

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Alanine-Scanning der Coredomäne des Immediate-Early-2-Proteins des  
humanen Zytomegalievirus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

David Koch

aus Hamburg

Gutachter/in: 1. .... Prof. Dr. Dr. Chr. Hagemeyer  
2. .... Priv.-Doz. Dr. med. S. Voigt  
3. .... Prof. Dr. E. Bogner

Datum der Promotion: .....22.03.2013

Science is a way of thinking much more than it is a body of knowledge.

---

*(Dr. Carl Sagan)*





# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Herpesviridae . . . . .	1
1.2. Humanes Zytomegalievirus . . . . .	2
1.2.1. Epidemiologie und klinisches Bild . . . . .	3
1.2.2. Antivirale Therapie und Prävention . . . . .	4
1.2.3. Mögliche Beteiligung an anderen Erkrankungen . . . . .	5
1.2.4. Der Infektionszyklus . . . . .	6
1.2.5. Der MIE-Lokus . . . . .	15
1.3. Fragestellung der Arbeit . . . . .	28
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1. Allgemeine Materialien und Geräte . . . . .	29
2.2. Bakterien-Transformation . . . . .	31
2.3. Plasmidpräparation . . . . .	32
2.3.1. Plasmidpräparation in kleinem Maßstab . . . . .	32
2.3.2. Plasmidpräparation in großem Maßstab . . . . .	33
2.4. Mutagenese . . . . .	35
2.5. Sequenzierung . . . . .	38
2.6. Zellkultur . . . . .	39
2.7. Proteinbestimmung . . . . .	41
2.7.1. Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	42
2.7.2. Proteinbestimmung nach Lowry . . . . .	42
2.8. Expression . . . . .	42
2.9. Transaktivierung . . . . .	45
2.9.1. Transaktivierung des Fos-Promotors . . . . .	46
2.9.2. Transaktivierung des viralen UL112/113-Promotors . . . . .	47
2.10. Autorepression . . . . .	47
2.11. Zellzyklus . . . . .	48
2.12. DNA-Bindung . . . . .	50
2.13. Immunfluoreszenz . . . . .	52
2.14. In-silico-Strukturvorhersage . . . . .	54
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>55</b>
3.1. Experimentelles System . . . . .	55
3.2. Struktur-Funktionsanalyse des IE2-Proteins . . . . .	57
3.2.1. Darstellung der Mutanten . . . . .	57
3.2.2. Transaktivierung . . . . .	63
3.2.3. Autorepression . . . . .	65

3.2.4. DNA-Bindung . . . . .	67
3.2.5. Zellzyklusarrest . . . . .	71
3.2.6. Die Funktionen im Überblick . . . . .	75
<b>4. Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1. Mutationsstrategie . . . . .	78
4.2. Unterschiede in der Expressionsstärke . . . . .	79
4.3. Transaktivierung viraler und zellulärer Promotoren . . . . .	82
4.4. DNA-Bindung und Autorepression . . . . .	86
4.5. Zellzyklusarrest . . . . .	91
4.6. Die IE2-Core-Domäne . . . . .	93
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>A. Verwendete Oligonukleotide</b>	<b>99</b>
<b>B. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>C. Tabellenverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>D. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>E. Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>Danksagungen</b>	<b>133</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Herpesviridae

Die Zugehörigkeit zur Familie der Herpesviren ist historisch über die Morphologie des Viruspartikels (Virion) definiert (hierzu und zum Folgenden: Pellett und Roizman, 2007). *Herpesviridae* tragen ihre Erbinformation als doppelsträngige DNA, welche von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben ist. Es besteht zum größten Teil aus 12 pentameren und 150 hexameren Anordnungen des gleichen Viruskapsidproteins, die als Kapsomere bezeichnet werden. Das Kapsid ist von einer elektronenmikroskopisch amorph imponierenden, hauptsächlich aus Virusproteinen bestehenden Substanz umgeben, die als Tegument bezeichnet wird. Nach außen wird das Virion durch eine Lipiddoppelmembran abgegrenzt, welche aus der Wirtszelle stammt und zahlreiche Glykoproteine enthalten kann. Neben den morphologischen Gemeinsamkeiten teilen die Herpesviren noch vier weitere wichtige Eigenschaften:

1. Alle Herpesviren codieren eine Vielzahl von Enzymen des Nukleinsäurestoffwechsels und der DNA-Synthese.
2. Die virale DNA-Synthese findet im Zellkern statt, ebenso der Zusammenbau des Kapsids.
3. Die Produktion infektiöser Nachkommen führt stets zum Tod der Wirtszelle (lytischer Infektionszyklus).
4. Alle bisher bekannten Herpesviren können latent im Wirt verbleiben. In latent infizierten Zellen persistiert das Virusgenom als zirkuläres Molekül, von dem nur wenige Gene exprimiert werden. Unter Umständen, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind, kommt es jedoch in den latent infizierten Zellen zur Reaktivierung und infektiöses Virus kann sich erneut ausbreiten und Krankheitssymptome verursachen.

Herpesviren sind bei fast allen Tieren bekannt. Sie werden in die Unterfamilien der *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaherpesvirinae* eingeteilt. Sie unterscheiden sich u. a. hinsichtlich der Beschränkung auf bestimmte Wirte, der Länge des Replikationszyklus, der Orte der Latenz und des Zelltropismus.

## 1. Einleitung

Humanpathogene Herpesviren entstammen allen Unterfamilien. Bekannt sind die Alphaherpesviren *Herpes simplex Virus 1* und *2* (HSV-1/2 = HHV-1/2) und das *Varicella-Zoster-Virus* (VZV = HHV-3), die Betaherpesviren humanes Zytomegalievirus (HCMV = HHV-5) sowie die humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6A/B bzw. HHV-7) und die Gammaherpesviren *Epstein-Barr-Virus* (EBV = HHV-4) und das humane Herpesvirus 8 (HHV-8).

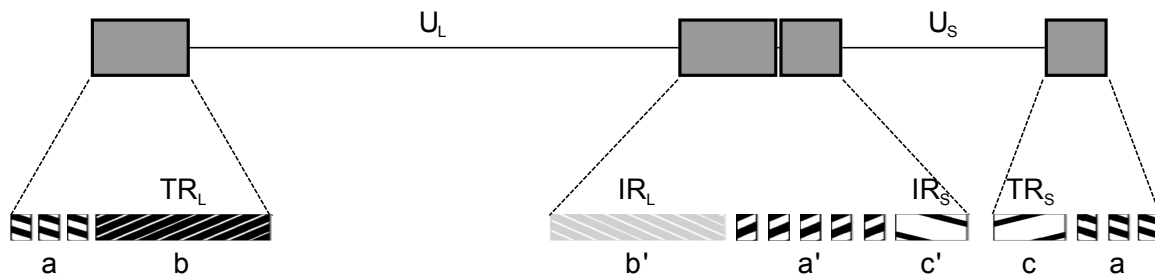
## 1.2. Humanes Zytomegalievirus

Das humane Zytomegalievirus gehört zur Gruppe der *Betaherpesvirinae*. Wie alle Vertreter dieser Gruppe zeichnet es sich durch Speziespezifität, langen Replikationszyklus, langsame Vermehrung in der Zellkultur und eine lichtmikroskopisch sichtbare Vergrößerung der infizierten Zelle (Zytomegalie) aus (hierzu und zum Folgenden: Mocarski *et al.*, 2007).

Die Speziespezifität erschwert die HCMV-Forschung, da kein Tiermodell für *in vivo* Experimente zur Verfügung steht. Allerdings besteht eine gewisse Verwandtschaft zu den Zytomegalieviren verschiedener Labortiere wie Maus und Ratte.

Das HCMV-Virion ist mit 200–300 nm Durchmesser etwas größer als das der meisten Herpesviren. Das Kapsid, welches 125 nm misst, enthält ein lineares DNA-Genom, welches mit ca. 235 kbp Länge das größte aller bekannten Herpesviren ist. Es codiert voraussichtlich mindestens 166 offene Leseraster. Für die Replikation in kultivierten Fibroblasten sind nur 45 offene Leseraster essenziell, 35 weitere führen bei Deletion zu einer verlangsamten Vermehrung (Dunn *et al.*, 2003). Die in Zellkultur nicht essenziellen Gene könnten wichtige Rollen für den Zelltropismus und die Auseinandersetzung mit dem Wirtsimmunsystem spielen.

Das Genom (siehe Abb. 1.1) besteht aus zwei Regionen mit sich nicht wiederholenden Sequenzen (*unique*), einer größeren, welche mit UL und einer kleineren, welche mit US bezeichnet wird. Diese Regionen werden von kürzeren Sequenzen eingeschlossen, die mehrfach vorkommen (*repeats*). Sie werden nach Länge und Position als *terminal repeat long* (TRL), *terminal repeat short* (TRS), *internal repeat long* (IRL) und *internal repeat short* (IRS) bezeichnet. Die zwischen den *unique*-Regionen liegenden Kopien sind gegenüber den terminalen invertiert. Anstelle der IRL-Region finden sich in wenig passagierten klinischen Isolaten weitere UL-Sequenzen, welche in den meist verwendeten Laborstämmen deletiert sind (Murphy *et al.*, 2003). An beiden Enden des Genoms befindet sich eine variable Anzahl eines weiteren kurzen repetitiven Elements (*a*), das



**Abbildung 1.1.:** Schematische Darstellung des HCMV-Genoms. TRL und IRL werden auch mit b bzw. b' bezeichnet, TRS und IRS mit c bzw. c'. Die a'-Elemente kommen an jeder Position in variabler Anzahl, jedoch mindestens einfach vor. Die IRL-Region fehlt in klinischen Isolaten weitgehend. Stattdessen haben diese Stämme verlängerte UL-Regionen. Die UL- und US-Segmente werden unabhängig voneinander in zufälliger Richtung eingebaut, sodass vier äquimolare Genomspezies gebildet werden.

dem viralen Verpackungsapparat als Schnittstellenmarkierung dient. Dieses kommt in invertierter Form (a') auch zwischen IRL und IRS vor. Ungefähr in der Mitte der UL-Region befindet sich eine, als *oriLyt* bezeichnete, ca. 1 500 bp lange Sequenz, die während der lytischen Infektion als Replikationsursprung dient.

### 1.2.1. Epidemiologie und klinisches Bild

HCMV ist ubiquitär verbreitet mit Durchseuchungsraten zwischen 52 % und 99 %, je nach Herkunft und sozio-ökonomischem Status der untersuchten Population (hierzu und zum Folgenden: Mocarski *et al.*, 2007). Die Viren werden über die Schleimhäute aufgenommen und werden, auch bei asymptomatischem Verlauf, für Monate (Erwachsene) bis Jahre (Kleinkinder) über Urin, Speichel, Tränen und Genitalsekrete ausgeschieden. Eine häufige Form der vertikalen Übertragung stellt das Stillen dar. Bis zu 95 % der seropositiven Mütter sezernieren HCMV mit der Muttermilch (Schleiss, 2006).

Zur Infektion kann es außerdem durch kontaminierte Blutprodukte und Organspenden kommen.

Die Primärinfektion findet oft schon im Kleinkindalter statt und bleibt in ca. 90 % der Fälle klinisch stumm, führt jedoch zu lebenslanger Viruspersistenz. Die symptomatische Infektion verläuft beim Immunkompetenten unter dem Bild der infektiösen Mononukleose, welche normalerweise durch das Epstein-Barr-Virus hervorgerufen wird. Die Erkrankung erfordert in der Regel keine antivirale Therapie und Komplikationen sind selten. Auch der symptomatische Verlauf führt nicht zur Elimination des Virus.

Schwere, zum Teil auch tödliche Verläufe finden sich regelmäßig bei Patienten, die

## 1. Einleitung

eine eingeschränkte Immunabwehr haben. Neben *in utero* infizierten Föten sind dies Neugeborene, AIDS-Patienten, Personen, die nach Organtransplantation immunsuppressiv behandelt werden, Empfänger allogener Stammzelltransplantate und Malignompatienten während Zytostatikatherapie.

Die transplazentare Übertragung kann einerseits durch Primärinfektion der Schwangeren, andererseits auch durch Reinfektion oder Reaktivierung nach früherer Infektion erfolgen. Sie kann zur konnatalen symptomatischen Zytomegalie führen, die sich durch folgende Symptome äußern kann: Petechien oder Purpura, Hypotrophie, Hepatosplenomegalie, Ikterus, hämolytische Anämie, Pneumonie, intrakranielle Verkalkungen, Mikrozephalie, Schwerhörigkeit, Chorioretinitis, Krampfanfälle, Thrombozytopenie, Hyperbilirubinämie und erhöhte Transaminasen. In ungefähr 10 % der Fälle führt die Erkrankung zum Tod in der Neonatalperiode (Istas *et al.*, 1995). Die überlebenden Kinder tragen häufig neurologische Spätschäden davon.

Auch bei zunächst asymptomatischer konnataler Infektion kommt es, allerdings seltener, zu Spätschäden, wie z. B. Hörverlust, Sehbehinderung, mentaler Retardierung und Krampfanfällen.

Aufgrund der hohen Prävalenz der latenten HCMV-Infektion kann nicht auf die Verwendung HCMV-positiver Spenderorgane verzichtet werden. Besonders problematisch ist dies für HCMV-negative Empfänger, die unter Immunsuppression eine Primärinfektion erleiden können. Aber auch bei initial seropositiven Empfängern kann es zu Reinfektion oder Reaktivierung durch HCMV kommen. Die Erkrankung kann sich bei diesen Patienten auf verschiedene Weise manifestieren. Neben einer akuten fieberhaften Allgemeinerkrankung kann HCMV auch zu spezifischen Organerkrankungen und bei Primärinfektion zur Transplantatabstoßung führen. Außerdem ist das Risiko für die Erkrankung an weiteren opportunistischen Erregern (Pilze, Bakterien) erhöht (Kim *et al.*, 2000).

AIDS-Patienten haben ein von ihrer CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Anzahl abhängiges Risiko für die Erkrankung an HCMV. Bei ihnen kommt es am häufigsten zur CMV-Retinitis, seltener zum Befall des Gastrointestinaltrakts oder anderen Manifestationen.

### 1.2.2. Antivirale Therapie und Prävention

Zur Behandlung der symptomatischen HCMV-Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten stehen in erster Linie drei antiviral wirksame Nukleosidanaloga zur Verfügung (Ganciclovir (GCV), Valganciclovir und Cidofovir). Ein weiterer Hemmstoff der viralen DNA-Polymerase ist Foscarnet, ein organisches Pyrophosphat analogon. Alle

diese Medikamente weisen eine beträchtliche Toxizität – insbesondere hinsichtlich der Knochenmark- und Nierenfunktion – auf, die ihre Anwendung beschränken kann. Sie werden allerdings trotzdem, je nach Risiko, auch schon prophylaktisch nach Transplantationen oder bei AIDS-Patienten mit niedriger CD4<sup>+</sup>-Zellzahl eingesetzt. Problematisch ist auch, dass es unter der Medikation nicht selten zur Resistenz der Viren gegen eine oder sogar mehrere der Substanzen kommt (Mocarski *et al.*, 2007).

Einen ganz anderen Wirkmechanismus hat das therapeutische RNA-Oligonukleotid Fomivirsen (ISIS 2922), es ist komplementär zur IE2-mRNA (siehe Abschnitt 1.2.5.2 auf Seite 19) und führt zur verminderten Expression von IE1 und IE2 (Anderson *et al.*, 1996). Es kann zur Behandlung der Ganciclovir-resistenten CMV-Retinitis als Injektion in den Glaskörper verwendet werden (Perry und Balfour, 1999). Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass es sich bei Fomivirsen um das erste für eine therapeutische Anwendung zugelassene Oligonukleotid handelt (Marwick, 1998).

Durch einfache hygienische Maßnahmen kann eine Ansteckung mit HCMV zwar vermieden werden, allerdings ist nicht zu erwarten, dass sich diese außerhalb besonderer Umgebungen (z. B. Krankenhäuser) umsetzen lassen. Das Risiko zur Infektion durch Blutkonserven kann durch Verwendung leukozytendepletierter Präparate oder solcher von seronegativen Spendern, insbesondere bei Risikopatienten, verringert werden (hierzu und zum Folgenden: Mocarski *et al.*, 2007).

Zugelassene Impfstoffe gegen HCMV stehen trotz erheblicher Bemühungen mit experimentellen Vakzinen nicht zur Verfügung. Der prophylaktische Einsatz von Anti-CMV-Hyperimmunglobulinen nach Organtransplantation ist zwar teilweise üblich, allerdings konnte nicht für alle Organe eine Wirksamkeit gezeigt werden und die parallele Applikation von Ganciclovir wird empfohlen (Preiksaitis *et al.*, 2005).

Insgesamt sind die Möglichkeiten zur Prävention und Behandlung von HCMV-Erkrankungen nach wie vor unbefriedigend. Es besteht Bedarf an weniger toxischen antiviralen Wirkstoffen und an einem effektiven Impfstoff. Die Grundlagenforschung kann hier einen Beitrag leisten, indem sie neue potenzielle Angriffspunkte für solche Substanzen aufdeckt.

### 1.2.3. Mögliche Beteiligung an anderen Erkrankungen

Bereits seit vielen Jahren bestehen Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von HCMV an Arteriosklerose. In verschiedenen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen pathologisch veränderten Gefäßen und HCMV-Infektion der Endothelien oder zwischen Gefäßerkrankungen und hohen CMV-IgG-Titern gefunden. Andere Studien kamen zu

## 1. Einleitung

widersprechenden Ergebnissen (Übersicht in: Mocarski *et al.*, 2007). Von besonderer Bedeutung könnten diese Vorgänge bei der chronischen Transplantatabstoßung sein. Verschiedene Studien haben HCMV-Infektion und Transplantatdysfunktion in Zusammenhang gebracht (Übersicht in: Britt, 2007b). Im Rattenmodell konnte eine Reduktion der Intimaproliferation nach Herztransplantation und experimenteller RCMV-Infektion bei GCV behandelten Ratten *versus* Placebo gezeigt werden (Lemstrom *et al.*, 1997). In einer *Post-hoc*-Analyse einer placebokontrollierten, randomisierten Studie an herztransplantierten Menschen konnte eine Reduktion der Stenoserate bei Patienten, die postoperativ eine GCV-Therapie erhalten hatten, nur dann festgestellt werden, wenn sie nicht ebenfalls mit Calciumantagonisten behandelt wurden (Valantine *et al.*, 1999). Die ätiologischen Zusammenhänge sind schwierig zu beurteilen, weil oft unklar bleibt, ob entzündliche Veränderungen durch HCMV hervorgerufen wurden oder ob sie nur besonders günstige Voraussetzungen für die HCMV-Infektion erzeugen. Ebenfalls denkbar wäre, dass sich beide Prozesse synergistisch beeinflussen.

Noch unklarer ist die Situation bei der Beteiligung von HCMV an Krebserkrankungen. Es wurden Zusammenhänge zwischen HCMV und u. a. Kolonkarzinomen, Gliomen und Zervixkarzinomen hergestellt (Übersicht in: Britt, 2007b; Cinatl *et al.*, 1996). In verschiedenen seroepidemiologisch angelegten Studien wurden widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich einer Rolle von HCMV publiziert. Ebenso in Studien zum Nachweis viraler DNA in Tumorgeweben. Selbst wenn der Nachweis viraler DNA oder Genprodukte gelingt, ist es aufgrund der hohen Prävalenz der Infektion schwierig, einen kausalen Zusammenhang herzustellen oder auszuschließen.

Shen *et al.* (1997) haben eine mutagene Wirkung der viralen IE1- und IE2-Proteine in *Chinese hamster ovary* (CHO)-Zellen gezeigt. In derselben Arbeit wird eine Steigerung der Adenovirus-E1A bedingten onkogenen Transformation durch die genannten Proteine beschrieben. Die Autoren schlagen eine *Hit-and-run*-Wirkung der CMV-Proteine vor, da in den transformierten Zellen weder IE1/2-Protein noch CMV-DNA nachweisbar ist.

### 1.2.4. Der Infektionszyklus

HCMV ist *in vivo* in der Lage, sich in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen zu vermehren. Hierzu zählen Fibroblasten, Endothel-, Epithel- und neuronale Zellen, Gliazellen, glatte Muskelzellen, Monozyten, Trophoblastenzellen und Hepatozyten (Stinski und Meier, 2007). *In vitro* kommt es rasch zu Mutationen und Deletionen von Virusgenen, die für die Vermehrung in der jeweiligen Zelllinie nicht essenziell sind. Damit einher geht ein Verlust der Fähigkeit, in verschiedenen der oben genannten Zelltypen zu replizieren (Mocarski *et al.*, 2007).



Die Infektion der Wirtszelle wird – zumindest in Fibroblasten und CHO-Zellen – durch Bindung von zellmembranständigen Heparansulfatproteoglykanen initiiert (Compton *et al.*, 1993), wobei ist das virale Glykoprotein gB an der Interaktion beteiligt ist (Boyle und Compton, 1998). Welche Membranrezeptoren des Wirts die Aufnahme des Virions bewirken, ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Compton und Feire, 2007). Nach der Fusion der viralen Lipidhülle mit der Zellmembran, erfolgt der Transport des Kapsids im Zytoplasma, wahrscheinlich über Mikrotubuli, zum Zellkern, wo die virale DNA durch Kernporen geschleust wird und die Genexpression beginnt (Mocarski *et al.*, 2007).

Die virale Genexpression während der lytischen Infektion wird bei Herpesviren in vier Phasen eingeteilt. Die erste erfordert noch keine virale *de novo* Proteinsynthese und wird als *immediate-early* (IE) oder  $\alpha$ -Phase bezeichnet. Die (*delayed*)-*early* (DE) oder  $\beta$ -Gene benötigen zur Expression die virale Proteinproduktion, sind jedoch unabhängig von der viralen DNA-Synthese. Die letzten beiden Phasen sind vom Start der viralen DNA-Replikation abhängig. Die *leaky-late* ( $\gamma_1$ )-Genprodukte treten verstärkt nach diesem auf, während die Expression der *true-late*-Gene ( $\gamma_2$ ) vollkommen von der Virusgenomreplikation abhängt (Pellett und Roizman, 2007). In der IE-Phase wirken – neben zellulären Faktoren – Tegumentproteine wie pp71 und ppUL35 als Transaktivatoren der IE-Promotoren (Liu und Stinski, 1992; Schierling *et al.*, 2004). Die Transkription erfolgt von vier Regionen des Genoms: UL36–37, TRS1/IRS1, US3 und UL122–123, wobei oft mehrere Spleißprodukte gebildet werden. Die Produkte von UL36–37 haben antiapoptotische Funktion. pUL36 (vICA) wirkt als Inhibitor der Aktivierung von Caspase 8 (Skaletskaya *et al.*, 2001), pUL37 $\times$ 1 als viraler, mitochondrial lokalisierter Inhibitor der Apoptose (vMIA) (Goldmacher *et al.*, 1999; Reboredo *et al.*, 2004). Das Genprodukt von US3 führt zur Verminderung der MHC-Klasse 1 vermittelten Antigenpräsentation und dient damit wahrscheinlich dem Schutz vor frühzeitiger Elimination infizierter Zellen durch das Immunsystem (Misaghi *et al.*, 2004). Die Genprodukte von TRS1 und dem eng verwandten IRS1, die als Tegumentproteine schon vor der IE-Genexpression in die Zelle gelangen (Romanowski *et al.*, 1997), blockieren einen als *host shutoff* bezeichneten antiviralen Mechanismus in infizierten Zellen (Child *et al.*, 2004). In Fibroblasten, die mit einem Vacciniavirus infiziert wurden, das die Fähigkeit zur Inhibition dieser Funktion verloren hatte, konnten diese Proteine den *shutoff* der zellulären und viralen Proteinsynthese u. a. durch Inhibition der Proteinkinase K verhindern. Außerdem sind TRS1 und IRS1 an der Transaktivierung mindestens eines Gens der *late*-Phase beteiligt (Stasiak und Mocarski, 1992). UL37 $\times$ 3 hat Bedeutung für die Transaktivierung des zellulären *hsp70*-Promotors (Hayajneh *et al.*, 2001).

