachbereich Humanmedizin der Humboldt-Universität zu Berlin zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Untersuchung der Zellzyklusaktivität
immediate early exprimierter Proteine
des Zytomegalievirus der Maus

in der

Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Labor für Pädiatrische Molekularbiologie,
Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

unter Leitung von

Prof. Dr. Dr. Christian Hagemeier

ohne sonstige (unzulässige) Hilfe durch Dritte selbst durchgeführt habe und die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Ich bestätige, bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt und die entsprechende Literatur vollständig angegeben zu haben.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die Arbeit wurde durch ein Forschungsstipendium der Charité Berlin unterstützt.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gruenden in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veroeffentlicht.