Die Genprodukte der UL122–123-Region werden von allen IE-Proteinen am stärksten exprimiert, weshalb dieser Locus auch als *major immediate-early* (MIE)-Region

## 1. Einleitung

bezeichnet wird. Die Hauptprodukte dieser Region werden IE1 und IE2 genannt. In Gegenrichtung zu diesen wird UL127 transkribiert, dessen Funktion unbekannt und das *in vitro* entbehrlich ist (Stinski und Meier, 2007; Dunn *et al.*, 2003). Während in den ersten zwei Stunden nach Infektion IE2 vorherrscht, wird im weiteren Verlauf der IE-Phase mehr IE1 gebildet (Stamminger *et al.*, 1991).

IE1 wirkt synergistisch mit IE2 auf die Aktivierung von *early*-Promotoren, wobei es teils essenziell, teils verstärkend beteiligt ist (Übersicht in: Stenberg, 1996). Es aktiviert außerdem den MIEP, seinen eigenen Promotor (Cherrington und Mocarski, 1989), u. a. über NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen (Sambucetti *et al.*, 1989). IE1 assoziiert mit ND10 genannten nukleären Domänen und führt zur Freisetzung normalerweise dort gebundener zellulärer Faktoren und zur Unterdrückung der Histondeacetylase (HDAC) vermittelten Repression der Transkription (Tang und Maul, 2003; Nevels *et al.*, 2004). Außerdem wird auch IE1 eine Rolle bei der Regulation der Interferonantwort und der Apoptoseinhibition zugeschrieben (Paulus *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 1995). IE1 ist bei hoher *multiplicity of infection* (MOI), d. h. bei einem hohen Verhältnis von infektiösen Virionen zu Zellen, nicht essenziell für die lytische Replikation in Fibroblasten. Bei niedriger MOI kommt es jedoch zu einem Block auf der Ebene der *early*-Genexpression (Mocarski *et al.*, 1996; Gawn und Greaves, 2002).

IE2 ist ein essenzieller Transaktivator verschiedener viraler und zellulärer Promotoren. Daneben hat es noch vielfältige andere Funktionen u. a. bezüglich der Zellzykluskontrolle (Übersicht in: Stinski und Meier, 2007). Da es in Abschnitt 1.2.5.2 ausführlich behandelt wird, soll hier nicht näher darauf eingegangen werden. In der *delayed-early*-Phase (DE), die ca. sechs Stunden nach Infektion beginnt, ermöglichen die o. g. Transaktivatoren, insbesondere IE1/2, die Expression eines Großteils des viralen Genoms (White und Spector, 2007). Zu den essenziellen Genprodukten dieser Phase gehören die Komponenten der viralen DNA-Replikationsmaschinerie, nämlich ein Helicase-Primase-Komplex aus UL105, UL70 und UL102, eine DNA-Polymerase (UL54), ein mit ihr assoziiertes, essenzielles Protein (UL44) und ein Einzelstrang-DNA Bindungsprotein (UL57). Von UL84 wird ein nukleäres Phosphoprotein exprimiert, welches mit IE2 und UL44 in den viralen Replikationskompartimenten kolokalisiert und dort einen im *ori*<sub>Lyt</sub> gelegenen Promotor aktiviert. Die Bedeutung dieser Interaktion für die Initiation der Replikation ist noch nicht voll aufgeklärt, ppUL84 hat jedoch dUTPase-Aktivität und könnte Energie für die Helicase bereitstellen (Anders *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2004; Colletti *et al.*, 2005).

Die Produkte von UL112/113 sind ebenfalls essenziell für die virale DNA-Replikation. Ihre Bedeutung ist nicht vollständig aufgeklärt, sie kolokalisieren jedoch mit anderen Proteinen der Replikationsgabel an ND10 und könnten eine wichtige Rolle in der Rekrutierung dieser Proteine spielen (Ahn *et al.*, 1999).

Weitere Proteine, die in Komplementationsstudien als essenziell für die *ori*Lyt-abhängige Replikation identifiziert wurden (Pari und Anders, 1993), scheinen keine direkte Beteiligung an dieser zu haben, sondern sind vielmehr als Transaktivatoren essenzieller DE-Proteine von Bedeutung. Dies sind die IE-Proteine pIRS1/pTRS1 und pUL37×1 (vMIA) (Sarisky und Hayward, 1996).

Die virale DNA-Synthese, welche ca. 24 Stunden nach Infektion beginnt, läuft wahrscheinlich nach dem *rolling circle*-Modell ab, obwohl die experimentellen Daten auch andere Mechanismen nicht ausschließen (Anders *et al.*, 2007; McVoy und Adler, 1994). In diesem Modell zirkularisieren die Genome nach dem *uncoating* in Abwesenheit von *de novo* Proteinsynthese. Bei der Replikation werden dann zunächst verkettete Virusgenome gebildet. Beim Einspulen der DNA in die Kapside wird von der Verpackungsmaschinerie eine Schnittstelle im *a*-Element (siehe Abschnitt 1.2) erkannt und ein lineares Einzelgenom verpackt (Übersicht in: Britt, 2007a).

Neben den genannten werden in der *early*-Phase auch bereits Struktur- und Tegumentproteine exprimiert. Hierzu gehören pp65, pp71, pp150, ppUL48 (LTP) und gp48. Ihre bekannten Funktionen können diese Proteine allerdings erst später im Replikationszyklus erfüllen (Mocarski *et al.*, 2007).

UL34 ist ein DE-Gen mit regulatorischer Funktion, sein Produkt reprimiert den IE-Promotor US3 (Mocarski *et al.*, 2007).

Nach Beginn der viralen DNA-Replikation kommt es zur Expression der *late*-Phase-Gene. Der Mechanismus der Beschränkung der Expression auf diese Phase ist noch nicht verstanden, hier könnten sowohl zelluläre als auch virale Proteine, die Replikation *per se* und postranslationale Regulation eine Rolle spielen (Übersicht in: Anders *et al.*, 2007). In dieser Phase werden Proteine gebildet, welche an der Kapsidbildung, deren Reifung und Ausknospung beteiligt sind (Anders *et al.*, 2007).

Die Assemblierung der Kapside spielt sich im Zellkern ab. Der Prozess ähnelt in wesentlichen Punkten dem des HSV. Die Kapsidbestandteile (MCP, SCP, MnCP, MnCP-bp) werden um ein Gerüst aus *assembly protein* und Assemblin zusammengesetzt, welches im Verlauf der Reifung proteolytisch abgebaut wird. Vermutlich funktioniert das Genprodukt von UL104, das ebenfalls Bestandteil des Kapsids ist, als Portalprotein und ermöglicht in Zusammenarbeit mit weiteren Virusproteinen (UL56, UL89) die Verpackung eines einzelnen Virusgenoms. Das unreife Präkapsid wird hierdurch zum Nukleokapsid (Übersicht in: Britt, 2007a; Gibson, 1996).

Für den Austritt aus dem Nukleus werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Die meisten Autoren favorisieren die Ausknospung eines Kapsids an der inneren Kernmembran, wobei dieses eine Membranhülle erhält (*envelopment*), und eine nachfolgende Fusion dieser Hülle mit der äußeren nukleären Membran, wobei das Kap-

## 1. Einleitung

sid ohne Hülle ins Zytoplasma entlassen wird (*de-envelopment*) (Mocarski *et al.*, 2007; Britt, 2007a; Mettenleiter, 2002). Dies ist analog zu den Vorgängen in  $\alpha$ -Herpesviren (Granzow *et al.*, 2001). Voraussetzung hierfür ist wahrscheinlich die lokale Auflösung der nukleären Lamina durch Phosphorylierung von Laminen durch die zelluläre Proteinkinase C und/oder die virale Proteinkinase pUL97. Die Virusprodukte pUL50 und ppUL53 kolokalisieren mit Nukleokapsiden an der nukleären Lamina und rekrutieren dort die Proteinkinase C (Muranyi *et al.*, 2002; Dal Monte *et al.*, 2002; Krosky *et al.*, 2003).

Erhebliche Unklarheit besteht in der Frage, wie und wo die Nukleokapside ihre Tegumentumhüllung erhalten (Übersicht in: Britt, 2007a).

Viele Tegumentproteine haben eine nukleäre Lokalisation, andere finden sich nur im Zytoplasma, sodass wahrscheinlich mehrere Schritte von Tegumentierung und Detegumentierung im Prozess der Virionenreifung stattfinden. Die finale Tegumentierung erhalten die Kapside direkt nach dem *de-envelopment* an der äußeren Kernmembran im Zytoplasma (Homman-Loudiyi *et al.*, 2003). Die Lipidumhüllung der tegumentierten Kapside findet durch Einsprossen in zytoplasmatische Vakuolen in der Mitte eines sogenannten *virion assembly compartment* (AC) statt, in welchen verschiedene Tegumentproteine und Hüllglykoproteine nachgewiesen wurden (pp150, pp28, pp65, gB, gH und gp65). Das AC findet sich nur in virusinfizierten Zellen und bildet dort den für die Zytomegalieviren charakteristischen zytoplasmatische Einschluss (Britt, 2007a; Sanchez *et al.*, 2000; Homman-Loudiyi *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2007). Die Lipidmembran enthält neben den viralen Glykoproteinen auch zelluläre Membranproteine, deren Bedeutung für HCMV unbekannt ist (Homman-Loudiyi *et al.*, 2003). Zusätzlich zu den Tegumentproteinen werden auch virale und zelluläre mRNA in die Partikel verpackt, wobei ohne Präferenz alle mRNAs in dem Verhältnis inkorporiert werden, in dem sie im Zytoplasma vorliegen. Wenn dieser Prozess für das CMV von Bedeutung ist, kann eine Regulation also nur über die mRNA-Konzentrationen zum Zeitpunkt der Verpackung erfolgen (Terhune *et al.*, 2004). Neben reifen Viruspartikeln werden auch nichtinfektiöse Partikel in infizierten Zellen gebildet: *dense bodies* und *non infectious enveloped particles* (=NIEP). Bei Ersteren handelt es sich um Tegumentansammlungen mit einer Lipidumhüllung, bei Letzteren um Kapside, die statt DNA nur Gerüstproteine enthalten und ebenfalls umhüllt werden. Zusammengenommen machen die nichtinfektiösen Partikel den größten Teil der Produkte der infizierten Zelle aus (Mocarski *et al.*, 2007).

Die lipidumhüllten, reifen Virionen, ebenso wie die nichtinfektiösen Partikel, gelangen wahrscheinlich in sekretorischen Vakuolen zur Plasmamembran. Dort verschmelzen die Vakuolen mit dieser, und die Viruspartikel gelangen in den Interzellularraum, von

wo sie sich weiter verbreiten und neue Infektionszyklen beginnen können (Homman-Loudiyi *et al.*, 2003; Britt, 2007a).

#### 1.2.4.1. Wirkungen auf die Wirtszelle

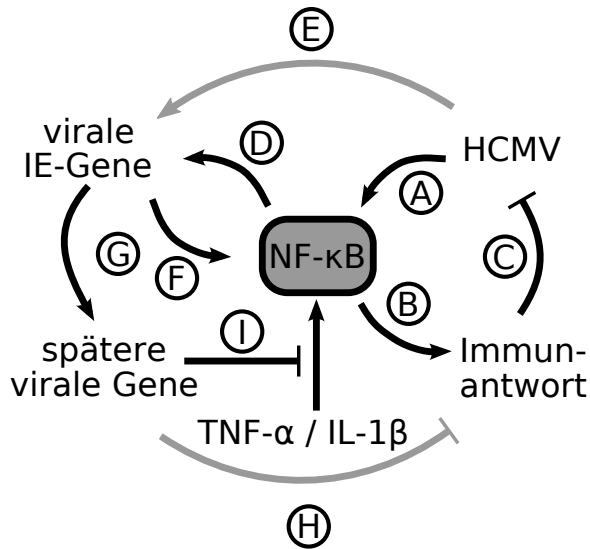
Das CMV ist für eine erfolgreiche Beendigung seines Replikationszyklus auf bestimmte Bedingungen in der Wirtszelle angewiesen. Es codiert vielfältige Funktionen um diese Bedingungen zu erzeugen und für die Dauer des Zyklus aufrechtzuerhalten.

So greift das Virus in verschiedener Weise in die Regulation der Genexpression ein. Dabei spielt die Modulation der Histondeacetylaseaktivität durch Tegument- und IE-Proteine eine Rolle (McCormick und Mocarski, 2007). Welche Bedeutung die jüngst entdeckten viralen miRNAs in der Expressionsregulation einnehmen, ist noch nicht geklärt (Pfeffer *et al.*, 2005; Grey *et al.*, 2005; Dunn *et al.*, 2005). In der *Late*-Phase sind viele Zytoskelett-, Matrix-, Adhäsions- und Apoptoseproteine herunterreguliert, gleichzeitig werden viele Energiestoffwechsel-, DNA-Replikations-, Zellzyklus- und Entzündungsproteine vermehrt gebildet (Hertel und Mocarski, 2004).

Die Expression von MHC-Klasse-I-Proteinen wird auf verschiedenen Ebenen durch das Virus moduliert. Die Expression dieser Proteine an der Zelloberfläche wird unterdrückt, gleichzeitig werden virale MHC-Homologe (UL18) und nicht klassische MHC-Proteine exprimiert. Durch diese Kombination entgeht das Virus sowohl der Tötung der Wirtszelle durch CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten, als auch der durch *natural-killer* (NK)-Zellen. Außerdem unterdrücken virale Funktionen die IFN- $\gamma$ -vermittelte Expression von MHC-Klasse-2-Proteinen auf (nicht professionellen) antigenpräsentierenden Zellen und damit die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten (Übersicht in: Lin *et al.*, 2007).

Durch Exposition von Zellen mit CMV-Virionen kommt es zum vermehrten Auftreten von Chromosomenschäden und zwar unabhängig davon, ob infektiöse Viren oder durch UV-Bestrahlung zuvor inaktivierte verwendet wurden (Abubakar *et al.*, 1988; Fortunato *et al.*, 2000). Virusinduzierter Stress oder DNA-Schäden können zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen (McCormick und Mocarski, 2007). HCMV codiert mit vMIA und vICA zwei Proteine mit antiapoptotischer Wirkung. vMIA bindet das proapoptotische zelluläre Bax und inaktiviert es hierdurch. vICA verhindert die Aktivierung von Caspase-8 und unterbricht damit eine Kaskade, die zur Apoptose durch extrinsische Signale führen würde. In infizierten Zellen werden zelluläre antiapoptotische Proteine der Bcl-Familie hochreguliert (Übersicht in: Andoniou und Degli-Esposti, 2006). Auf die Bedeutung von IE2-Interaktionen mit dem p53-Protein für die Apoptoseinhibition soll in Abschnitt 1.2.5.2 eingegangen werden. CMV infizierte Zellen sind relativ resistent ge-

## 1. Einleitung



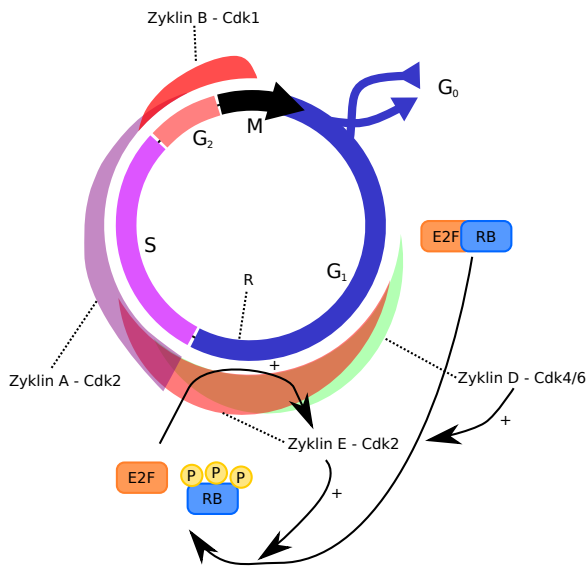
**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen HCMV und NF-κB. Ausgelöst durch Zellmembrankontakt und Eintritt des Virus kommt es zu einer ersten Welle der NF-κB-Aktivierung (A). Diese führt zur Aktivierung von Teilen des angeborenen Immunsystems (B) mit antiviraler Wirkung (C). Andererseits ist NF-κB ein wichtiger Faktor (D) für die Aktivierung der IE-Genexpression (E) nach Virus-eintritt. Die IE-Genprodukte steigern die Transaktivierung von NF-κB-Untereinheiten (p105/p50 und p65) unmittelbar und durch Induktion des Transkriptionsfaktors Sp-1 (Yurochko *et al.*, 1997) (F), sodass es zu einer zweiten Welle der NF-κB-Aktivierung kommt. Die IE-Gene transaktivieren spätere virale Gene (G), diese führen zu einer Unterdrückung der NF-κB-Antwort auf proinflammatorische Signale (I) und tragen so zur Reduktion der zellulären antiviralen Immunaktivität (H) bei. Schema nach Montag *et al.* (2006).

reduktion der zellulären antiviralen Immunaktivität (H) bei. Schema nach Montag *et al.* (2006).

genüber  $\beta$ -Interferon (IFN). Die relativ geringere IFN- $\beta$ -Produktion nach Infektion mit hoher MOI spricht allerdings dafür, dass virale Funktionen diese trotzdem regulieren können (McCormick und Mocarski, 2007).

Bereits wenige Minuten nach Kontakt der Zelle mit HCMV kommt es zu einer starken NF-κB-Antwort, diese wird u. a. durch Stimulation von Membranrezeptoren der *Toll-like*-Rezeptorfamilie und CD14 durch die viralen Hüllproteine gB und gH hervorgerufen (Compton *et al.*, 2003; Boehme *et al.*, 2006). Auch IRF-3 (*interferon response factor*) wird früh durch die Virusinfektion induziert. Sowohl NF-κB als auch IRF-3 sind an der Transaktivierung sogenannter interferonstimulierter Gene (ISG) beteiligt und bilden einen angeborenen antiviralen Abwehrmechanismus (Kawai und Akira, 2006). HCMV scheint sich diese zelluläre Reaktion teilweise nutzbar gemacht zu haben, da NF-κB die Expression viraler IE-Proteine über den MIEP-Enhancer verstärkt (DeMeritt *et al.*, 2004), während das Virus in der Lage ist, die Expression der ISGs zu reprimieren (Browne und Shenk, 2003). Während IE-Genprodukte die Expression von NF-κB sogar stimulieren (Yurochko *et al.*, 1995), wird im weiteren Verlauf des Infektionszyklus die NF-κB-Aktivierung u. a. durch Herunterregulation von TNF- $\alpha$ -Rezeptoren inhibiert (siehe Abb. 1.2) (Montag *et al.*, 2006).

CMV codiert zwar einen Großteil der für seine DNA-Replikation wichtigen Proteine selbst (s. o.), für die Bereitstellung der Nukleotide und der Energie ist es jedoch auf



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung des eukaryoten Zellzyklus. Die zyklische Aktivität der Cyclin-Cdk-Komplexe führt zum geordneten Durchlaufen des Zellzyklus. Mitogene Signale führen zur Akkumulation von Cyclin D und bei  $G_0$ -Zellen zum Wiedereintritt in den Zellzyklus. In der M-Phase findet die Zellteilung statt (nicht dargestellt). Eine wichtige Rolle spielt der Phosphorylierungsgrad des RB-Proteins. Wird es durch die Cyclin D/Cdk4/6 und Cyclin E/Cdk2 hyperphosphoryliert, gibt es das gebundene E2F frei. E2F steigert die Expression von Cyclin E, Cyclin B und Cdk2, so dass eine positive Rückkopplung einsetzt. In diesem Zustand hat die Zelle den sogenannten Restriktionspunkt (R) überschritten, d. h. sie führt auch bei Entzug der Wachstumsfaktoren den begonnenen Zyklus zu Ende.

die Wirtszelle angewiesen. Das Virus infiziert häufig nicht proliferierende  $G_0$ -Zellen, in welchen diese Substrate nicht in ausreichender Menge vorhanden sind. In replizierenden Zellen konkurriert die virale DNA-Synthese normalerweise mit der der Wirtszelle. HCMV greift daher in verschiedener Weise in den Zellzyklus ein, um die Replikationsbedingungen für sich zu verbessern.

Der normale Zellzyklus wird durch einen geregelten Ablauf der Expression bzw. Aktivierung von Cyclinen und ihren assoziierten Kinasen (*cyclin-dependent kinase*, *Cdk*) gesteuert (siehe Abb. 1.3) (Übersicht in: Tessema *et al.*, 2004). Hierbei spielen transkriptionelle Aktivierung, Ubiquitin vermittelter Abbau und die hemmenden Effekte der Cdk-Inhibitoren (Cdk<sub>i</sub>) eine Rolle. In der  $G_0$ - und frühen  $G_1$ -Phase sind Cdk<sub>i</sub> hoch- und Cdk-Aktivitäten herunterreguliert.

Um optimale Bedingungen zu erreichen, induziert HCMV in  $G_0/G_1$ -Zellen den Eintritt in den Zellzyklus (Jault *et al.*, 1995; Bresnahan *et al.*, 1996; Lu und Shenk, 1996; Dittmer und Mocarski, 1997), blockiert jedoch die zelluläre DNA-Replikation durch Inhibition des *replication licensing* (Biswas *et al.*, 2003; Wiebusch *et al.*, 2003). Zellen, die in der S-Phase infiziert werden, exprimieren zunächst keine Virusproteine bis sie  $G_1$  erreichen und ebenfalls in den Zellzyklusarrest gehen (Salvant *et al.*, 1998; Fortunato *et al.*, 2002). In einigen Zellen treten sogenannten Pseudomitosen auf (Hertel und Mocarski, 2004; Hertel *et al.*, 2007).

## 1. Einleitung

Bereits kurz nach Infektion, und in Abwesenheit von *de novo* Proteinsynthese, kommt es zur Aktivierung von zellulären Signalmolekülen (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , cAMP und cGMP) (Albrecht *et al.*, 1990) und zur Induktion der Protoonkogene c-Fos, c-Jun und c-Myc (Boldogh *et al.*, 1990). In produktiv infizierten Zellen kommt es zur Ausbildung einer untypischen Konstellation von Zellzyklusproteinen. Zyklin E/Cdk2 sowie Zyklin B/Cdk1 sind hochreguliert, während die Aktivität von Zyklin A und seinen assoziierten Kinasen zunächst kaum nachweisbar ist und erst im weiteren Verlauf der Infektion leicht ansteigt (Jault *et al.*, 1995; Dittmer und Mocarski, 1997; Salvant *et al.*, 1998). Cdk2 transloziert aus dem Zytoplasma in den Nukleus (Bresnahan *et al.*, 1997). Das Retinoblastomprotein (pRB) wird hyperphosphoryliert, was zur Freigabe der E2F-Transkriptionsfaktoren führt (Jault *et al.*, 1995). E2F transaktiviert seine eigene Expression und die der Zellzyklusregulatoren Zyklin E und B sowie Cdk2 (siehe Abb. 1.3). Außerdem die von einer Vielzahl von Faktoren der DNA-Replikation und der Biosynthese der benötigten Deoxynucleotidtriphosphate (dNTP) (Tessema *et al.*, 2004). So kommt es zu einem Anstieg von Enzymen wie PCNA (Dittmer und Mocarski, 1997), RPA (Fortunato und Spector, 1998), Topoisomerase II (Benson und Huang, 1990) und DHFR (Wade *et al.*, 1992) und zur Steigerung der Konzentrationen der dNTPs (Biron *et al.*, 1986). Trotzdem findet keine Replikation von zellulärer DNA statt (Bresnahan *et al.*, 1996). Das Tumorsuppressorprotein p53 ist hochreguliert (Jault *et al.*, 1995), führt aber nicht zur Apoptose. Mögliche Mechanismen für eine Inaktivierung von p53 sind dessen Sequestrierung in viralen Replikationskompartimenten (Fortunato und Spector, 1998), Interaktion mit IE2 (Bonin und McDougall, 1997) oder die virusinduzierte Überexpression eines zellulären Inhibitors (Allart *et al.*, 2002).

Es wurden mindestens fünf virale Proteine identifiziert, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind (McCormick und Mocarski, 2007). pUL69 (Lu und Shenk, 1999; Hayashi *et al.*, 2000) und IE2 (Wiebusch und Hagemeier, 1999; Murphy *et al.*, 2000) führen zum G<sub>1</sub>/S-Arrest, während pUL82 bei G<sub>0</sub>-Zellen den Wiedereintritt in den Zellzyklus beschleunigt (Kalejta *et al.*, 2003; Kalejta und Shenk, 2003). Die virale Proteinkinase pUL97 phosphoryliert pRB direkt und eine Infektion mit rekombinantem Virus, bei dem UL97 mutiert wurde, führt nicht zur Hyperphosphorylierung von pRB (Hume *et al.*, 2008; Prichard *et al.*, 2008). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass das virale Protein pUL117 über einen MCM-abhängigen Mechanismus in der Lage ist, die zelluläre DNA-Replikation zu inhibieren (Qian *et al.*, 2010). Auf die wichtige Rolle von IE2 bei der Zellzyklusregulation soll im Abschnitt 1.2.5.2 näher eingegangen werden.

In kultivierten Zellen kommt es ab 7–8 Tagen nach Infektion zur Zelllyse (Smith und de Harven, 1973). Zu Natur und Bedeutung der CMV-induzierten Lyse findet sich keine



Literatur. Sampaio *et al.* (2005) zeigten, dass der Austritt von infektiösem Virus aus der intakten Zelle ein recht seltenes Ereignis darstellt, sodass man annehmen kann, dass die Freisetzung von Nachkommen durch Zellyse wichtig für die Virusverbreitung ist.

#### 1.2.4.2. Latenz und Reaktivierung

HCMV verbleibt nach der Erstinfektion bis zu dessen Tode latent im Wirt und ist zur Reaktivierung befähigt (Übersicht in: Sinclair und Sissons, 2006). Virus-DNA findet sich im peripheren Blut in einem geringen Anteil der Monozyten (Taylor-Wiedeman *et al.*, 1991) und in ihren Vorläufern im Knochenmark, den CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen (Mendelson *et al.*, 1996). In diesen Zellen lassen sich jedoch allenfalls geringe Mengen viraler Transkripte nachweisen (Taylor-Wiedeman *et al.*, 1994; Mendelson *et al.*, 1996). Das Virusgenom liegt in den latent infizierten Zellen als ringförmiges Episom vor (Bolovan-Fritts *et al.*, 1999). Es ist unklar, ob – und wenn ja wie – es während der latenten Infektion repliziert wird (Sinclair und Sissons, 2006).

Die Weichenstellung in Richtung lytischer oder latenter Infektion richtet sich wahrscheinlich nach der Expression der IE-Gene unter der Kontrolle des MIEP (siehe auch Abschnitt 1.2.5.1). In nichtpermissiven und latent infizierten Zellen ist der MIEP durch HDAC-vermittelte Mechanismen inaktiviert (Murphy *et al.*, 2002). Differenzieren diese Zellen *in vitro* zu Gewebemakrophagen oder dendritischen Zellen aus, kommt es zur Aufhebung dieser Repression und mit der IE-Genexpression (Taylor-Wiedeman *et al.*, 1994) zur Ausbildung einer lytischen Replikation (Soderberg-Naucler *et al.*, 1997; Reeves *et al.*, 2005).

Neben den CD34<sup>+</sup>-Zellen werden auch bestimmte Endothelzellen (EC) als Orte der Latenz vermutet (Jarvis und Nelson, 2007). Ob es in ECs auch zu persistenter Virusreplikation ohne Zellschädigung kommt, ist umstritten. Fish *et al.* (1998) beschreiben diese, in Widerspruch zu Kahl *et al.* (2000), welche in ECs verschiedenen Ursprungs nur lytische Verlaufsformen beobachtet haben.

### 1.2.5. Der MIE-Lokus

#### 1.2.5.1. Der MIE Promotor-Enhancer

Die Genexpression des MIE-Lokus wird von einem sehr starken *enhancer* getrieben (Boshart *et al.*, 1985). Der MIE-Promotor-*enhancer* (MIEP/E) wird in unterschiedliche aktivierende und reprimierende Abschnitte unterteilt. Eine sogenannte Modulatorregion erstreckt sich von –1150 bis –750 (alle Angaben relativ zum Transkriptionsstartpunkt

## 1. Einleitung

(+1)) (Übersicht in: Meier und Stinski, 1996). Je nach Zelltyp hat sie aktivierende oder reprimierende Wirkung auf die MIE-Genexpression.

Der Bereich von  $-750$  bis  $-550$  wird *unique*-Region genannt. Er enthält Bindungsstellen für NF-1, die jedoch ohne Einfluss auf die Transkription sind. Seine Bedeutung ist daher unklar (Meier und Stinski, 1996).

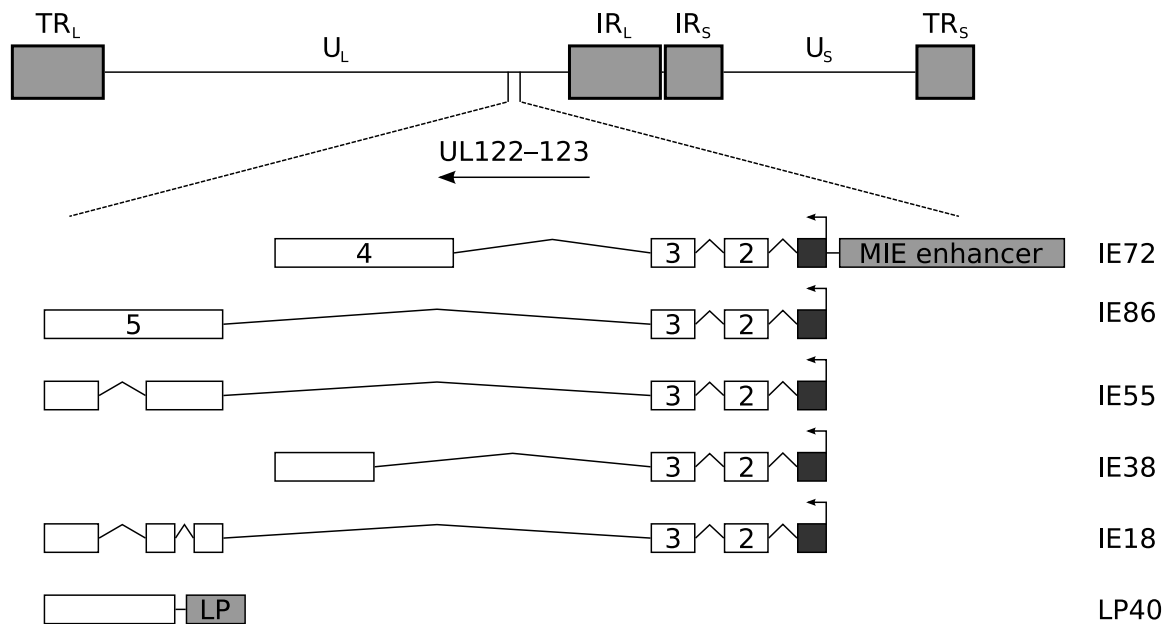
Der *enhancer* befindet sich zwischen den Positionen  $-550$  und  $-39$ , wobei ein distaler Bereich oberhalb von  $-300$  von einem proximalen im Bereich darunter unterschieden wird. Der distale *enhancer* ist bei hoher MOI entbehrlich, er enthält Bindungsstellen für zahlreiche zelluläre Faktoren (CREB/ATF, Sp-1, YY1, ERF, NF- $\kappa$ B, Retinsäurerezeptor, ETS, GAS und *serum response factor*) (Meier und Pruessner, 2000; Stinski und Meier, 2007). Der proximale *enhancer* ist essenziell für die MIE-Genexpression und Virusreplikation. Deletionen werden nur bis Position  $-67$  toleriert, führen jedoch zu einem Wachstumsdefekt, der umso schwerer ausfällt, je weiter proximal deletiert wurde (Isomura *et al.*, 2004). Der minimale *enhancer* (bis  $-67$ ) enthält eine Sp-1-Bindungsstelle, des Weiteren finden sich im proximalen *enhancer* Bindungsstellen für CREB/ATF, C/EBP, NF- $\kappa$ B, AP1, Gfi-1 und Retinsäurerezeptor (Isomura *et al.*, 2004; Stinski und Meier, 2007). Die Bindungsstellen sind größtenteils in sich wiederholenden Elementen angeordnet, die nach ihrer Länge als 18, 19 bzw. 21-bp-*repeats* bezeichnet werden (Boshart *et al.*, 1985). Während die meisten Interaktionen eine positive Wirkung auf die Transkription haben, wirkt die Bindung von YY1, Gfi-1 und ERF reprimierend (Liu *et al.*, 1994; Zweidler-Mckay *et al.*, 1996; Bain *et al.*, 2003). Diese Faktoren finden sich bevorzugt in undifferenzierten Zellen und könnten so die Abhängigkeit der HCMV Replikation von Zelltyp und Differenzierungsgrad erklären. Dazu passt, dass der MIEP/E in nichtpermissiven und latent infizierten Zellen inaktiv (Nelson und Groudine, 1986; Taylor-Wiedeman *et al.*, 1994) und in seiner Chromatinstruktur verändert ist (Murphy *et al.*, 2002). Außerdem ließ sich die reprimierende Wirkung in transienten Transfektionsexperimenten durch Mutation der Bindungsstellen aufheben (Huang *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1987; Shelbourn *et al.*, 1989; Sinclair *et al.*, 1992). Allerdings konnte ein rekombinantes Virus, bei dem große Teile der reprimierenden Bindungsstellen deletiert waren, trotzdem nicht in embryonalen NTera2-Zellen replizieren und zeigte auch keine MIE-Genexpression (Meier, 2001). Nach Eintritt des Virus in die permissive Wirtszelle kommt es zu Veränderungen, die die IE-Genexpression begünstigen (siehe 1.2.4.1). Hierbei spielen auch virale Tegumentproteine eine Rolle. pp71 wirkt transaktivierend auf Promotoren, die CREB und AP1 Bindungsstellen aufweisen, und ppUL35 bindet pp71 und verstärkt dessen Wirkung. pUL69 hat ebenfalls einen positiven Effekt auf den MIEP/E (Liu und Stinski, 1992; Winkler *et al.*, 1994; Schierling *et al.*, 2004).

Auf die wichtige Rolle des MIEP/E bei der Reaktivierung latent infizierter Zellen wurde bereits in Abschnitt 1.2.4.2 eingegangen. Proinflammatorische Zytokine sind an diesem Prozess einerseits durch Stimulation der Zelldifferenzierung, andererseits auch durch die Anwesenheit von spezifischen Bindungsstellen im *enhancer* beteiligt (Übersicht in: Stinski und Meier, 2007).

Der Promotor befindet sich im Bereich von -50 bis +1 (Meier und Stinski, 1996). Er enthält eine TATA *box* (-28 bis -23) (Stenberg *et al.*, 1984) und eine Initiatorsequenz (+1 bis +7), die durch Bindung eines unbekanntes zellulären Faktors verstärkend auf die Expression wirkt (Macias *et al.*, 1996). Zwischen der TATA *box* und dem Transkriptionsstart und überlappend mit dem *footprint* des zellulären Proteins (-16 bis +7) (Macias *et al.*, 1996) befindet sich eine Bindungsstelle für das IE2-Protein. Ihre Position wurde durch Mutationsstudien auf den Bereich -13 bis -1 und durch *footprinting* auf den Bereich -15 bis +2 festgelegt (Liu *et al.*, 1991; Macias *et al.*, 1996). IE2 wirkt über diese, als *cis repressive sequence* (CRS) bezeichnete, Struktur reprimierend auf die MIE-Expression und somit auch auf die eigene Produktion (Pizzorno und Hayward, 1990; Cherrington *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991). Dieser Vorgang wird als Autoregulation bezeichnet (Pizzorno *et al.*, 1988). Er ist unabhängig von der Ausrichtung der CRS, nicht jedoch von ihrer Position. Die CRS (5´ -CGTTTAGTGAACCGT-3´) besteht aus einem A/T-reichen Abschnitt von 10 bp, der beidseits durch ein CG-Dinukleotid begrenzt wird (Cherrington *et al.*, 1991). Die Bindung von IE2 ist abhängig vom Abstand der CG-Dinukleotide und dem A/T-Anteil im Bereich dazwischen, nicht jedoch von der exakten Sequenz dieses Abschnitts (Waheed *et al.*, 1998). Die reprimierende Wirkung von IE2 erstreckt sich auch auf artifizielle Promotoren, in die die CRS rekombinant eingefügt wurde (Cherrington *et al.*, 1991). Im Bereich des MIEP/E befinden sich zwei weitere CRS-ähnliche Sequenzen mit reprimierender Wirkung (Huang und Chen, 2002). IE2 bindet *in vitro* als Homodimer (Chiou *et al.*, 1993; Waheed *et al.*, 1998) an die CRS, dafür sprechen sowohl Ergebnisse aus Experimenten mit dominant negativen IE2-Mutanten als auch der – allerdings unvollkommene – palindromische Aufbau der CRS. Hierbei sollen Interaktionen von IE2 mit der kleinen Furche im A/T-Anteil von essenzieller Bedeutung sein (Lang und Stamminger, 1994; Waheed *et al.*, 1998).

Als Mechanismus für die Autorepression wurde sterische Hinderung der Assemblierung des Präinitiationskomplexes bzw. der Bindung des unbekanntes zellulären Faktors vorgeschlagen (Cherrington *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1993; Macias *et al.*, 1996). In *in vitro* Transkriptionsexperimenten konnten Wu *et al.* (1993) zeigen, dass IE2 tatsächlich den Aufbau des Präinitiationskomplexes hemmt, nicht jedoch die Elongation oder die Reinitiation und dass dies unabhängig von seiner Bindungsfähigkeit für TBP ist (Jupp

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.4.:** Schematische Darstellung der *major immediate-early*-Promotorregion im Kontext des Virusgenoms. IE1 (IE72) und IE2 (IE86) teilen die Exons 2–3 und somit die N-terminalen AS. Der größere, C-terminale Anteil von IE1 besteht aus dem Produkt von Exon 4, während er bei IE2 von Exon 5 translatiert wird. Neben diesen beiden Hauptprodukten sind noch weitere Spleißvarianten der UL122–123-Region aufgeführt, welche nach ihrem Molekulargewicht benannt sind. Von einem internen *late*-Phase-Promotor (LP) wird im Verlauf des Infektionszyklus eine weitere mRNA generiert (LP40). Nach Stinski und Meier (2007).

*et al.*, 1993b,a; Wu *et al.*, 1993). Neuere Studien sprechen jedoch dafür, dass die Auto-repression, zumindest in der *late*-Phase, durch Chromatinmodifikationen des MIEP/E unter direkter Interaktion von IE2 mit Histonmethylasen zustande kommt (Reeves *et al.*, 2006).

Eine intakte CRS ist allerdings nicht nur für die IE2-vermittelte Repression, sondern auch für die MIE-Genexpression Voraussetzung. Bei bestimmten Mutationen der Sequenz kommt es in rekombinantem Virus zur Repression der MIE-Transkription – auch in Abwesenheit von *de novo* Proteinproduktion – und zu Unterschieden in der Zusammensetzung der Spleißprodukte. Rekombinantes Virus mit weitgehend mutierter CRS ist nicht vermehrungsfähig (Isomura *et al.*, 2008).

Vom MIEP werden verschiedene IE- und ein L-Phase-Protein (LP40) exprimiert (siehe Abb. 1.4) (hierzu und zum Folgenden: Stinski und Meier, 2007). Die IE-Genprodukte entstehen durch differenzielles Spleißen aus einer gemeinsamen Prä-mRNA, während LP40 von einem eigenen Promotor innerhalb von Exon 5 transkribiert wird. Die Hauptprodukte sind das IE1- und das IE2-Protein. Auf die Funktionen von IE1 wurde bereits

AS Position	Towne	AD169
68	Arg	Gln
258–264/265	7×Ser	8×Ser
455/456	Lys	Glu
541/542	Thr	Ala

**Tabelle 1.1.:** Unterschiede in der AS-Sequenz von IE2 zwischen den Laborstämmen *Towne* und AD169. Bedingt durch ein zusätzliches Serin im Bereich 258–265 ist das IE2 von AD169 eine AS länger, alle Positionen oberhalb von 264 sind daher um +1 verschoben (Barrasa *et al.*, 2003).

in Abschnitt 1.2.4 eingegangen, IE2 wird im folgenden Abschnitt behandelt. Die weiteren Genprodukte sind nur wenig erforscht. IE38 ist eine um die AS 88–404 verkürzte Form von IE1 und wirkt mit diesem synergistisch auf die Promotoraktivierung, seine Bedeutung ist unklar. IE55 ist bis auf das Fehlen der AS 365–519 identisch mit IE2. Im Gegensatz zu diesem wirkt es jedoch transaktivierend auf den MIEP/E und bindet nicht über die CRS (Baracchini *et al.*, 1992). IE18 ist eine nochmals verkürzte Form von IE55, seine mRNA wird in Fibroblasten nur in Anwesenheit von Proteinsynthesehemmern gefunden, kann jedoch in infizierten Makrophagen nachgewiesen werden (Kerry *et al.*, 1995). Deshalb wurde eine Rolle in der Regulation der differenziellen Proteinexpression in unterschiedlichen Zelltypen postuliert (Kerry *et al.*, 1995).

LP40 (auch als IE2-p40 bezeichnet) besteht aus den C-terminalen 338 AS von IE2 und teilt mit diesem die Fähigkeit zur CRS-vermittelten Unterdrückung der MIE-Expression. Es ist ein *true-late*-Protein, dass in dieser Phase stark exprimiert wird (Puchtler und Stamminger, 1991; Jenkins *et al.*, 1994). In Kooperation mit IE1 hat es auch transaktivierende Wirkung auf einige zelluläre Promotoren (Jenkins *et al.*, 1994). Ein weiteres Genprodukt der Spätphase ist IE2-p60. Beide Proteine sind nicht essenziell (White *et al.*, 2007).

### 1.2.5.2. Das Immediate-early-2-Protein

Das *immediate-early-2*-Protein (IE2, auch als IE(P)86, IE2<sub>579aa</sub> oder (p)pUL122 bezeichnet) ist ein multifunktionales, nukleäres Phosphoprotein und eines der Hauptvirusprodukte in der IE-Phase des lytischen Replikationszyklus. IE2 ist für die Expression von DE-Genen und die Virusvermehrung essenziell (Pizzorno *et al.*, 1991; Marchini *et al.*, 2001; Heider *et al.*, 2002a; Dunn *et al.*, 2003).

Das IE2 Protein besteht aus 579–580 AS. Die beiden hauptsächlich verwendeten Laborstämme von HCMV – *Towne* und AD169 – weisen einige Abweichungen in der Aminosäuresequenz von IE2 auf, welche in Tab. 1.1 aufgeführt sind. In der vorliegenden Arbeit beziehen sich alle angegebenen AS-Positionen, soweit nicht ausdrücklich im *Towne*-Kontext erwähnt, auf den hier verwendeten Stamm AD169.

## 1. Einleitung

Aus der AS-Sequenz für IE2 errechnet sich ein Molekulargewicht von ca. 64 kDa. Im SDS-PAGE zeigt sich jedoch ein davon abweichendes Laufverhalten, dass je nach Zelltyp 82–86 kDa entspricht (Harel und Alwine, 1998). Für diese Diskrepanzen werden unterschiedliche posttranslationale Modifikationen verantwortlich gemacht. Mehrere potenzielle Glykosylierungsstellen wurden vorhergesagt und für verschiedene Serin-, Threonin- und Tyrosinreste konnten Phosphorylierungen durch zelluläre Kinasen nachgewiesen werden (Harel und Alwine, 1998; Barrasa *et al.*, 2005).

Durch kovalente Bindung von Proteinen der sogenannten *small ubiquitin-like modifier*-Familie (SUMO) entstehen IE2-Varianten mit Laufverhalten entsprechend einer Größe von 105 kDa und 120 kDa (Hofmann *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2001).

Die am längsten bekannte und wahrscheinlich wichtigste Funktion des IE2-Proteins ist die Transaktivierung der DE-Genexpression (Hermiston *et al.*, 1987; Staprans *et al.*, 1988). Neben der Aktivierung von viralen Promotoren ist IE2 aber auch ein relativ unspezifischer Transaktivator einer Vielzahl von zellulären Promotoren, sowie von Promotoren anderer Viren (Pizzorno *et al.*, 1988; Malone *et al.*, 1990; Tevethia *et al.*, 1987; Hagemeyer *et al.*, 1992b; Yeung *et al.*, 1993). IE2 hat zwei saure Aktivierungsdomänen (Pizzorno *et al.*, 1991) und interagiert mit vielen zellulären Transkriptionsfaktoren, u. a. den basalen TBP, TFIIB (Hagemeyer *et al.*, 1992a; Jupp *et al.*, 1993b; Caswell *et al.*, 1993) und TAF (Lukac *et al.*, 1997), sowie den sequenzspezifischen CREB (Lang *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1996), Sp-1 (Lukac *et al.*, 1994) und Egr-1 (Yoo *et al.*, 1996). Außerdem interagiert IE2 mit der Histonacetyltransferase P/CAF (Bryant *et al.*, 2000). Dabei könnte es durch Interaktion mit sequenzspezifischen DNA-Bindungsfaktoren einerseits und Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie andererseits eine Rekrutierungsfunktion übernehmen und somit aktivierend wirken (Bryant *et al.*, 2000; Stinski und Meier, 2007).

Im Gegensatz zu IE1 wirkt IE2 reprimierend auf die MIE-Genexpression (Pizzorno *et al.*, 1988). Die zugrunde liegenden Mechanismen wurden bereits im Abschnitt 1.2.5.1 erläutert.

Der Zellzyklusarrest in HCMV infizierten Zellen wird zumindest teilweise durch IE2 verursacht. Mit IE2 transfizierte Zellen zeigen, ebenso wie produktiv infizierte Zellen, ggf. nach Wiedereintritt in den Zellzyklus, einen Arrest am G<sub>1</sub>/S-Übergang. Dieser Arrest konnte in verschiedenen permissiven und nichtpermissiven Zelltypen gezeigt werden (Wiebusch und Hagemeyer, 1999; Murphy *et al.*, 2000). Die Zellen zeigen ein Expressionsprofil von Zellzyklusregulationsproteinen und Enzymen der DNA-Replikation, das weitgehend der S-Phase entspricht, jedoch ohne dass es zur Vermehrung von zellulärer DNA kommt (Wiebusch und Hagemeyer, 2001).

Wie HCMV in die Zellzyklusregelung eingreift wurde in Abschnitt 1.2.4.1 erläutert, IE2 ist auf verschiedenen Ebenen an diesen Vorgängen beteiligt.

IE2 bindet hypophosphoryliertes pRB, ein Mitglied der Familie der *pocket*-Proteine, und diese Bindung führt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F (Hagemeier *et al.*, 1994; Fortunato *et al.*, 1997), welcher im pRB gebundenen Zustand repressiv auf die Transkription seiner Zielgene wirkt. IE2 steigert in transfizierten Zellen die mRNA-Spiegel einer Vielzahl von E2F-responsiven Genen (Song und Stinski, 2002).

Wie bereits erwähnt, führt auch eine Infektion mit UV-inaktivierten HCMV zur Induktion von c-fos und c-myc (Boldogh *et al.*, 1990). Während die Spiegel der Transkripte dieser Protoonkogene in diesem Fall jedoch innerhalb von 120 min wieder auf das Ausgangsniveau absinken, hat IE2 eine lang anhaltende Wirkung auf die Transaktivierung ihrer Promotoren (Hagemeier *et al.*, 1992b). c-Myc und c-Fos, welches als Heterodimer mit c-Jun den Transkriptionsfaktor AP-1 bildet, induzieren wiederum stimulierende Zellzyklusregulationsproteine (Cdc25A, Zyklin D, E, A, Cdk1, Cdk2, Cdk4 und E2F) (Tessema *et al.*, 2004).

IE2 bindet auch direkt an den Zyklin E-Promotor und wirkt dort transaktivierend. Dies ist unabhängig von dessen E2F-Bindungsstellen (Bresnahan *et al.*, 1998). Insgesamt bildet sich in IE2 exprimierenden Zellen ein Zustand aus, der, hinsichtlich der Expression von Zyklinen und der Ausprägung der Cdk-Aktivitäten, weitgehend einem Zustand nach Passieren des sogenannten Restriktionspunkts entspricht (Wiebusch und Hagemeier, 2001). Hierbei ist die von Zyklin E abhängige Kinaseaktivität höher als in sich teilenden, untransfizierten Zellen. Die Aktivität von Zyklin A abhängigen Kinasen ist geringer, die von Zyklin B, E2F und der Phosphorylierungsgrad von pRB sind auf vergleichbarem Niveau, wie in Kontrollzellen. Im Vergleich zu Zellen, die durch Überexpression von p16<sup>INK4a</sup> arretiert wurden, sind alle genannten Aktivitäten und Expressionsniveaus deutlich erhöht. Normalerweise durchlaufen solche Zellen, auch bei Entzug mitogener Faktoren, programmiert die S-Phase und komplettieren die Zellzyklusrunde. Da es trotzdem nur zu einer sehr geringen zellulären DNA-Replikation kommt, sprechen Wiebusch und Hagemeier von einer durch IE2 ausgelösten Dissoziation von DNA-Replikation und Cdk-Aktivität. Sie schlagen einen Wirkmechanismus auf Ebene der DNA-Replikation selbst vor. Tatsächlich konnten Wiebusch *et al.* (2003) im Kontext der viralen Infektion eine Inhibition des sogenannten *replication licensing* demonstrieren.

Zur Interaktion zwischen dem Tumorsuppressorprotein p53 und IE2 und ihrer Auswirkungen auf den Zellzyklus wurden zahlreiche, teilweise widersprüchliche Arbeiten veröffentlicht. Einigkeit herrscht über die Tatsache, dass IE2 an p53 bindet (Speir *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1996; Bonin und McDougall, 1997; Fortunato und Spector, 1998).

## 1. Einleitung

Physiologischerweise ist der p53-Spiegel bei hohem Umsatz des Proteins relativ niedrig (hierzu und zum Folgenden: Levine, 1997). Durch verschiedene Kinasen wird p53 phosphoryliert und damit stabilisiert und aktiviert, der geringere Abbau führt zu insgesamt größeren Mengen an p53 in der Zelle. p53 übt seine Funktion zumindest zu großen Teilen als Transaktivator verschiedener Zielgene aus, hat aber wahrscheinlich auch eine nicht transkriptionelle Wirkkomponente. Die Aktivierung von p53 führt in Abhängigkeit vom Zelltyp und Stimulus entweder zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptoseinduktion. Zu den Zielgenen von p53 gehört auch *mdm2*, dessen Produkt in einer negativen Rückkopplung die p53-Expression hemmt.

Verschiedene Arbeiten zeigen einen Verlust der Transaktivierungsfähigkeit von p53 nach Bindung durch IE2 (Speir *et al.*, 1994), welche durch Kopplung von p53 an eine inhibitorische Domäne von IE2 vermittelt sein könnte (Tsai *et al.*, 1996). Hsu *et al.* (2004) zeigen eine reprimierende Bindung von IE2 an die Histonacetyltransferasedomänen des p53-Kofaktors CBP/p300. Die DNA-Bindungsfähigkeit von p53 wird durch IE2 kaum eingeschränkt (Tsai *et al.*, 1996).

Sowohl in infizierten, wie auch in IE2-transfizierten Zellen ist der p53-Spiegel erhöht (Jault *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006). Hierfür sollen einerseits eine durch IE2 vermittelte Steigerung der Transkription (Muganda *et al.*, 1998), andererseits aber auch eine Stabilisierung von p53 und – damit verbunden – ein verminderter Abbau verantwortlich sein (Castillo *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Für IE2 konnten zwei mögliche Wege der Stabilisierung von p53 gezeigt werden. Erstens kann IE2 p53 an Ser<sub>15</sub> phosphorylieren (Castillo *et al.*, 2005), zweitens wirkt IE2 reprimierend auf die Expression von Mdm2, welches als p53 spezifische Ubiquitinligase den p53-Abbau steigert (Zhang *et al.*, 2006).

Bonin und McDougall (1997) haben publiziert, dass trotz Bindung durch IE2 die Zellzykluskontrollfunktion von p53 erhalten bleibe. In einer stabil IE2 exprimierenden Zelllinie konnte nach Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen ein G<sub>1</sub>-Arrest und eine Erhöhung der Spiegel von p53 Zielgenprodukten gefunden werden. Allerdings wurde später von Murphy *et al.* (2000) gezeigt, dass das IE2 in der von Bonin und McDougall verwendeten Zelllinie mutiert und teilweise funktionsunfähig war.

Ebenfalls besteht Einigkeit darüber, dass IE2 auch in p53-negativen oder Zellen mit funktionsunfähigen p53-Mutanten einen Zellzyklusarrest auslöst (Wiebusch und Hagemeyer, 1999, 2001; Murphy *et al.*, 2000; Song und Stinski, 2005). Arbeiten aus unserem Labor zeigen unabhängig vom p53-Status eine Inhibition der zellulären DNA-Replikation durch IE2, und somit einen Arrest am G<sub>1</sub>/S-Übergang (Wiebusch und Hagemeyer, 2001), während die Ergebnisse von Song und Stinski (2005) diese Inhibition nur in p53<sup>+/+</sup>-Zellen zeigen und es in p53<sup>-/-</sup>- bzw. p53<sup>mut</sup>-Zellen zu einem Arrest in G<sub>2</sub> kommt. Ob



Unterschiede im experimentellen System oder in den verwendeten Zelllinien diese Diskrepanzen erklären können ist unklar. Für letztere Möglichkeit spricht, dass zwar in beiden Gruppen U373-MG-Zellen zum Einsatz kamen, allerdings begründete Zweifel über die Identität dieser Zellen bestehen (siehe Abschnitt 2.6 und Fuxe *et al.*, 2000).

Sowohl Song und Stinski, als auch Noris *et al.* fanden positive Einflüsse von IE2 auf die Expression der Cdk-Inhibitoren (Cdk) p21<sup>CIP1</sup> (Song und Stinski, 2005) und p16<sup>INK4a</sup> (Noris *et al.*, 2002). Die Überexpression dieser Proteine verursacht den Eintritt von Zellen in einen als Seneszenz bezeichneten Zustand, der mit veränderter Morphologie, der Expression charakteristischer Proteine und Zellzyklusarrest verbunden ist. Obwohl p21<sup>CIP1</sup> in infizierten Zellen herunterreguliert ist, kommt es sowohl in diesen, als auch in IE2 transfizierten Zellen zur Expression von Proteinmarkern der Seneszenz (Noris *et al.*, 2002). Welche Bedeutung diese Befunde angesichts der relativ hohen Cdk-Aktivitäten in IE2 exprimierenden Zellen (Wiebusch und Hagemeyer, 2001) haben, ist unklar.

Eine weitere, seit längerem bekannte Funktion von IE2 besteht in der Interaktion mit dem viralen DE-Protein pUL84 (siehe Abschnitt 1.2.4). Diese ist essenziell für die virale DNA-Replikation (Colletti *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004).

Neben den, in ihrem Wirkmechanismus charakterisierten, Apoptoseinhibitoren vMIA und vICA (siehe Abschnitt 1.2.4.1) scheint auch IE2 einen antiapoptotischen Effekt zu haben (Zhu *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1999; Yu und Alwine, 2002). IE2 (und auch IE1) exprimierende HeLa-Zellen zeigten sich resistent gegenüber durch TNF- $\alpha$  und E1B<sub>19kDa</sub>-defiziente Adenoviren ausgelöste Apoptose, nicht jedoch gegenüber solcher durch UV-Bestrahlung (Zhu *et al.*, 1995). (Die Autoren verwendeten eine IE2 stabil exprimierende Zelllinie. Da aber auch in HeLa-Zellen ein Zellzyklusarrest durch IE2 auftritt (Wiebusch und Hagemeyer, 1999) und sich das Gen in einer anderen stabil IE2 exprimierenden Zelllinie als mutiert erwiesen hat (Murphy *et al.*, 2000), scheinen Zweifel an der Intaktheit des von diesen Zellen produzierten IE2 angebracht.)

In transienten Transfektionsexperimenten mit glatten Muskelzellen zeigt IE2 einen Schutz vor Apoptose durch p53-Überexpression und p53-Aktivierung durch Doxorubicin (Tanaka *et al.*, 1999). In beiden Fällen führt IE2, nicht jedoch IE1, dass sogar proapoptotisch wirkt, zu einer Reduktion der p21<sup>CIP1</sup>-Antwort und einer deutlichen Verringerung der apoptotischen Zellen. Schließlich können sowohl IE2, als auch IE1, die Apoptose in ts13-Zellen inhibieren (Yu und Alwine, 2002). Diese temperatursensitive Hamsterfibroblastenlinie zeichnet sich durch einen TAF-vermittelten Transkriptionsdefekt und folgend Zellzyklusarrest und Apoptose bei nichtpermissiver Temperatur aus. Die MIE-Proteine verhindern, durch Aktivierung von Akt mittels des PI-3-Kinase Weges, die Apoptose, nicht jedoch den Zellzyklusdefekt.

## 1. Einleitung

Außerdem ist IE2 auch an der Immunmodulation nach HCMV-Infektion beteiligt. Werden Zellen mit UV-inaktiviertem oder im IE2-Gen mutierten Virus infiziert, kommt es zu einer deutlichen Induktion von IFN- $\beta$  und einer Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen (u. a. RANTES, MCP-2, MIG, MIP-1 $\alpha$  und IL-8). Das Wildtypvirus mit intakter IE2-Expression kann diese Genexpression unterdrücken (Taylor und Bresnahan, 2006b). Die IFN- $\beta$ -Repression kommt durch Inhibition der Bindung von NF- $\kappa$ B an den IFN- $\beta$ -Promotor zustande (Taylor und Bresnahan, 2006a).

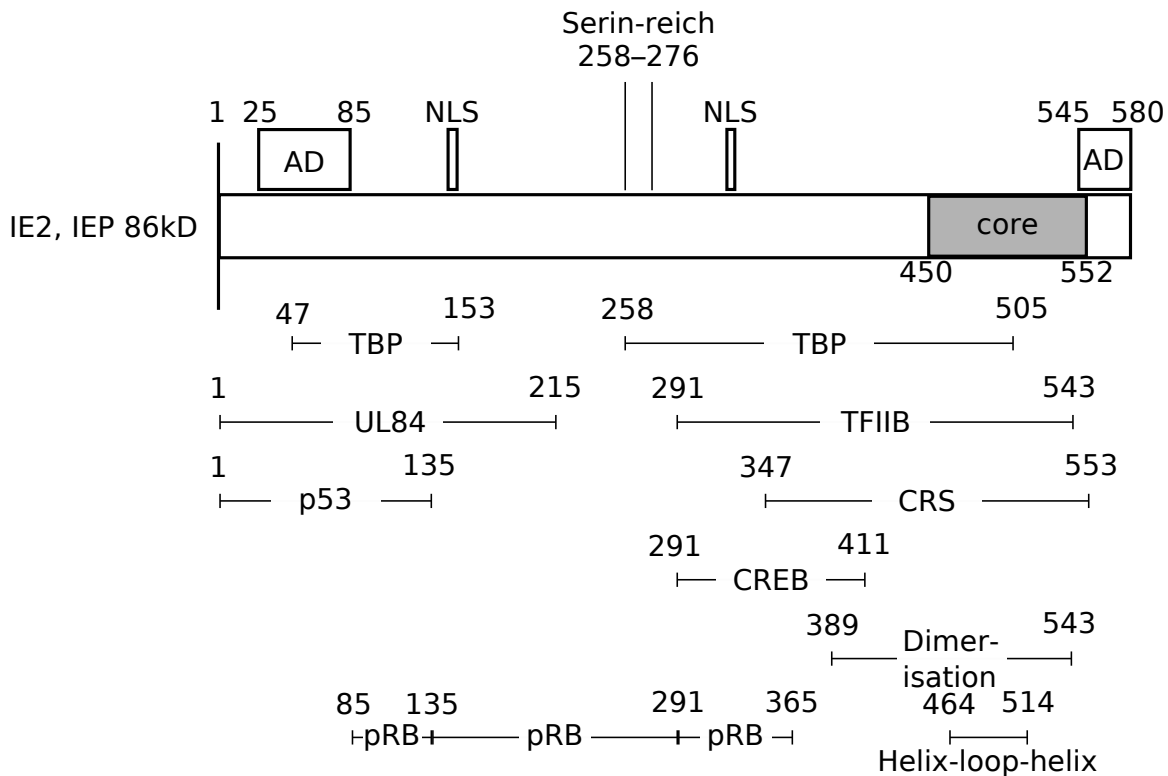
IE2 ist neben IE1 auch an der Ausbildung der viralen Replikationskompartimente an den, als ND10 bezeichneten, nukleären Strukturen beteiligt (Ahn und Hayward, 1997). An diesen Strukturen kolokalisieren früh die MIE-Proteine mit einem Teil der Virusgenome, die in infektiösen Virionen in die Zelle gelangt sind und dort findet auch die MIE-Transkription statt (Ishov *et al.*, 1997). Später bilden sich an deren Rand virale Replikationskompartimente aus, die neben den viralen DNA-Replikationsproteinen auch IE2 enthalten (Ahn *et al.*, 1999). IE2 ist auch ohne IE1 in der Lage, an diesen Regionen zu akkumulieren, führt in Gegensatz zu diesem jedoch nicht zur Freisetzung der dort gebundenen, zellulären Faktoren (Ahn *et al.*, 1998b).

### Struktur Funktionsanalyse

Die Bedeutung und Vielfältigkeit der IE2-Funktionen hat zu einer ausgiebigen Erforschung der IE2-Struktur-Funktionsbeziehungen geführt. Hauptsächlich durch Deletions- und Mutationsstudien konnten verschiedenen Proteinregionen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden (Stinski und Meier, 2007). Da sich diese allerdings in vielen Bereichen überlappen, ist es bisher nur teilweise gelungen, einzelne Funktionen isoliert betrachten zu können. Eine Übersicht einiger bisher eingegrenzter funktionaler Regionen ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

Das Protein enthält zwei unabhängige, saure Aktivierungsdomänen (25–85 und 545–580) (Malone *et al.*, 1990; Pizzorno *et al.*, 1991). Die nukleäre Lokalisation wird durch zwei Sequenzen (*nuclear localization signal*, NLS) vermittelt (145–151 und 322–329) (Pizzorno *et al.*, 1991). Für die Repression des MIEP ist die C-terminale Hälfte des Proteins ausreichend (Pizzorno *et al.*, 1991; Macias und Stinski, 1993). Die für die CRS-Bindung erforderliche Region konnte weiter eingegrenzt werden: N-terminal liegt ihre Grenze bei AS 347 (Waheed *et al.*, 1998), C-terminal bei AS 553 (Macias *et al.*, 1996), allerdings war in einem *yeast one hybrid*-Experiment der Bereich von 314–519 erforderlich und ausreichend (Ahn *et al.*, 1998a).

Für verschiedene Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusregulatoren wurden auf IE2 Bindungsstellen identifiziert. Die TBP-Bindungsregion wurde von Jupp *et al.* (1993b) auf



**Abbildung 1.5.:** Schematische Darstellung des *immediate-early 2*-Proteins. Modifiziert nach Stinski und Meier (2007). Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf den Stamm AD169.

die Region 47–153 festgelegt, während Caswell *et al.* (1993) sie für die AS 258–505 gezeigt haben und sogar eine Steigerung der Bindungsfähigkeit nach Deletion des N-Terminus beschreiben. Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich evtl. durch Unterschiede im experimentellen System erklären. Von Jupp *et al.* wurde die Fähigkeit verschiedener IE2-Mutanten einen Komplex aus TBP und DNA im EMSA zu beeinflussen ausgewertet, während Caswell *et al.* die Bindungsfähigkeit von GST-Fusionsproteinen in Abwesenheit von DNA untersucht haben. TFIIB bindet im Bereich 291–543 (Caswell *et al.*, 1993), für CREB wurde der Bereich 291–411 als minimale Bindungsregion identifiziert (Lang *et al.*, 1995), für Egr-1 der Bereich 347–580 (Yoo *et al.*, 1996). Die stärkste pRB-Bindungsfähigkeit findet sich in der Region 292–365 (Hagemeier *et al.*, 1994; Sommer *et al.*, 1994), schwächer binden die Regionen 85–135 und 136–291 (Sommer *et al.*, 1994). Das p53 Protein wird über die AS 1–135 gebunden (Hsu *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 1996). Für die Bindung der Histonacetyltransferase (HAT) P/CAF wird der Bereich von 291–541 benötigt (Bryant *et al.*, 2000), während CBP über die Region 492–580 gebunden wird (Hsu *et al.*, 2004). Für die Repression der HAT-Aktivität von CBP ist eine Domäne von 1–98

## 1. Einleitung

erforderlich (Hsu *et al.*, 2004). IE2 interagiert mit Histondeacetylasen und Histonmethyltransferasen über die C-terminale Hälfte (Reeves *et al.*, 2006). Das virale Protein pUL84 (siehe Abschnitt 1.2.4) bindet an ein N-Terminales Fragment, das sich bis AS 215 erstreckt (Colletti *et al.*, 2004).

Mithilfe von *yeast two hybrid*-Experimenten wurde die Dimerisierungsdomäne auf den Bereich 389–543 festgelegt (Ahn *et al.*, 1998a).

Verschiedene Sekundärstrukturmodule wurden durch Analysen der AS-Sequenz vorhergesagt: Ein Cystein-Histidin-Zinkfinger (429–453) und ein *helix-loop-helix*-Motiv (464–514) (Macias und Stinski, 1993; Furnari *et al.*, 1993). Während verschiedene Punktmutanten der potenziellen Zinkfingerdomäne zu einem Verlust der DNA-Bindungs-fähigkeit führen (Macias und Stinski, 1993; Yeung *et al.*, 1993), bleibt eine Deletion des kompletten Bereichs ohne Folgen für diese Funktion (Asmar *et al.*, 2004).

Ab AS 258 folgen acht (bzw. sieben bei *Towne*) Serine aufeinander und bis zur AS 276 befinden sich noch sechs weitere. Diese serinreiche Region wird durch die zelluläre Proteinkinase CKII *in vitro* phosphoryliert und die TBP-Bindungs-fähigkeit wird hierdurch inhibiert (Barrasa *et al.*, 2005). Mutationen in diesem Bereich gehen mit einer Reduktion der Phosphorylierbarkeit, einer Steigerung der TBP-Bindungs-fähigkeit (nach CKII-Phosphorylierung) und auch der Transaktivierungsaktivität einher. Substitution aller Serine in diesem Bereich ergeben ein lebensfähiges Virus, allerdings mit verlangsamtem Wachstum. Werden nur die Serine im Bereich 272–276 ersetzt, wächst das rekombinante Virus in der Early-Phase schneller als Wildtyp, während Mutationen der Serine in den Bereichen 258–264 und 267–270 zu stark verlangsamtem Viruswachstum führen.

Weitere Phosphorylierungsstellen bilden die Tyrosine 27 und 233, sowie die Serine 144 und 234 (Harel und Alwine, 1998). Auch hier führen Mutationen zu gesteigerter Transaktivierung in Transfektionsstudien (Harel und Alwine, 1998). Ein rekombinantes Virus mit diesen Mutationen zeigt allerdings keine Unterschiede zu Wildtypvirus hinsichtlich Wachstum und Transaktivierung von viralen Promotoren, lediglich der SV40-Promotor wird früher und stärker aktiviert (Heider *et al.*, 2002b).

Eine Mutation des Cytosins an Position 510 zu Glycin führt zu einer temperatursensitiven Virusmutante. Diese zeigt bei nichtpermissiver Temperatur einen Defekt der DE- und L-Genexpression und fehlendes Wachstum (Heider *et al.*, 2002a).

Eine Doppelmutation der Lysinreste an den Positionen 175 und 180 führt dazu, dass IE2 nicht mehr kovalent an SUMO gebunden wird. Es kommt hierdurch zu einer drastischen Reduktion der Transaktivierungsfähigkeit für zwei bekannte virale, IE2-abhängige Promotoren (Hofmann *et al.*, 2000). Erstaunlicherweise ist ein rekombinantes Virus mit

dieser Mutation in seinem Wachstum in Zellkulturfibroblasten kaum gegenüber wt-Virus eingeschränkt (Lee und Ahn, 2004).

Virusmutanten in den Bereichen 357–360, 428–436 (potenzieller Zinkfinger) und 506–512 (potenzielle *helix-loop-helix*-Domäne) sind nicht vermehrungsfähig und zeigen Defekte in der Regulation der Genexpression. Während die Erstere in der Lage ist, virale DE-Proteine zu exprimieren, zeigen die Letzteren keine DE-, jedoch eine unzeitige Expression einiger L-Phase-Proteine. Alle zeigen mehr oder weniger ausgeprägte Defekte der Autoregulation (White *et al.*, 2004).

Die IE2-Proteine der beiden meistverwendeten Laborstämme von HCMV weisen einige Unterschiede in ihrer Transaktivierungsaktivität auf, diese ist bei AD169 stärker ausgeprägt als beim *Towne*-Stamm. Eine isolierte Betrachtung der abweichenden AS ergab eine Steigerung der Transaktivierung und SUMOylierung durch Mutation des Threonins an Position 541/542 zu Alanin. Eine Substitution von Alanin zu Threonin an Position 463 (entspricht 464 in AD169) hatte einen negativen Effekt auf diese Funktionen (Barrasa *et al.*, 2003).

Eine Mutation von Glutamin zu Arginin der Position 549 führt in rekombinantem Virus zu einem stark verlangsamten Wachstum. Die Transaktivierungsfähigkeit ist weitgehend erhalten, von den untersuchten viralen Promotoren ist nur UL54 etwas mehr als 2-fach gegenüber Wildtyp reduziert. Die Autorepression ist ebenso erhalten. Jedoch ist die Zellzyklusarrestfunktion aufgehoben und es kommt in den infizierten Zellen zur zellulären DNA-Replikation (Petrik *et al.*, 2006).

Eine Virusmutante mit Substitution des Prolins 536 und des Tyrosins 538 zu Alaninen zeigt einen Defekt der Transaktivierung bei erhaltener Autoregulation und ist nicht lebensfähig (Petrik *et al.*, 2007).

In einer systematischen Mutagenese des C-Terminus, in der sowohl Transaktivierung, Autorepression, DNA-Bindung und Zellzyklusarrestfunktionen parallel untersucht wurden, konnte eine etwa 100 AS umfassende *core*-Domäne im Bereich 450–552 identifiziert werden. Diese zeichnet sich durch eine absolute Sensitivität gegenüber Mutationen, dahin gehend, dass sämtliche untersuchten Funktionen drastisch reduziert waren, aus (Asmar *et al.*, 2004). Lediglich die Zellzyklusarrestfunktion war in einer Deletionsmutante von AS 470–489 noch teilweise erhalten. Mutationen im sich daran nach N-terminal anschließenden Bereich hatten zwar ebenfalls Einfluss auf die IE2-Funktionen, allerdings wurde dort keine einzelne Funktion vollständig aufgehoben (Asmar *et al.*, 2004).

### 1.3. Fragestellung der Arbeit

Das multifunktionale IE2-Protein nimmt in vielerlei Hinsicht eine Schlüsselposition – zumindest für die Frühphase der HCMV-Infektion – ein. Es ist essenziell für die Virusreplikation (Heider *et al.*, 2002a), wobei besonders viele Funktionen auf den C-Terminus des Proteins angewiesen sind. In diesem Bereich überlappen die bekannten und teilweise erst grob kartierten funktionellen Domänen, insbesondere in dem ca. 100 AS umfassenden Bereich, der als *core*-Domäne bezeichnet wird (Asmar *et al.*, 2004). Dieser Teil des Proteins ist auch der am stärksten zwischen verschiedenen  $\beta$ -Herpesviren konservierte (Barrasa *et al.*, 2003). Mit der Arbeit von Asmar *et al.* sollten die Struktur-Funktionsbeziehungen in diesem Bereich aufgeklärt werden und einzelne Funktionen voneinander abgegrenzt werden. Allerdings zeigte sich, dass auch schon relativ subtile Substitutionsmutationen im *core*-Bereich einen Verlust aller untersuchten Funktionen zur Folge hatten, sodass die Frage, ob sich einzelne Funktionen in diesem Bereich diskriminieren lassen, offenblieb. Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es deshalb sein, durch kleinstmögliche Veränderungen, nämlich durch Punktmutationen einzelner Aminosäuren, diesen Bereich weiter aufzuklären. Auch in dieser Arbeit sollten sämtliche erzeugten Proteinmutanten hinsichtlich der wesentlichen IE2-Funktionen untersucht werden, nämlich der Transaktivierung von viralen und zellulären Promotoren, der Repression des MIEP, der Bindung an die CRS und der Zellzykluskontrolle. Zur bestmöglichen Vergleichbarkeit untereinander, aber auch mit den Ergebnissen von Asmar *et al.*, wurden sämtliche Funktionen im gleichen experimentellen System, der Expression von IE2 in transient transfizierten, viruspermissiven U373-MG-Zellen untersucht. Lediglich für die Gewinnung von Zellextrakten für die *in vitro* DNA-Bindungsexperimente wurde auf HeLa-Zellen zurückgegriffen. Bei der Auswahl der vielversprechendsten Kandidaten für die Mutagenese wurde die Sequenzhomologie zwischen den IE2 entsprechenden Proteinen verschiedener  $\beta$ -Herpesviren ausgewertet und zunächst insgesamt 52 Einzelpositionen ausgewählt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Allgemeine Materialien und Geräte

#### Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Merck KGaA, Darmstadt
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

#### Lösungen

(Sambrook *et al.*, 1989)

##### BBS (2-FACH)

50 mM BES  
280 mM NaCl  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
eingestellt auf pH 6,95

##### PBS

8,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
137 mM NaCl  
3 mM KCl

##### TE (pH 8,0)

10 mM Tris · Cl (pH 8,0)  
1 mM EDTA (pH 8,0)

##### TBS 10 mM Tris · Cl (pH 7,5)

150 mM NaCl

##### TTBS

10 mM Tris · Cl (pH 7,6)  
9 g/l NaCl  
0,1% Tween 20

##### TBE 90 mM Tris

90 mM Natriumborat  
10 mM EDTA (pH 8,0)

##### RNAse A

10 mg/ml  
10 mM Tris · Cl (pH 7,5)

15 mM NaCl

Die Lösung wird 15 min auf 100 °C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Lagerung bei -20 °C.

## 2. Material und Methoden

### PROTEASEINHIBITOREN

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

- Aprotinin 2 mg/ml
- Pefabloc 100 mM
- Leupeptin 10 mg/ml
- Pepstatin 1 mM in Methanol

Die Stammlösungen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und 1:1000 verdünnt eingesetzt.

### WASSER

Soweit nicht anders angegeben, wurde stets doppelt destilliertes Wasser verwendet.

### Plasmide

#### IE2-EXPRESSIONSKONSTRUKT

pSG5-3HA-IE2, pSG5-Vektor mit der vollständigen cDNA von IE2 (AD169) und dreifachem Hämagglutinin-Epitop.

#### IE2 (1–450)

pSG5-3HA-IE2 (1–450), wie pSG5-3HA-IE2, jedoch mit einer verkürzten Form der IE2-cDNA

#### LEERVEKTOR

pSG5, Stratgene, La Jolla, CA

Die IE2-Plasmide wurden in früheren Experimenten in der Arbeitsgruppe hergestellt (Wiebusch und Hagemeyer, 1999). Weitere verwendete Plasmide werden in den betreffenden Abschnitten erklärt.

### Andere Materialien

#### ZENTRIFUGEN

- Beckman GS-15R
- Beckman GS-6R (Rotor GH 3.8)
- IEC MicroMax
- Sorvall Evolution RC
- Sorvall RC 3B Plus (Rotor H-6000A)

#### SONIZIERER

Vibra Cell, Sonics & Materials Inc., Danbury, Connecticut

#### RÖNTGENFILM

X-Omat Blue XB-1, Eastman Kodak Company, Rochester, NY

#### SCHÜTTLER

(temperiert) Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg



## 2.2. Bakterien-Transformation

### Material

#### ESCHERICHIA COLI

XL1-Blue, Stratagene, La Jolla, CA

#### 2×YT-MEDIUM

16 g/l Bacto-Trypton

10 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

soweit nicht anders angegeben, wurden dem fertigen Medium unmittelbar vor der Verwendung 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

#### AMPICILLIN-STAMMLÖSUNG

100 mg/ml Ampicillin

in 50 % Ethanol

#### 2×YT-AMPICILLIN (AMP)-AGAR-PLATTEN

wie 2×YT-Medium

+ 15 g/l Agar

nach dem Autoklavieren wurden dem ca. 50 °C warmen Medium 100 mg/l Ampicillin zugegeben. Die Mischung wurde in sterile Kunststoffpetrischalen gegossen. Die Platten wurden nach dem Erstarren des Agars bei 4 °C gelagert.

#### ELEKTROPORATION

Gene Pulser<sup>®</sup>, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, mit *Pulse-Controller*-Einheit

### Durchführung

Zur Vermehrung der Plasmide, sowie zur Selektion der mutierten Konstrukte (siehe 2.4), kamen *Escherichia coli* des Stamms XL1-Blue zum Einsatz. Die Transformation der Bakterien erfolgte durch Elektroporation (Miller *et al.*, 1988; Dower *et al.*, 1988). Die *E. coli* wurden entsprechend den Empfehlungen in der Bedienungsanleitung des Gene Pulser elektrokompent gemacht und bei –80 °C gelagert.

50–80 µl der elektrokompenten Bakterien wurden vorsichtig aufgetaut und auf Eis gelagert. Unmittelbar vor der Elektrotransformation wurden 1–2 µl der jeweiligen DNA-Präparation zugegeben. Für Retransformationen wurden die hochkonzentrierten DNA-Lösungen zuvor 1:1 000 verdünnt. Die Mischung wurde in vorgekühlte 2 mm-Elektrotransformationküvetten überführt und mit folgenden Einstellungen transformiert: 2500 V, 25 µF, *Pulse Controller*: 200 Ω.

Unmittelbar danach wurden die Zellen zur Erholung in 300 µl frischem 2×YT-Medium ohne Ampicillin ca. 1 h im Schüttelinkubator (37 °C, 150 r/min) inkubiert. Danach wurde sie auf 2×YT-Medium-Agar ausplattiert und über Nacht im Brutschrank gezogen.

Kulturen von den Platten wurden entweder sofort abgenommen und weiterverarbeitet, oder die Platten wurden mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 4 °C gelagert.

## 2.3. Plasmidpräparation

### Material

(Sambrook *et al.*, 1989)

#### ULTRAZENTRIFUGE

Beckman Optima TLX

#### LÖSUNG I

50 mM Glukose

10 mM EDTA (pH 8,0)

25 mM Tris · Cl (pH 8,0)

#### LÖSUNG II

2 N NaOH

1 % (v/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

#### LÖSUNG III

3 M Kaliumacetat

11,5 % (v/v) Eisessig

#### ETHIDIUMBROMID-STAMMLÖSUNG

10 mg/ml, Carl Roth GmbH & Co. KG,

Karlsruhe

Die Plasmidpräparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Bei der Präparation im großen Maßstab wurde zur Herstellung einer Plasmidpräparation, die sich für die Transfektion in eukaryote Zellen eignet, eine Aufreinigung der Plasmide durch Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Dichtegradienten durchgeführt (Radloff *et al.*, 1967). Ein solcher Dichtegradient bildet sich innerhalb einiger Stunden in der Ultrazentrifuge in einer Cäsiumchlorid-Lösung aus. Da die Plasmid-DNA *supercoiled* vorliegt, bindet sie weniger zugesetztes Ethidiumbromid und nimmt eine vom Rest der DNA getrennte Bande im Gradienten ein. Diese ist durch das Ethidiumbromid schon bei Tageslicht deutlich sichtbar und kann einzeln abgezogen werden.

### 2.3.1. Plasmidpräparation in kleinem Maßstab

Zur Plasmidpräparation in kleinem Maßstab wurde eine 2 ml-Kultur im Reagenzglas mit einer Einzelkolonie einer Agarplatte beimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (37 °C, 200 r/min) vermehrt.

1,5 ml der Kultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien in der Tischzentrifuge bei 12 000 g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde gründlich abgesaugt und verworfen.

Die Pellets wurden in 100 µl kalter Lösung I durch starkes Vortexen resuspendiert. Sodann wurden 200 µl frisch hergestellter Lösung II hinzugegeben. Der Inhalt der Reak-

tionsgefäße wurden durch fünfmaliges Hin- und Herkippen schonend durchmischt und die Röhrchen auf Eis gelagert.

Zuletzt wurden 150 µl eiskalter Lösung III zugefügt und durch Vortexen des auf dem Deckel stehenden Reaktionsgefäßes mit dem viskösen Inhalt vermischt.

Es folgte eine weitere Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 12000 g für 5 min. Dadurch wurden die chromosomale DNA und die bakteriellen Proteine und Zellbestandteile pelletiert, während die Plasmide im Überstand verblieben. Dieser wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit dem doppelten Volumen Ethanol vermischt. Zur Fällung der DNA wurden die Röhrchen 2 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor sich eine Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C anschloss. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet mit kaltem Ethanol (70 %) gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Jedes Pellet wurde in 25 µl TE aufgelöst. Zum Abbau der noch enthaltenen RNA wurde dem TE 20 µg/ml DNase freie RNase zugesetzt.

#### 2.3.2. Plasmidpräparation in großem Maßstab

Zunächst wurden 500 ml 2×YT-Medium in einem 2 l-Kolben mit 2 ml einer Vorkultur inokuliert. Die Vermehrung der Bakterien erfolgte über Nacht im Schüttelinkubator (37 °C, 200 r/min).

Zur Ernte wurden die Zellen bei 3565 g in der Sorvall RC-3B Zentrifuge 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 30 ml Lösung I resuspendiert. Hierzu wurde die Lösung so lange mit einer 25 ml Pipette auf und ab gepumpt, bis sich das Pellet vollständig gelöst hatte. 60 ml frisch angesetzter Lösung II wurden hinzugegeben und durch vielfaches Hin- und Herkippen der Zentrifugenflaschen deren Inhalt durchmischt.

Dann wurden 30 ml der eiskalten Lösung III zugesetzt und gründlich gemischt. Es folgte eine 15-minütige Inkubationspause auf Eis. Dem schloss sich eine Zentrifugation der Mischung in derselben Zentrifuge bei 4660 g und 4 °C über 15 min an.

Der Überstand wurde durch vier Lagen Mull in ein neues Gefäß filtriert, um nicht pelletierte aber ausgefallene Bestandteile zurückzuhalten.

Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe des ca. 0,6-fachen Volumens Isopropanol und 30 min Inkubation bei Raumtemperatur ausgefällt und im Sorvall GSA-Rotor bei 6500 g und 4 °C herunterzentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Pellets mit 15 ml Ethanol gewaschen. Das von flüssigen Rückständen befreite Pellet wurde in 3,5 ml TE (pH 8,0) vollständig

## 2. Material und Methoden

gelöst und in ein 15 ml-Probenröhrchen überführt, in welchem 4,3 g Cäsiumchlorid vorgelegt waren. Das Cäsiumchlorid wurde durch Kippen der Röhrchen vollständig zur Lösung gebracht und die Röhrchen mit TE auf ein Gesamtvolumen von 4 ml aufgefüllt. Diesem wurde dann 400 µl Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und erneut sanft gemischt.

Dabei ausfallende Substanzen wurden durch Zentrifugation in der Beckman GS-6R Zentrifuge bei 2800 g 5 min pelletiert. Aus dem Überstand wurde ein OptiSeal™-Röhrchen (Beckman) bis zum Verschluss gefüllt.

Die OptiSeal™-Röhrchen wurden sorgfältig verschlossen und ausgewogen, bevor sie im Rotor TLA100.4 bei 75 000 r/min (235 000 g) und Raumtemperatur in der Ultrazentrifuge für mindestens 14 h zentrifugiert wurden.

Nach der Zentrifugation sind in den Röhrchen zwei Banden sichtbar. Die Obere enthält chromosomale DNA sowie relaxiertes Plasmid, die Untere *supercoiled* Plasmid-DNA. Mittels Injektionsnadeln und Spritzen wurde, um Kontaminationen zu vermeiden, zunächst die obere Bande abgezogen und entsorgt, bevor im zweiten Schritt die eigentliche Plasmid-Bande gewonnen wurde. Diese wurde in ein 15 ml-Probenröhrchen gegeben.

Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde der Lösung ca. 7 ml TE gesättigtes Butanol zugegeben und gründlich gemischt. Die organische Phase wurde abgezogen und entsorgt. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. War die wässrige Phase farblos, so wurde noch eine letzte Extraktion vorgenommen, bevor sie auf ein Volumen von 6,75 ml aufgefüllt wurde. Die Lösung wurde in neue Zentrifugenröhrchen überführt und 0,75 ml 3 M Natriumacetat (pH 5,2) sowie 22,5 ml eiskaltes Ethanol hinzugegeben. Die Glasröhrchen wurden mit Parafilm abgedeckt und mehrmals hin- und hergekippt um den Inhalt zu durchmischen. Wenn kein Niederschlag sichtbar war, wurden die Röhrchen zur weiteren Fällung der DNA für 60 min bei -20 °C stehen gelassen.

Es folgte eine Zentrifugation im Sorvall HB-6 Rotor (16 000 g, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Pellet mit Ethanol gewaschen, dann 15 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Je nach Größe des Pellets wurde dieses in 500–1500 µl TE gelöst und dann in Portionen von je 500 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine weitere Fällung mit jeweils 55 µl Natriumacetat und 1 ml eiskaltem Ethanol. Die Zentrifugation erfolgte in der Tischzentrifuge bei 9300 g für 5 min. Das Pellet wurde erst mit Ethanol (70 %), dann mit Ethanol (100 %) gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Das Pellet wurde wiederum je nach Größe in 100–1000 µl TE aufgenommen und über Nacht im Schüttler vollständig aufgelöst.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion bei 260 nm bestimmt und durch Zugabe von TE auf 1 mg/ml gebracht. 250 ng der Präparation wurden zur Kontrolle der Plasmidgröße und Qualität auf einem Agarosegel (0,6 %) aufgetrennt, wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben.

Ein Teil der Lösung wurde zum alsbaldigen Verbrauch bei 4 °C gelagert, der Rest bei –20 °C eingefroren.

## 2.4. Mutagenese

Zur Erstellung der mutierten IE2-Expressionskonstrukte kam die Kunkel-Methode (Kunkel, 1985) zur gerichteten Mutagenese zum Einsatz, wie in Hagemeyer (1996) beschrieben. Bei dieser Methode wird die Veränderung über ein synthetisches Oligonukleotid erzeugt, das an die entsprechende Stelle einer Einzelstrang-DNA bindet. Mithilfe einer DNA-Polymerase wird dieser dann *in vitro* zum Doppelstrang ergänzt. Dieses Konstrukt besteht dann aus je einem Einzelstrang mit der Wildtyp- und einem mit mutierter Sequenz. Um eine Selektion zu ermöglichen, erfolgt hierbei die Verwendung eines uracilhaltigen Einzelstrangs.

Der uracilhaltige Einzelstrang wird durch Vermehrung des verwendeten Plasmids in *E. coli* des Stammes RZ1032 erzeugt. Diesem fehlt zum einen das Enzym dUTPase (*dut*<sup>-</sup>), zum anderen das Enzym Uracil-N-Glykosylase (*ung*<sup>-</sup>). Das Fehlen des Enzyms *dut* führt zu einer erhöhten Konzentration von dUTP und dessen Einbau in die DNA anstelle von dTTP. Das Fehlen des Enzyms *ung* verhindert, dass solchermaßen inkorporiertes Uracil wieder entfernt wird. Plasmide, die in einem *dut*<sup>-</sup> *ung*<sup>-</sup> Bakterienstamm vermehrt werden, enthalten also zu einem geringen Prozentsatz Uracil.

Durch das Verwenden eines Plasmids, das einen Phagen-Replikationsursprung enthält, kann mithilfe eines Helferphagen relativ einfach einzelsträngige DNA gewonnen werden.

Die *in vitro* erzeugten doppelsträngigen Plasmide werden dann in einen *ung*<sup>+</sup> *E. coli* Stamm transformiert. Die funktionsfähige Uracil-N-Glykosylase führt dort zu einer Selektion der nicht uracilhaltigen Tochterstränge des Konstrukts.

### Material

#### HELFERPHAGE

R408, Promega Corporation, Madison, Wisconsin

#### dNTPs

dNTP Set, Amersham Biosciences, Little Chalfont

## 2. Material und Methoden

ATP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	10×LIGASEPUFFER	660 mM Tris-HCl, pH 7,5
T4-DNA-POLYMERASE	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA		50 mM MgCl <sub>2</sub>
			50 mM Dithiothreitol (DTT)
T4-DNA-LIGASE	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	PEG-AMMONIUMACETAT	3,5 M Ammoniumacetat
			20 % (w/v) Polyethylenglykol 8000 (PEG)
T4-POLYNUKLEOTIDKINASE	Fermentas, Vilnius		pH 7,5
10×KINASEPUFFER		RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts
	500 mM NaCl		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
	100 mM Tris-HCl, pH 7,4		
	100 mM MgCl <sub>2</sub>		
10×ANNEALING-PUFFER		OLIGONUKLEOTIDE	siehe Tabelle A.1 im Anhang
	500 mM NaCl		
	100 mM Tris-HCl, pH 8,0		
	100 mM MgCl <sub>2</sub>		
	50 mM Dithiothreitol (DTT)		

### Durchführung

**Einzelstrangpräparation** Zunächst wurden 50 µl elektrokompetenter *E. coli* RZ1032 wie beschrieben mit dem wt-IE2-Expressionskonstrukt pSG5-3HA-IE2 transformiert und auf 2×YT-Ampicillin-Agarplatten selektiert.

Mit einer Kolonie wurde eine 2 ml-Übernacht-Kultur 2×YT-Medium angeimpft. 0,5 ml dieser Kultur wurde zu 25 ml frischem 2×YT-Medium gegeben und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 r/min bis zur OD<sub>600</sub> von ca. 0,2 gezogen. Nach Zugabe von 50 µl Phagen-Stammlösung wurde die Inkubation bei gleicher Temperatur und 300 r/min für 5–6 h fortgesetzt. Die Lösung wurde auf 15 1,5-ml-Reaktionsgefäße verteilt und die Bakterien in der Tischzentrifuge (5 min, 11 000 g) pelletiert.

Jeweils 1 ml des Überstandes wurde in ein neues Reaktionsgefäß, in dem 3,75 ml PEG-Lösung in 3,5 M Ammoniumacetat vorgelegt wurden, überführt und durch kurzes Vortexen gemischt. In dieser Lösung wurden die Phagen 20 min bei Raumtemperatur präzipitiert und dann bei 4 °C und 11 000 g für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde gründlich abgezogen und verworfen. Danach wurden das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 1,5 ml TE gelöst. Zur Elimination verbliebener Proteine wurde nach-

einander mit je 2,25 ml Phenol und Chloroform : Isoamylalkohol extrahiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgezogen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetat und dem doppelten Volumen eiskalten Ethanol vermischt. Die DNA wurde über 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Danach erfolgte erneut eine Zentrifugation (16000 g, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), das Pellet wurde mit Ethanol (80 %) gewaschen, und der gesamte Überstand sorgfältig abgezogen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 250  $\mu\text{l}$  TE aufgenommen. Zur Überprüfung wurde ein Aliquot der Einzelstrangpräparation auf einem Agarosegel (1 %) elektrophoretisch aufgetrennt.

**Phosphorylierung der Oligonukleotide** Die Oligonukleotide wurden in lyophilisiertem Zustand geliefert. Sie wurden durch Lösen in der entsprechenden Menge Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/ml gebracht und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um den neu synthetisierten Strang zwischen nach der Mutagenesereaktion schließen zu können, mussten die Oligonukleotide an ihrem 5'-Terminus phosphoryliert werden. Hierzu wurden 100 fmol Oligonukleotide mit 2  $\mu\text{l}$   $10\times$  Kinasepuffer und 25 U T4-Polynukleotidkinase bei einer Konzentration von 1 mM ATP in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  in einem Reaktionsgefäß vermischt. Bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde 30 min inkubiert und daraufhin das Enzym für 10 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  inaktiviert.

**Mutagenesereaktion** Zur Durchführung der Mutagenesereaktion wurden 2  $\mu\text{l}$  phosphoryliertes Oligonukleotid aus der vorangegangenen Reaktion mit 7  $\mu\text{l}$  der Einzelstrangpräparation und 1  $\mu\text{l}$   $10\times$  Annealing-Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Hybridisierung erfolgte durch Erhitzen des Gemisches auf  $65^{\circ}\text{C}$  für 5 min und langsames (30 min) Abkühlen auf Raumtemperatur im temperierten Schüttler. Im nächsten Schritt wurden dem Ansatz auf Eis eine Mischung aus jeweils 5  $\mu\text{mol}$  dNTP, 5  $\mu\text{mol}$  ATP, 0,5  $\mu\text{l}$   $10\times$  Ligasepuffer, 1,25 U T4-DNA-Polymerase, 1 U T4-DNA-Ligase sowie Wasser ad 10  $\mu\text{l}$  zugegeben. Die Reaktion wurde zunächst 10 min bei Raumtemperatur gestartet und dann weitere 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  fortgesetzt. 1–1,5  $\mu\text{l}$  der Reaktionsmischung wurden, wie oben beschrieben, in 60–70  $\mu\text{l}$  *E. coli* des Stamms XL1-Blue (*ung*<sup>+</sup>) transformiert. Der Rest wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  als Reserve eingefroren. Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Ausplattieren der transformierten Bakterien auf  $2\times$ YT-Amp-Agarplatten, welche über Nacht bebrütet wurden.

**Nachweis der Mutation** Am nächsten Tag wurden von jeder Platte drei Kolonien zum Beimpfen einer Minikultur ausgewählt. Aus den Minikulturen wurde die Plasmid-DNA präpariert (siehe 2.3.1) und auf das Vorhandensein der gewünschten Mutation geprüft.

## 2. Material und Methoden

Wo mit der Mutation neue Schnittstellen eingeführt werden konnten, kamen hierzu Restriktionsenzyme zum Einsatz. Jeweils 4 µl der Plasmidpräparation wurden in den, von den Herstellern zu den jeweiligen Restriktionsenzymen empfohlenen, Puffern und ggf. unter Zugabe von BSA mit 5 U des Enzyms für 2 h bei 37 °C (*Bss*HI bei 50) °C inkubiert. Wenn für das verwendete Enzym im wt-Plasmid keine Schnittstelle existierte, wurde die Reaktion als Doppelverdau mit *Bam*HI durchgeführt, um ein leicht zu erkennendes Fragment zu erhalten. Das Ergebnis der Reaktion wurde, wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, auf einem Agarosegel (0,6 %) aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet. Bei den meisten Konstrukten musste jedoch eine Sequenzierung (siehe 2.5) durchgeführt werden. Reste der Minikulturen wurden bei 4 °C aufbewahrt.

## 2.5. Sequenzierung

### Material

#### SEQUENZIERER

LI-COR DNA Sequencer Model 4000

#### THERMOCYCLER

Mastercycler gradient, Eppendorf,  
Hamburg

#### OLIGONUKLEOTIDE

siehe Tabelle A.2 im Anhang

#### REAGENZIE

- Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences, Little Chalfont
- Sequagel-XR, National Diagnostics, Atlanta, Georgia Diagnostics

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der, mehrfach modifizierten, Sanger-Methode (Sanger *et al.*, 1977; Horn *et al.*, 1997), unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten *Primern* (Smith *et al.*, 1985).

Die *Core*-Region der mutierten IE2-Gene wurde komplett sequenziert und auf das Vorhandensein der gewünschten Mutation und ebenso auf die Abwesenheit anderer Veränderung überprüft. Die Sequenzierung musste in den meisten Fällen allerdings auch schon zum Screening der Bakterienkolonien aus den Mutagenesereaktionen eingesetzt werden. Um hier eine größtmögliche Anzahl an Kandidaten gleichzeitig analysieren zu können, wurde in einem ersten Schritt nur mit jeweils einem – in diesem Fall informativen – ddNTP pro Matrize gearbeitet.

In jedem Fall wurde die Sequenzierung entsprechend den Anweisungen des Herstellers des *Sequencing Kit* bzw. des Sequenzierers durchgeführt.



### Durchführung

Von jeder Plasmidpräparation wurden jeweils viermal 2 µl in vier 0,2 ml-Reaktionsgefäße gegeben (im Falle der *Screenings* aus jeder Präparation nur einmal). Diesen wurde jeweils 1 pmol *Primer* und jeweils 3 µl einer der A-, C-, G- oder T-Reagenzien aus dem *Kit* zugegeben und mit Wasser auf ein Volumen von 6 µl aufgefüllt.

Die Ansätze wurden in den auf 95 °C vorgeheizten *Thermocycler* (Deckel 105 °C) eingesetzt und folgendem Programm unterzogen: 20 Zyklen aus 95 °C für 30 s, 55 °C für 15 s und 72 °C für 15 s.

Nach Abschluss der Polymerase-Reaktion wurden die Röhrchen kurz anzentrifugiert, um den Inhalt wieder zu sammeln. Die Gefäße wurden auf Eis gelagert und jeweils 6 µl des mit dem *Kit* gelieferten Formamid-Ladepuffers zugegeben.

Für das Polyacrylamid-Gel wurden 40 ml *Sequagel XR* mit 10 ml *Sequagel Complete* Pufferreagenz und 400 µl Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %) zusammengemischt, sodass ein 6%iges Gel resultierte. Als Laufpuffer wurde TBE verwendet.

Direkt vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben nochmals auf 70 °C erhitzt und sogleich wieder auf Eis gelagert. Jeweils 1 µl jeder Probe wurde in die Taschen des Gels gegeben. Die Auftrennung und automatische Erfassung über die Fluoreszenzmarkierung erfolgte über Nacht.

Die Auswertung erfolgte automatisiert mit der Software *Base ImagIR V.4.1*, bzw. bei den *Screening*-Sequenzierungen durch Auswertung des gescannten Gels per Hand. Die ermittelten Sequenzen wurden über das Programm *Blast* mit der publizierten wt-Sequenz verglichen.

## 2.6. Zellkultur

### Material

#### WERKBANK

LaminAir HB 2448, Heraeus Instruments GmbH, Osterode

#### BRUTSCHRANK

Water-Jacketed Incubator 3250, Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio

#### KULTURMEDIUM

*Dulbecco's minimal essential medium* (DMEM), 4,5 g/l Glukose, (+) L-Glutamin, (-) Pyruvat, Gibco, Carlsbad, CA

#### TRYPsin-EDTA

0,5 g/l Trypsin, 0,05 % EDTA·4Na, Gibco

## 2. Material und Methoden

### ZUSÄTZE ZUM KULTURMEDIUM

- NCS, Neugeborenen Kälberserum, Biochrom, Berlin
- FCS, Fötale Kälberserum, Biochrom
- GlutaMAX™-I, 200 mM Dimer aus Glutamin und Alanin als stabile Quelle für L-Glutamin, Gibco
- PenStrep, 100×Lösung Penicillin (10000 U/ml) und Streptomycin (10000 µg/ml), Biochrom

Es wurden zwei verschiedene Zelllinien benutzt. Für die Gelretardierungsexperimente wurden HeLa-Zellen (humanes Zervixkarzinom) benutzt. Für alle anderen Experimente kam eine humane Astrozytomzelllinie (Grad III) zum Einsatz. Diese wurde in früheren Versuchen in der Arbeitsgruppe eingesetzt und ist ursprünglich als U373-MG von Cell Line Services Heidelberg bezogen worden. Beim ATCC wurden diese Zellen unter der Bezeichnung HTB-17™ vertrieben. Fuxe *et al.* (2000) haben jedoch gezeigt, dass es sich bei diesen Zellen wohl tatsächlich um U251-MG, eine andere Astrozytom-Linie, handelt. Die seit Langem in der Arbeitsgruppe verwendete Zelllinie exprimiert das sogenannte Retinoblastom-Gen (Wiebusch und Hagemeyer, 2001). Dies ist konsistent mit der Annahme, dass es sich nicht um U373-MG, sondern um U215-MG Zellen handelt. Trotz der Unklarheiten sind es Zellen einer Linie, die seit langem in der HCMV-Forschung Verwendung findet (Boeckh *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 2000; Waheed *et al.*, 1998; Wiebusch und Hagemeyer, 1999; Wiebusch *et al.*, 2004) und die bekanntermaßen CMV-permissiv ist (Boeckh *et al.*, 1991) und den IE2 vermittelten Zellzyklusarrest zeigt (Wiebusch und Hagemeyer, 1999).

Da sie unter dieser Bezeichnung erworben wurden und in Übereinstimmung mit früheren Veröffentlichungen werden diese Zellen in der vorliegenden Arbeit, trotz der o. g. Zweifel, als U373-MG geführt.

Die Zellen wurden als adhärent wachsende *Monolayer* auf Kunststoffschalen (siehe Tabelle 2.1) gehalten. Als Kulturmedium diente DMEM, dem jeweils 5 % FCS und NCS sowie jeweils 1 % PenStrep und Glutamax zugefügt wurden. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle Arbeiten an den offenen Kulturschalen wurden unter keimarmen Bedingungen auf der Zellkultur-Werkbank durchgeführt.

Größe	Durchmesser (cm)	Mediumvolumen (ml)
Klein	6	4
Mittel	10	10
Groß	14	25

**Tabelle 2.1.:** Kunststoffschalen verschiedener Größe.

Die Zellen wurden an jedem dritten Tag geerntet und verdünnt auf neuen Schalen ausgesät (passagiert). Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. 0,5 ml Trypsin-EDTA wurden auf die Zellen pipettiert und diese kurz im Brutschrank inkubiert. Mit Hilfe einer Pipette wurden die angelösten Zellen vom Untergrund abgespült, vereinzelt und in frisches Medium überführt. Dabei erfolgte die Verdünnung 1 : 3 bei U373-MG bzw. 1 : 10 bei HeLa-Zellen.

Zur Expression der IE2-Mutanten, Kontrollen und Reporterproteine musste die Plasmid-DNA in die Zellen gebracht werden, hierzu wurden die Zellen durch Calciumchlorid-DNA Kopräzipitation (Chen und Okayama, 1987), wie im Folgenden beschrieben, transient transfiziert.

### Transfektion

In einem Reaktionsgefäß wurden 8 µg DNA mit 25 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> gemischt und mit Wasser auf ein Volumen von 250 µl aufgefüllt. 250 µl 2×-BBS wurde zugefügt und die Lösung 10–20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die zu transfizierenden Zellen wurden ca. 24 h vorher auf kleine Kulturschalen passagiert. Dem Kulturmedium wurde die inzwischen trübe Lösung nun tropfenweise zugegeben.

Nach ca. 12–14-stündiger Inkubation bei 3 % CO<sub>2</sub> wurde das Präzipitat abgewaschen. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit TBS gewaschen. Die Zellen wurden bis zur Ernte in frischem Medium gehalten.

Zur Gewinnung der Extrakte für Gelretardierungsexperimente und Zellzyklusanalysen wurden mittlere Schalen transfiziert. Das Prozedere war bis auf die Mengenangaben, die mit dem Faktor 2,5 multipliziert wurden, gleich.

## 2.7. Proteinbestimmung

### Material

#### BRADFORD-REAGENZ

Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad, Hercules, CA

#### LOWRY-KIT

DC Protein Assay Reagents Package, Bio-Rad

## 2. Material und Methoden

### 2.7.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Der verwendete *Assay* basiert auf der Methode nach Bradford (1976). Aus dem Konzentrat wurde durch Verdünnung mit 4 Teilen Wasser eine Arbeitslösung hergestellt. In einer Küvette wurden 1 ml der Arbeitslösung mit 1  $\mu$ l der Probe vermischt. Nach 5 min wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Als Eichlösungen wurde eine BSA-Verdünnungsreihe benutzt, zur Leerwertbestimmung die jeweilige Pufferlösung verwendet.

### 2.7.2. Proteinbestimmung nach Lowry

Der verwendete *Assay* basiert auf der Methode nach Lowry *et al.* (1951). Er wurde zur Proteinbestimmung verwendet, wenn die Bradford-Methode aufgrund der Pufferzusammensetzung nicht genutzt werden konnte. Aus den Lösungen A und S im Verhältnis 50 : 1 wurde die Arbeitslösung A' frisch hergestellt. 5  $\mu$ l Probe wurde auf einer Mikrotiterplatte mit 25  $\mu$ l Arbeitslösung A' und 200  $\mu$ l der Lösung B vermischt. Nach 15 min wurde die Absorption bei 750 nm bestimmt. Die Eichlösung enthielt BSA und der Leerwert wurde mit dem verwendeten Puffer gemessen.

## 2.8. Expression

### Material

#### GELKAMMER

Maxigel, Biometra, Göttingen

#### ACRYLAMID-MIX

Rotiforese<sup>®</sup> Gel 30, 30 % Acrylamid,  
0,8 % Bisacrylamid, Carl Roth GmbH  
& Co. KG, Karlsruhe

#### BLOTKAMMER

Pegasus Semi-Dry-Blotter Model S,  
PHASE GmbH, Lübeck

#### PVDF-MEMBRAN

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

#### MILCHPULVER

Sucofin Magermilchpulver, TSI  
GmbH & Co. KG, Zeven

#### DS-RED-EXPRESSIONSKONSTRUKT

pDsRed2-N1, Clontech Laboratories,  
Inc., Mountain View, California

#### IMMUNOBLOT-TRANSFERPUFFER

20 % Methanol  
20 mM Tris-Base  
190 mM Glycin

## 2×SDS-LADEPUFFER

20 % Glycerol  
 4 % SDS  
 200 mM DTT  
 100 mM Tris, pH 6,8  
 Bromphenolblau

## 10×SDS-LAUFPUFFER

247 mM Tris-Base  
 1,92 M Glycin  
 0,1 % SDS (v/v)

## PROTEIN GRÖSSENSTANDARD

PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, Vilnius

## CHEMILUMINESZENZ-REAGENZIEN

Western Lightning® Chemiluminescence Reagent (Enhanced Luminol), Perkin Elmer Inc., Waltham, Massachusetts

## KAMERASYSTEM

DIANA, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt

## ANTIKÖRPER

- Anti-HA High Affinity, Ratte, monoklonaler Antikörper, Klon 3F10, Roche Diagnostics GmbH
- Anti-β-Aktin, Maus, monoklonaler Antikörper, Klon AC-74, Sigma, Saint Louis, Missouri
- Anti-Rat-HRP, Kaninchen, polyklonal, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, Art.-Nr. P0450, Dako-Cytomation Denmark A/S, Glostrup
- Anti-Mouse-HRP, Kaninchen, polyklonal, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, Art.-Nr. P0260, Dako-Cytomation Denmark A/S

Um festzustellen, ob alle mutierten IE2-Konstrukte auch tatsächlich ein Protein erwarteter Größe exprimieren und eventuelle Unterschiede in der Stärke der Expression zu erkennen, wurden diese zunächst in U373-MG Zellen transfiziert, Proteinextrakte hergestellt und auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel nach Größe aufgetrennt (SDS-PAGE, Laemmli (1970)), danach elektrophoretisch im *Semidry*-Blotverfahren (Kyhse-Andersen, 1984; Renart *et al.*, 1979; Towbin *et al.*, 1979) auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen. Ein gegen das Hämagglutinin-Epitop (HA-Tag) gerichteter Antikörper diente zum Nachweis der Genprodukte. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das Zytoskelettprotein β-Aktin benutzt.

**Durchführung**

Sämtliche mutierten Konstrukte, sowie als Kontrollen pSG5-3HA-IE2, pSG5-3HA-IE2 (1–450) und pSG5 Leervektor, wurden in U373-MG Zellen transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde neben dem Effektorplasmid (8 µg) ein *ds-red*-Expressionsplasmid (2 µg) eingesetzt. Nach ca. 48 h wurden die Zellen zur Ernte wie folgt behandelt:

Das Medium wurde abgesaugt und in ein 15 ml-Probenröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA, wie in Abschnitt 2.6 be-

## 2. Material und Methoden

schrieben, von den Schalen abgelöst und in den Probenröhrchen aufgenommen. Dann wurden die Zellen bei 200 g pelletiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in PBS resuspendiert. Ein Aliquot wurde für die Transfektionskontrolle zurückbehalten, der Rest erneut pelletiert, vom Überstand befreit und in 200 µl Laemmli-Puffer aufgenommen und mittels Ultraschallimpulsen aufgeschlossen (soniziert).

Die Aliquots wurden mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 2.11) auf die Expression von *ds-red* untersucht und so der Anteil der transfizierten Zellen bestimmt.

**SDS-PAGE** Zwischen die gereinigten Glasplatten wurde zunächst das Trenngel (8 % Acrylamid, 375 mM Tris (pH 8,8), 0,1 % SDS) gegossen, danach das Sammelgel (3 % Acrylamid, 0,125 mM Tris (pH 6,8), 0,1 % SDS) darübergeschichtet und ein Kamm eingesetzt. In beiden Fällen wurde die Polymerisation zu Polyacrylamid durch Zugabe von APS (0,5 %) und TEMED (1 %) initiiert (prozentuale Angaben jeweils v/v).

Die Proben wurden 3 min bei 95 °C aufgeköcht. Direkt im Anschluss wurden jeweils 5 µl der Proteinextrakte auf das Gel aufgetragen. Größenmarker wurden jeweils in der ersten und letzten Geltasche jedes Gels eingesetzt.

Die Elektrophorese wurde zuerst mit 100 V gestartet, bis sich die Proteine auf Höhe des Übergangs von Sammel- zu Trenngel befanden, danach mit 200 V so lange fortgesetzt, bis an den sichtbaren Banden des Größenmarkers eine ausreichende Auftrennung zu erkennen war.

**Immunoblot** Die Proteine wurden bei konstanter Stromstärke (1 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche) auf die PVDF-Membran übertragen (ca. 60 min), zur Kontrolle diente der vorgefärbte Proteinstandard. Unbesetzte Bindungsstellen der Membran wurden durch Inkubation mit 5 % Milchpulver (w/v) in TTBS 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt.

Alle Antikörperlösungen wurden in der angegebenen Verdünnung aus der Stammlösung in 5 % Magermilchpulver (w/v), welches in TTBS aufgelöst war, hergestellt. Durch Zugabe von 0,1 % NaN<sub>3</sub> (v/v) wurden die Primärantikörper haltbar gemacht und zur mehrfachen Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die Membran wurde unterhalb der 72-kD-Marke durchtrennt und die obere Hälfte mit dem Anti-HA (1 : 1 000), die untere mit dem Anti-β-Aktin-Antikörper (1 : 4 000), 2 h bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4 °C) im Drehgestell inkubiert.

Die Membranen wurden fünfmal für jeweils 10 min in frischem TTBS gewaschen und dann 1 h mit dem jeweiligen Zweitantikörper (1 : 1000) unter denselben Bedingungen inkubiert, bevor ein weiterer Waschschrift, wie beschrieben, erfolgte.

Die an die Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion, mithilfe derer die proteingebundenen Antikörper sichtbar gemacht werden können. Hierzu wurden die gewaschenen Membranen mit der unmittelbar zuvor aus den Komponenten des *Western-Lighting-Kits* hergestellten Lösung überschichtet. Nach ca. 60 Sekunden wurde die Lösung wieder entfernt und die Membranen in Klarsichtfolie verpackt. Direkt im Anschluss erfolgte die Belichtung eines Röntgenfilms, wobei die optimale Expositionszeit durch Ausprobieren ermittelt wurde. Zur genaueren Quantifizierung wurden mit der DIANA-Kamera digitale Aufnahmen der leuchtenden Banden erstellt und mit der Software *Aida V. 3.11* ausgewertet.

## 2.9. Transaktivierung

### Material

LUMINOMETER	REPORTERPLASMID UL112/113
Lumat LB9501, Berthold, Bad Wildbad	pHM142 (Arlt <i>et al.</i> , 1994)
LUCIFERASE-KIT	Enthält den Bereich -352 bis +37 des UL112/113-Promotors vor einem Luciferase-Gen. Das Plasmid wurde in früheren Experimenten in der Arbeitsgruppe verwendet und freundlicherweise von T. Stamminger, Institut für Virologie, Erlangen, zur Verfügung gestellt.
Luciferase Assay System, Promega Corporation, Madison, Wisconsin	
MIKROTITERPLATTEN-LESER	REPORTERPLASMID C-FOS
MR5000, Dynatech Laboratories, Chantilly, Virginia	pfosCAT (Hagemeier <i>et al.</i> , 1992b)
MIKROTITERPLATTEN-WASCHER	Enthält den Bereich -1000 bis + 109 des murinen c-fos Promotors vor einem Chloramphenicoltransferasegen (CAT). Das Plasmid wurde in früheren Experimenten in der Arbeitsgruppe verwendet.
ImmunoWash Model 1575, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA	
CAT-ELISA-KIT	
Roche Diagnostics, Mannheim	
LEERVEKTOR	
pUC19	

Die Fähigkeit zur Transaktivierung wurde anhand zweier verschiedener, exemplarisch ausgewählter Promotoren untersucht. Als Vertreter zellulärer Promotoren wurde der

## 2. Material und Methoden

c-fos-Promotor untersucht, für die viralen Promotoren kam ein Konstrukt mit dem UL112/113-Promotor (*Early-Phase*) zum Einsatz.

In beiden Fällen wurde das IE2-Expressionsplasmid zusammen mit dem Reporterplasmid in U373-MG-Zellen transfiziert (siehe Abschnitt 2.6). Die Zellen wurden ca. 40–48 Stunden nach Transfektion geerntet und die Menge der Reportersubstanz analysiert.

Da sich Chloramphenicoltransferaseaktivität und Luciferaseaktivität aus der gleichen Zellpräparation bestimmen lassen, wurden dabei pHM142 und pRR55 (siehe Abschnitt 2.10) kotransfiziert. Die Extrakte der geernteten Zellen wurden aliquotiert und separat in den jeweiligen Auswertesystemen untersucht. Bei jeweils einem von drei Durchgängen wurde auf die gemeinsame Transfektion von pHM142 und pRR55 verzichtet.

### 2.9.1. Transaktivierung des Fos-Promotors

Die U373-MG Zellen wurden mit jeweils 4,8 µg der Effektor-DNA, sowie 1,6 µg des Reporterkonstrukts pfosCAT, wie beschrieben, transfiziert. Um auf eine Gesamtmenge von 8 µg DNA zu kommen, wurden noch 1,6 µg eines Leervektors (pUC19) eingesetzt. Bei der Ernte der Zellen (ca. 48 h nach Transfektion), wie auch bei der Messung der CAT-Aktivität, wurde nach der Bedienungsanleitung des CAT-ELISA-*Kits* vorgegangen. Die Zellen wurden dreimal mit 4–8 °C kaltem PBS gewaschen, bevor sämtlicher Überstand gründlich abgesogen wurde. 1 ml des mitgelieferten Lysepuffers wurde auf die Zellen gegeben und durfte 30 min bei Raumtemperatur einwirken. Dann wurde der Überstand, welcher nun die CAT enthielt, in ein Reaktionsgefäß überführt. Zelltrümmer wurden bei 12 000 g und 4 °C 10 min pelletiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß in siedendem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Gesamtproteinkonzentration wurde nach der Lowry-Methode (siehe Abschnitt 2.7.2) bestimmt und durch Verdünnung mit mitgeliefertem Probenpuffer jeweils 2 µg im CAT-ELISA eingesetzt. Es wurden stets Doppelwerte bestimmt. Aus dem mitgelieferten CAT-Enzym wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und neben den Proben in einem Volumen von jeweils 200 µl auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Während 1 h bei 37 °C erfolgte die Bindung der CAT an die Anti-CAT Antikörper, welche fest an die Mikrotiterplatte gekoppelt vorlagen. Während aller Inkubationsschritte wurde die Platte mit Klebefolie abgedichtet, um Verdunstung zu vermeiden. Danach wurde die Mikrotiterplatte fünfmal mit jeweils 250 µl des mitgelieferten Waschpuffers im Waschautomaten gespült und der gesamte Puffer entfernt. Es schloss sich eine Inkubation mit 200 µl an Digoxigenin (DIG) gekoppeltem Anti-CAT-Antikörper (2 µg/ml in mitgeliefertem Probenpuffer) unter den gleichen Bedingungen an. Nach einem weiteren



Waschschritt, wurden 200 µl eines mit Peroxidase (POD) gekoppelten Anti-DIG Antikörpers (150 mU/ml in Probenpuffer) hinzugefügt und wie beschrieben inkubiert und gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen POD-Aktivität wurden 200 µl POD-Substrat (ABTS) aufgetragen und die Menge des umgesetzten grünen Farbstoffs im Mikrotiterplatten-Lesegerät quantifiziert. Zur Auswertung wurde die Software *Dynex Revelation V. G3.2* benutzt.

### 2.9.2. Transaktivierung des viralen UL112/113-Promotors

Wurde die Transaktivierung des viralen UL112/113-Promotors zusammen mit der Autorepression des MIEP-Promotors in einem Experiment analysiert, wurden neben 5,5 µg Effektor-DNA 1,83 µg pRR55 (siehe Abschnitt 2.10) und 0,77 µg pHM142 zur Transfektion eingesetzt. Sollte nur die UL112/113-Aktivität ermittelt werden, wurden 4,8 µg Effektor, 1,6 µg pHM142 und 1,6 µg Leervektor (pUC19) benutzt.

Die Ernte wurde im Fall der Kotransfektion wie in 2.9.1 auf der vorherigen Seite beschrieben durchgeführt. Sonst wurde der mit dem Luciferase-Kit gelieferte *Reporter Lysis Buffer* (RLB) wie folgt benutzt: Die Zellen wurden vom Kulturmedium befreit und mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 400 µl RLB mit einem Zellschaber gründlich vom Untergrund abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um eine komplette Lyse der Zellen zu gewährleisten wurden sie in siedendem Stickstoff eingefroren und gleich darauf wieder aufgetaut (*freeze-thaw*-Zyklus). Zellschrott wurde bei 12000 g, 4 °C pelletiert und der Überstand in einem neuen Röhrchen in siedendem Stickstoff gefroren.

Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurden 20 µl der Extrakte in ein transparentes Kunststoffröhrchen pipettiert und dieses in das Luminometer eingeführt. Dort wurde automatisch 50 µl des Luciferase-Substrats injiziert und die Lichtausbeute quantifiziert. Von jeder Probe wurden Doppelwerte bestimmt.

## 2.10. Autorepression

### Material

Bis auf ein anderes Reporterplasmid kamen die gleichen Materialien wie in 2.9.1 zum Einsatz.

## 2. Material und Methoden

### REPORTERPLASMID MIEP

pRR55 (Fickenscher *et al.*, 1989)

Enthält den Bereich -671 – +52 des *major immediate early promoter* (MIEP) vor einem Chloramphenicoltransferasegen (CAT). Das Plasmid wurde in früheren Experimenten in der Arbeitsgruppe verwendet und freundlicherweise von S. Prösch, Institut für Virologie, Charité, zur Verfügung gestellt.

Die Bestimmung der Autorepression des MIEP durch die IE2-Konstrukte wurde in einem CAT-ELISA, analog zum Prozedere in 2.9.1 auf Seite 46, durchgeführt. Es fand entweder eine Kotransfektion mit pHM142 statt, wie in 2.9.2 auf der vorherigen Seite beschrieben, oder es wurden 6 µg Effektor- und 2 µg pRR55 benutzt.

## 2.11. Zellzyklus

### Material

#### DURCHFLUSSZYTOMETER

FACScan, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ

#### CD20-EXPRESSIONSPLASMID

pSG5-CD20

Enthält ein humanes CD20-Gen hinter einem SV40-Promotor. Das Plasmid wurde in früheren Experimenten in der Arbeitsgruppe verwendet (Wiebusch und Hagemeyer, 1999)

#### PROPIDIUMIODID-FÄRBE LÖSUNG

50 µg/ml Propidiumiodid  
300 µg/ml RNase A  
in PBS

#### P16-EXPRESSIONSPLASMID

pXmycp16

p16INK4a-Expressionskonstrukt.

Das Plasmid wurde in früheren Experimenten in der Arbeitsgruppe verwendet und von Jiri Lukas (Danish Cancer Society) zur Verfügung gestellt.

#### ANTI-CD20-ANTIKÖRPER

Anti-CD20-FITC, Maus, monoklonaler Antikörper, Klon L27, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ

Um die Zellzyklusarrestfunktion der verschiedenen IE2-Mutanten analysieren zu können, wurden transfizierte Zellen im Durchflusszytometer (FACS = *fluorescent activated cell sorter*) untersucht. Die zelluläre DNA wurde hierzu, nach Abbau der RNA durch RNase-Verdau, mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Über diese Färbung konnten nun G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- von S- und G<sub>2</sub>-Zellen, anhand des DNA-Gehalts, unterschieden werden.

Neben dem Effektor wurde ein CD20-Expressionskonstrukt kotransfiziert. Nach Färbung mit einem fluorochrommarkierten Antikörper konnte so die transfizierte Zellpopulation für die Auswertung isoliert betrachtet werden.

### Durchführung

Die Experimente wurden in U373-MG Zellen durchgeführt. Zur Transfektion (siehe 2.6) in mittelgroßen Schalen wurden 16 µg Effektor und 4 µg pSG5-CD20 eingesetzt, die Zellen wurden 48 h später, durch Ablösung mit Trypsin, geerntet.

Zunächst wurden die Zellen in 15 ml-Probenröhrchen pelletiert (5 min, 200 g, 4 °C) und sämtlicher Überstand gründlich abgesaugt. Die Zellpellets wurden in einer Lösung aus 40 µl DMEM mit 10 % FCS und 10 µl der Stammlösung des Anti-CD-20-FITC-Antikörpers resuspendiert und 30 min auf Eis gefärbt. Danach wurden die Röhrchen mit kaltem PBS, dem 1 % FCS hinzugefügt war, aufgefüllt und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Abermals wurde der Überstand sorgfältig entfernt und die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen.

Zur Vorbereitung der DNA-Färbung mit PI wurden die Zellen permeabilisiert und fixiert. Dies erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml eiskalten Ethanol unter ständigem Aufwirbeln und Einwirken desselben über Nacht bei 0 °C.

Nach mindestens 14 h wurden die Röhrchen wieder mit PBS aufgefüllt und erneut, wie zuvor, zentrifugiert. Die Zellen wurden gründlich vom Überstand befreit und in 500 µl PI-Färbelösung resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss gefärbt.

Die Zellen wurden direkt im Anschluss für die FACS-Messung eingesetzt. Das Durchflussszytometer wurde von der Software *Cellquest V. 1.0* (Becton Dickinson) gesteuert. Die Software wurde, in Übereinstimmung mit der Literatur, so eingestellt, dass nur Zellen deren FITC Signal mindestens 20-fach über dem der untransfizierten Zellpopulation lag in die Auswertung aufgenommen wurden. Außerdem wurden aneinanderhaftende Zellen mithilfe des Dublettendiskriminierungsmoduls ausgeschlossen. Aufgrund der Doppelfärbung (PI und FITC) musste in der Auswertung eine Kompensation der Fluoreszenzkanäle, wie bei Coligan *et al.* (1991) beschrieben, eingestellt werden.

Die mit dem Programm *Cellquest* aufgezeichneten Daten wurden mithilfe der Software *Modfit V2.0* automatisiert ausgewertet.

## 2.12. DNA-Bindung

### Material

#### PHOSPHORIMAGER

FLA-3000, Fujifilm Corporation, Tokyo

#### GELTROCKNER

Slab Gel Dryer, Savant (Thermo Scientific), Waltham, MA

#### KOMPETITOR-DNA

- poly(dA-dT), Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri
- Heringsperm-DNA, soniziert und denaturiert, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

#### RADIONUKLID

EasyTides®  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP, spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol, Konzentration 10 mCi/ml, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA

#### OLIGONUKLEOTIDE

Siehe Tabelle A.3 im Anhang.

#### 3 dNTP MIX

Jeweils 5 mM dCTP, dGTP, dTTP, Amersham Biosciences, Little Chalfont

#### TGA-PUFFER

10 mM Tris (pH 8,0)

10 % Glyzerin

0,5 mM EDTA

1 mM DTT

Dem Puffer wurden unmittelbar vor der Verwendung jeweils 1 ‰ der Stammlösungen der Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin, Pefabloc und Pepstatin zugefügt.

#### HYBRIDISIERUNGSPUFFER

TE mit 30 mM KCl

#### 10× FILLING PUFFER

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

#### KLENOW ENZYM

DNA Polymerase I, großes Fragment, aus *Escherichia coli*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

#### NICK-SÄULEN

NICK™ Columns, GE Healthcare, Uppsala

Um die DNA-Bindungsfähigkeit der IE2-Mutanten zu beurteilen, wurden Gelretardierungsexperimente (EMSA=*electromobility shift assay*) durchgeführt. Hierbei wird ausgenutzt, dass der Komplex aus IE2 und radioaktiv markiertem Sondenoligonukleotid langsamer durch ein Polyacrylamidgel migriert, als ungebundenes Oligonukleotid. Das Oligonukleotid kann nach der Gelelektrophorese autoradiografisch nachgewiesen werden. Für IE2 wurde von Asmar *et al.* (2004) ein Bindungsassay etabliert. Dieser wurde für die vorliegende Arbeit eingesetzt.

**Durchführung**

**Ernte** Sämtliche Konstrukte wurden in HeLa- Zellen exprimiert. Die Transfektion wurde, wie in 2.6 beschrieben, in mittelgroßen Schalen ausgeführt. Nach 24 h wurden die Zellen zur Ernte mit dem Zellschaber von der Plastikschale gelöst und in ein 15 ml-Probenröhrchen gegeben. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 200 g wurde das Kulturmedium abgesaugt und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden erneut unter denselben Bedingungen pelletiert und vom Überstand befreit, bevor sie in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt wurden. Hierin wurden sie ein letztes Mal zentrifugiert, dann im dreifachen Volumen TGA-Puffer resuspendiert.

Der Zellaufschluss wurde durch Sonizieren erreicht. Hierbei musste besonders schonend vorgegangen werden um die DNA-Bindungsfähigkeit von IE2 nicht zu beeinträchtigen. Die Reaktionsgefäße wurden deshalb immer auf Eis gelagert, um eine übermäßige Erhitzung der Proben zu verhindern. Das Gerät wurde mit schmaler Spitze und 80 % *output control* betrieben. Die Zellen wurden zwei Durchgängen aus je drei Ultraschallstößen à 1 s mit 4 s Pause unterzogen. Danach wurden die Zelltrümmer bei 20000 g, 4 °C 10 min pelletiert, der Überstand aliquotiert und in siedendem Stickstoff gefroren. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei -80 °C. Die Proteingehalte wurden nach der Bradford-Methode (siehe 2.7.1) bestimmt.

**Sondenoligonukleotid** Zur Herstellung der DNA-Sonde mussten die Einzelstrang-Oligonukleotide zunächst zum Doppelstrang hybridisiert werden. Hierzu wurden äquimolare Mengen der Oligonukleotide MIEP *sense* und MIEP *antisense* in Hybridisierungspuffer gelöst, 5 min im Wasserbad auf 95 °C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Im nächsten Schritt wurde die nun doppelsträngige Sonde radioaktiv markiert, indem die einzelsträngigen Überhänge unter Verwendung von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP aufgefüllt wurden. Die anderen Nukleotide in dieser Reaktion waren nicht markiert. 11 pmol der Sonden-Duplex wurden mit 2  $\mu$ l 10 $\times$  *Filling*-Puffer, 2  $\mu$ l 3 dNTP-Mix, 2 U Klenow-Enzym und einer Menge  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP, die 20  $\mu$ Ci Aktivität entsprach, in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch fünfminütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.

Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels Passage durch eine Nick-Säule entfernt. Diese war zunächst mit 400  $\mu$ l TE gespült worden, bevor das Produkt der letzten Reaktion, welches mit TE auf ein Volumen von 50  $\mu$ l aufgefüllt worden war, aufgetragen wurde. Nun wurden erneut 400  $\mu$ l TE auf die Säule gegeben und eluiert. Diese nicht

## 2. Material und Methoden

aktive erste Fraktion wurde verworfen. Es wurden erneut 400 µl TE aufgefüllt und das Eluat, dessen Aktivität im Szintillationszähler überprüft wurde, als Sonde verwendet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Bindungsreaktion** 2 µl Zellextrakt (entsprechend 20 µg Gesamtprotein) wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben, in dem 600 µl BSA (10 %), 1 µl Glycerin, 20 nmol  $\text{MgCl}_2$ , 250 ng poly(dA-dT), 100 ng Heringsperma-DNA (soniziert und denaturiert) und TE zum Gesamtvolumen von 16,5 µl vorgelegt worden waren. Dieses Gemisch wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wurden 1,5 µl (entsprechend ca. 20 000 c/min) der markierten Sonden-Duplex in den Deckel des Reaktionsgefäßes pipettiert und die Bindungsreaktion durch kurze Zentrifugation gestartet und weitere 10 min bei Raumtemperatur fortgesetzt. Die Proben wurden sofort auf das vorbereitete Gel aufgetragen.

**Gelelektrophorese** Zur elektrophoretischen Auftrennung des Reaktionsprodukts wurde ein nichtdenaturierendes Polyacrylamid-Gel benutzt (5 % Acrylamid-Mix in TBE, Start der Polymerisation durch Zugabe von jeweils 0,75 ‰ APS und TEMED). Das Gel wurde zunächst bei 80 V mind. 30 min vorlaufen gelassen. Als Laufpuffer wurde  $0,5\times\text{TBE}$  verwendet.

Nach Auftragung der Proben erfolgte die Auftrennung bei 200 V 90–120 min lang. Das Gel wurde auf Whatman-Papier aufgezogen und maschinell getrocknet. Die markierten Oligonukleotide wurden durch Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht (über mehrere Tage unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Für die quantitative Erfassung wurde ein *Phosphorimager-Screen* exponiert, eingelesen und mit der Software *Aida V. 3.11* ausgewertet.

## 2.13. Immunfluoreszenz

### Material

#### FLUORESZENZMIKROSKOP

Axiovert S100, Zeiss, Oberkochen,  
mit Kamera AVT Horn MC-3254

#### ANTIFADE-REAGENZ

SlowFade<sup>®</sup> Gold, Invitrogen

#### DAPI

4',6-Diamidino-2-phenylindol,  
0,5 g/l, Invitrogen

#### ANTIKÖRPER

- Anti-CMV-I.E.A., Maus, monoklonaler Antikörper gegen ein Epitop des Exons 2 des MIEP, Klon E13, Argene SA, Varilhes
- Anti-Maus-Alexa<sup>®</sup> Fluor 488 IgG, Ziege, polyklonal, Invitrogen, Carlsbad, CA

Um eventuell vorhandene Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation zwischen den verschiedenen Konstrukten zu beurteilen, wurde eine Auswahl der Konstrukte in U373-MG Zellen exprimiert und das Expressionsmuster mithilfe der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI benutzt, als Transfektionsmarker wurde ein *ds-red*-Expressionskonstrukt kotransfiziert. Das *ds-red* zeigt ein zytosolisches Expressionsmuster.

#### Durchführung

Für dieses Experiment wurden die Zellen zunächst auf Deckgläschen ausplattiert. Diese wurden in kleine Kulturschalen gesetzt und mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert (siehe Abschnitt 2.6).

Zwei Tage nach Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden sie 10 min einer eiskalten Mischung aus Methanol und Aceton (1 : 1) ausgesetzt und danach nochmals mit PBS gewaschen. Zur Blockierung wurden die Zellen in PBS, dem 3 % BSA zugesetzt waren, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen in einer feuchten Kammer mit 50 µl einer Antikörperlösung (10 ng/µl in PBS (3 % BSA)) vollständig bedeckt und 1 h inkubiert.

Die Antikörperlösung wurde entfernt und die Zellen viermal mit PBS (3 % BSA) gewaschen. Dem schloss sich eine weitere Inkubation unter denselben Bedingungen in einer Lösung aus Alexa Fluor 488 konjugiertem Anti-Maus-Antikörper (20 ng/µl) in PBS (3 % BSA) und vier weitere Waschschriffe an. Im letzten Waschschriff wurden 0,2 ‰ der DAPI-Stammlösung zugesetzt. Zuletzt wurden die Zellen mit *Antifade*-Reagenz eingedeckelt.

Ein repräsentatives Blickfeld wurde bei 400-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop ausgewählt und unter Verwendung der jeweiligen Filtereinstellungen je ein Bild des *Alexa488*-, DAPI- und *ds-red*-Signals gemacht.

## 2.14. In-silico-Strukturvorhersage

In der Diskussion der Ergebnisse sollten auch die Möglichkeiten der rechnergestützten (*in silico*) Strukturvorhersage genutzt werden. Teilweise konnten solche Vorhersagen aus der vorhandenen Literatur übernommen werden.

Für die Vorhersage von Aminosäureresten mit DNA-Kontakt wurden die Programme *DP-Bind* (Hwang *et al.*, 2007) und *DBS-PSSM* (Ahmad und Sarai, 2005) benutzt. *DP-Bind* bildet aus drei verschiedenen Vorhersagemethoden entweder eine mehrheits- oder eine konsensusbasierte Auswertung. In der vorliegenden Arbeit wurde die akkuratere Konsensusauswertung verwendet.

Eine Vorhersage der Domänengrenzen in IE2 wurde mit dem Internetdienst *DomPred Protein Domain Prediction Server* durchgeführt (Marsden *et al.*, 2002).

Für die Erzeugung von Bildern aus einem Tertiärstrukturmodell, das freundlicherweise von M. Inmaculada Barrasa, Department of Cancer Biology, Abramson Family Cancer Research Institute, University of Pennsylvania, zur Verfügung gestellt wurde, kam das Programm *PyMOL*<sup>TM</sup> Version 1.1beta3 zum Einsatz.



## 3. Ergebnisse

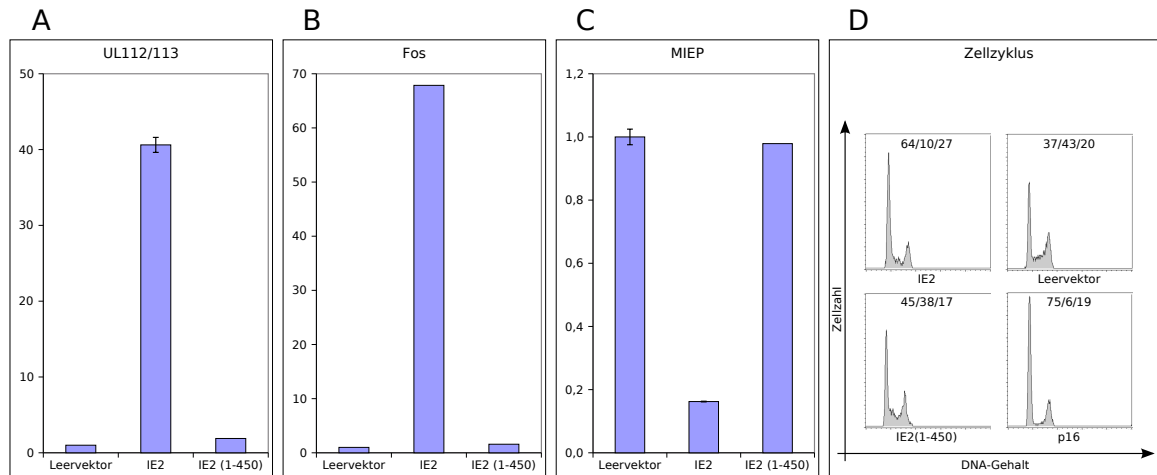
### 3.1. Experimentelles System

Zur Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehungen in der C-terminalen *Core*-Domäne von IE2 sollten einzelne Aminosäurereste in diesem Bereich substituiert werden. Hierzu wurde ein Expressionskonstrukt mit der Wildtypsequenz des Stammes AD169 zielgerichtet mutiert, um eine Bibliothek von Einzelpunktmutanten des *Core*-Bereichs zu erstellen. Aufgrund der zellzyklusarretierenden Funktion von IE2, lassen sich Zellen nicht stabil mit diesen Expressionskonstrukten transfizieren. Deshalb wurden die Mutanten mittels transienter Transfektion in viruspermissiven U373-MG-Zellen exprimiert und ihre Funktionalität mit auf gleiche Weise exprimiertem Wildtyp-IE2 verglichen. Für die Untersuchung der DNA-Bindung wurden HeLa-Zellen transfiziert. Die Verwendung von Extrakten diesen Zelltyps ergibt stärkere IE2-Banden im Gelretardierungsexperiment, ohne dass sich in früheren Experimenten qualitative Unterschiede zu Extrakten aus U373-MG-Zellen gezeigt hätten (Asmar, 2004).

Für eventuelle spätere Verwendungen und als Markierung für den IE2-Antikörper unabhängigen Expressionsnachweis befindet sich N-terminal des Proteins ein dreifaches Hämagglutinin-Epitop, welches die untersuchten Funktionen nicht messbar beeinflusst (Wiebusch und Hagemeier, 1999).

Die Funktionsanalyse von IE2 ist in Abb. 3.1 auf der nächsten Seite am Beispiel von wt-IE2 und der *loss-of-function*-Mutante IE2 (1–450) dargestellt. IE2-wt bewirkt eine starke Promotoraktivierung von etwa 40-fach bezüglich des viralen UL112/113-Promotors bzw. etwa 70-fach bezüglich des zellulären fos-Promotors. Hingegen ist die C-terminale Deletionsmutante IE2 (1–450) in beiden Fällen allenfalls zu einer sehr geringen Promotoraktivierung in der Lage. Das Reporterkonstrukt für die UL112/113-Aktivierung (pHM142) enthält den Bereich –352 bis +37 des UL112/113-Promotors vor einem Luciferasegen. Dieser Bereich enthält mehrere Bindungsstellen für IE2 sowie eine CREB/ATF-Bindungsstelle. Beide haben einen Anteil an der IE2-vermittelten Transaktivierung (Arlt *et al.*, 1994; Lang *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1996). Das Reporterkonstrukt für die c-fos-Aktivierung enthält den Bereich –1000 bis +109 des murinen c-fos-Promotors vor

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.1.:** (A-C) U373-MG-Zellen wurden mit IE2-Expressionsvektor (pSG5-3HA-IE2), Leervektor (pSG5) oder dem Expressionsvektor einer IE2-Mutante, bei der die gesamte Core-Domäne deletiert wurde (pSG5-3HA-IE2 (1–450)), sowie mit den verschiedenen Reporterkonstrukten transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet und die Reporteraktivitäten bestimmt. Die Ergebnisse sind als Vielfaches der basalen Promotoraktivität (=1) dargestellt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. (A) Transaktivierung des UL112/113-Promotors. Die Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt (pHM124) kotransfiziert. Nach Ernte wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. (B) Transaktivierung des fos-Promotors. Die Zellen wurden hier mit dem fos-Reporterkonstrukt (pfosCAT) kotransfiziert. Die gebildete Menge CAT-Enzym wurde quantifiziert. (C) Autorepression des MIEP. Die Zellen wurden mit dem MIEP-Reporterkonstrukt (pRR55) kotransfiziert. Hier wurde ebenfalls die CAT-Menge bestimmt. (D) Zellzyklusarrest. Die Zellen wurden mit den bereits genannten Expressionsvektoren sowie, als zusätzliche Kontrolle, einem Expressionskonstrukt für das p16-Protein transfiziert. Außerdem wurde als Transfektionskontrolle ein Expressionskonstrukt für das CD20-Protein kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und ihre DNA mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Das CD20-Oberflächenprotein wurde mit einem FITC-konjugierten, monoklonalen Antikörper markiert. Danach wurde der DNA-Gehalt der, über das FITC-Signal identifizierten, effizient transfizierten Subpopulation im Durchflusszytometer anhand des PI-Signals ermittelt. In den Histogrammen ist nur die transfizierte Subpopulation mit ihrem DNA-Gehalt gezeigt. Die Zellzyklusverteilung ist als (%G<sub>0/1</sub>)/(%)S)/(%G<sub>2</sub>/M) angegeben.

einem CAT-Gen. Obwohl auch dieser Promotor eine CREB-Bindungsstelle besitzt, führt ihre Deletion zu keiner Verminderung der IE2 vermittelten Aktivierung. Hier werden Interaktionen zwischen IE2 und basalen Transkriptionsfaktoren für die Transaktivierung verantwortlich gemacht (Hagemeier *et al.*, 1992b).

Auch hinsichtlich der Repression des MIE-Promotors erbrachte das experimentelle System die erwarteten Ergebnisse: Das Wildtypprotein senkt die Expression vom MIEP auf unter ein Fünftel der basalen Expression, während die C-terminale Deletionsmutante keine Autorepression zeigt.

Auf den IE2-vermittelten Zellzyklusarrest wurde schon im Abschnitt 1.2.5.2 ausführlich eingegangen. Wiebusch und Hagemeier (2001) haben für U373-MG-Zellen durch BrdU-Einbauexperimente gezeigt, dass es in IE2-transfizierten Zellen zu einem Arrest in der sehr frühen S-Phase kommt. Wegen der Beschränkungen der hier genutzten Analyse-methode, der FACS-Messung von PI gefärbten Zellen, kann keine Unterscheidung zwischen  $G_{1/0}$ - und frühen S-Phase-Zellen getroffen werden. Die arretierten Zellen erscheinen also in den Zellzyklushistogrammen im  $G_{1/0}$ -Gipfel. Während sich in den mit Leervektor transfizierten Zellen nur 37 % mit einem  $G_1$ -DNA-Gehalt anfärben lassen, sind es in den mit IE2-Wildtyp transfizierten 64 %, also 73 % mehr. Als Positivkontrolle wurde ein  $p16^{INK4a}$ -Expressionskonstrukt verwendet. Dieses Tumorsuppressorprotein induziert bei Überexpression einen  $G_1$ -Arrest (Skolnik und Fisher, 2003), der mit einem  $G_1$ -Anteil von 75 % nur wenig stärker ausfällt als der durch IE2 ausgelöste. Die C-terminale Deletionsmutante IE2 (1–450) zeigt im Gegensatz zu den Transaktivierungs- und Autorepressionsexperimenten hinsichtlich des Arrests eine gewisse Restaktivität. Der  $G_{1/0}$ -Anteil beträgt hier 45 % und ist damit immer noch deutlich höher als in den mit Leervektor transfizierten Zellen. Auch diese Befunde entsprechen den Erwartungen (Wiebusch und Hagemeier, 2001; Asmar *et al.*, 2004).

## 3.2. Struktur-Funktionsanalyse des IE2-Proteins

### 3.2.1. Darstellung der Mutanten

#### 3.2.1.1. Auswahlkriterien

Gegenstand dieser Arbeit ist die Ermittlung von Struktur-Funktionsbeziehungen in der C-terminalen *Core*-Domäne von IE2 auf Basis von Einzelpunktmutanten. Dieser Bereich umfasst ca. 100 Aminosäurereste. Da sich die angestrebten Experimente mit zunehmender Anzahl der parallel zu verarbeitenden Proben nur schwer beherrschen

### 3. Ergebnisse

lassen, sollte die Zahl der Mutanten, durch Auswahl von vielversprechenden Kandidaten, auf etwa die Hälfte reduziert werden. Basis der Auswahl war in erster Linie der Konservierungsgrad bestimmter AS zwischen verschiedenen CMV-Spezies, außerdem wurde auf eine möglichst gleichmäßige Abdeckung der gesamten Region Wert gelegt. Für jeden ausgewählten Kandidaten wurde eine Substitutionsmutante mit einem Alanin anstelle der ursprünglichen AS hergestellt (*alanine scanning*, (Cunningham und Wells, 1989)). Nur im Fall von drei stark konservierten Alaninen wurden Serin-Punktmutanten erzeugt. Eine Übersicht der *Core*-Domänen in den verschiedenen  $\beta$ -Herpesvirusspezies und der zur Substitution ausgewählten AS findet sich in Abbildung 3.2 auf der nächsten Seite.

Zur Herstellung der ausgewählten IE2-Mutanten wurden die im Anhang aufgeführten Oligonukleotide kreiert und, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, Expressionskonstrukte erzeugt. Die Korrektheit der eingeführten Mutationen wurde durch Sequenzierung des IE2-C-Terminus überprüft.

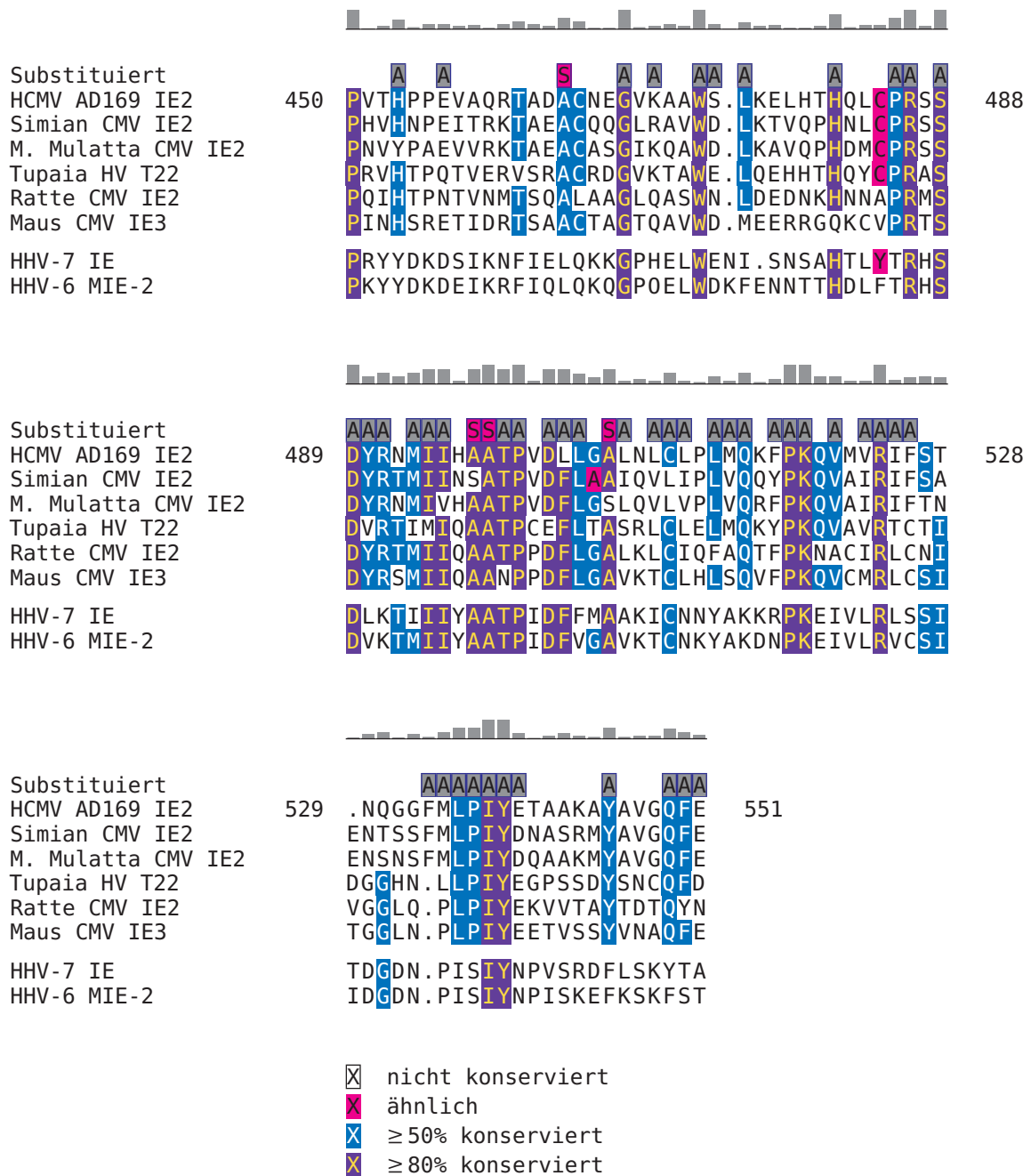
#### 3.2.1.2. Expression

Zunächst sollte festgestellt werden, ob die erzeugten Expressionskonstrukte für die IE2-Mutanten auch zur Expression eines Proteins korrekter Größe und zu vergleichbaren Expressionsbereichen führen. In Abb. 3.3 auf Seite 60 ist hierzu ein repräsentativer *Immunoblot* gezeigt, in Abb. 3.4 auf Seite 61 sind die Mittelwerte aus drei Messungen dargestellt.

Alle Konstrukte führten zur Expression eines Produktes korrekter Größe. Allerdings zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke. Solche Schwankungen sind sowohl aus früheren Experimenten mit IE2 (Wiebusch, 2001; Asmar *et al.*, 2004), als auch aus *alanine scanning*-Analysen in anderer Proteine (Cunningham und Wells, 1989; Pal *et al.*, 2005) bekannt. Es konnte jedoch zumindest für den Zellzyklus gezeigt werden, dass die IE2-Expressionsstärke in einem sehr weiten Bereich kaum einen Einfluss auf die Arrestfunktion hat (Wiebusch, 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit kam es trotz schwacher Expression einiger Konstrukte zu beachtlichen Aktivitäten in den verschiedenen Analysesystemen, während andere, relativ stark exprimierende Konstrukte Funktionsverluste aufwiesen.

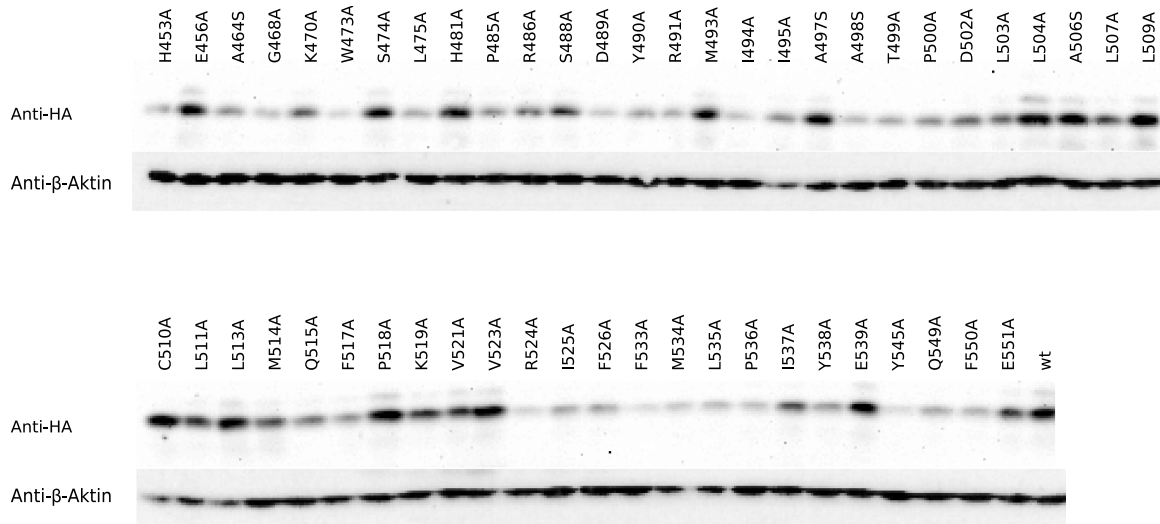
Um die Effekte unterschiedlicher Expressionsstärken auf die Transaktivierungsfunktion von IE2 einschätzen zu können, wurde die Expressionsstärke von IE2-Wildtypprotein durch Transfektion unterschiedlicher Mengen des Expressionskonstrukts moduliert. Aus den Zellextrakten der geernteten Zellen wurden sowohl die Expressionsstärke auf

### 3.2. Struktur-Funktionsanalyse des IE2-Proteins



**Abbildung 3.2.:** Darstellung der Aminosäuresequenzen der zu IE2 homologen Proteine verschiedener CMV Spezies und der humanen Herpesviren 6 und 7 im Bereich der Core-Domäne. In der Zeile direkt oberhalb der Sequenzen sind die Positionen markiert, für welche Punktmutanten erzeugt wurden. Modifiziert nach Barrasa *et al.* (2003). In der obersten Zeile ist der Konservierungsgrad als Höhe der Balken dargestellt. Markierungen und Konservierungsbalken mithilfe der Software TEXshade (Beitz, 2000).

### 3. Ergebnisse

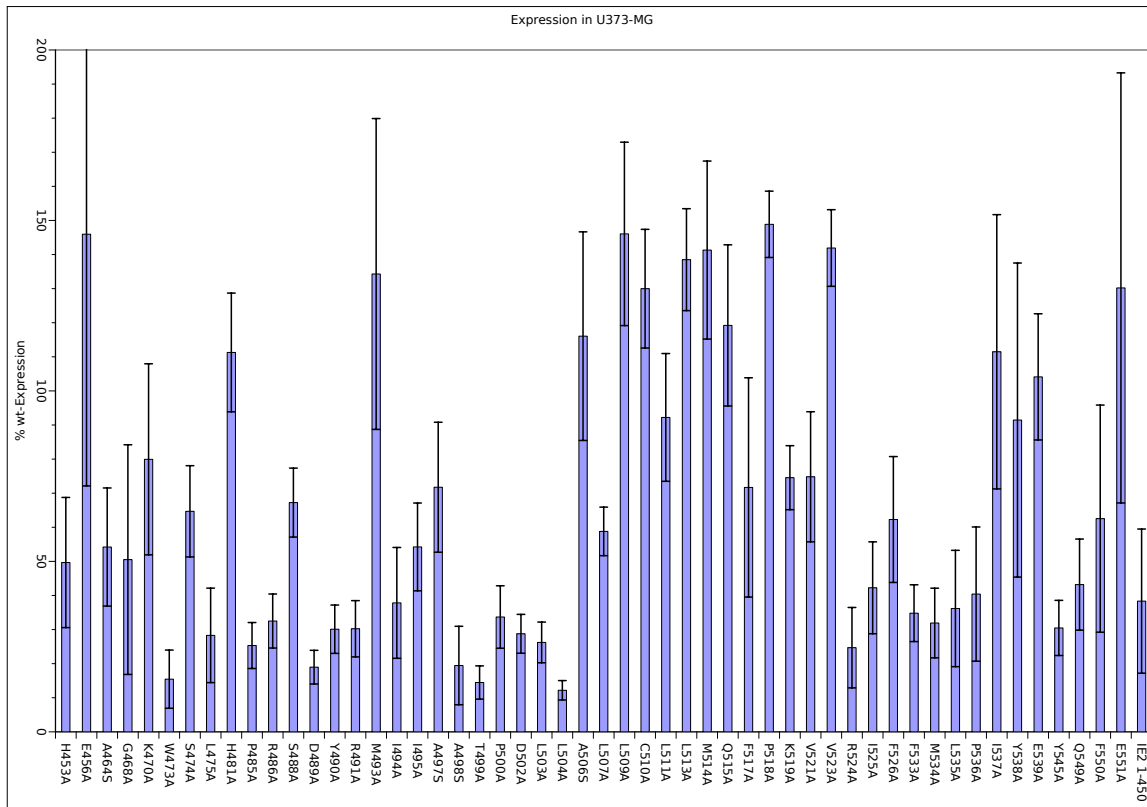


**Abbildung 3.3.:** Immunoblot der mutierten IE2-Proteine im Vergleich zu Wildtyp. Alle Konstrukte wurden in U373-MG-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und durch Sonizierung aufgeschlossen. Nach Proteinmessung wurden gleiche Proteinmengen jeder Probe im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Immunoblot und Chemilumineszenz das, u. a. zu diesem Zweck angekoppelte, HA-Epitop quantitativ nachgewiesen. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels mit Zellextrakt wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin zum Nachweis dieses Zytoskelettproteins benutzt. Die obere Reihe zeigt die mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen das Hämagglutinin-Epitop markierten IE2-Mutanten. In der unteren Reihe befindet sich das Signal für  $\beta$ -Aktin. Digitale Aufnahme mit der Diana-Kamera. Um Einflüsse aus Messfehlern und durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen zu minimieren, wurden die Messungen mindestens dreimal mit Extrakten aus unabhängigen Transfektionen durchgeführt.

Proteinebene, als auch die UL112/113-Promotoraktivierung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5 auf Seite 62 dargestellt.

Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Menge des gebildeten IE2-Proteins und dem Aktivierungsgrad des Reporterkonstrukts. Allerdings bleibt es auch bei schwacher Expression des Wildtypproteins bei einer deutlichen UL112/113-Transaktivierung. In den Extrakten der Zellen, die mit 0,5  $\mu$ g Effektor-DNA transfiziert wurden, lässt sich im Immunoblot keine IE2-Proteinbande mehr erkennen. Trotzdem kommt es noch zu einer fast vierfachen Aktivierung des Luciferasereporters.

Im Gegensatz zu allen anderen Experimenten wurden die Extrakte für die DNA-Bindungsversuche aus HeLa-Zellen gewonnen. Um eventuelle Unterschiede in der Expressionsstärke in den verschiedenen Zelltypen erkennen zu können, wurden auch HeLa-Ganzzelllysate auf das IE2-Expressionsniveau hin analysiert. Hierbei kamen Aliquots der auch in den Gelretardierungsexperimenten verwendeten Extrakte zum Einsatz, so dass sich die dort ermittelten Ergebnisse direkt mit der Expressionsstärke vergleichen



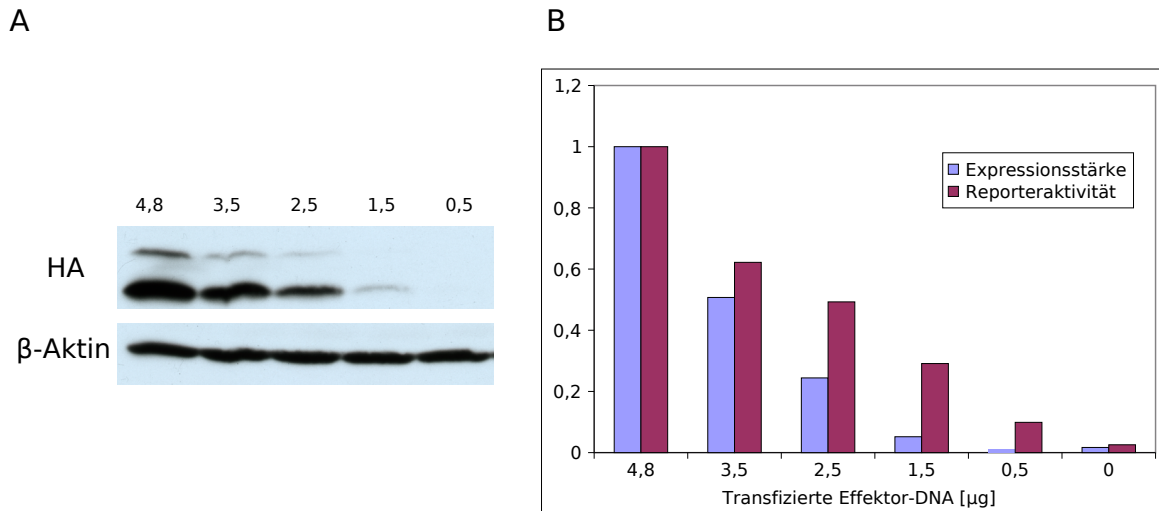
**Abbildung 3.4.:** Expressionsstärke in U373-MG-Zellen. Die Proteinbanden wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen und mit der Software *Aida* quantifiziert. Mittelwerte aus drei Experimenten. Standardfehler als Fehlerbalken.

lassen. Die Resultate sind in Abb. 3.6 auf der nächsten Seite gezeigt. Im Wesentlichen entsprachen die Expressionsniveaus in den HeLa-Zellen denen in U373-MG-Zellen. Insbesondere im Bereich von AS 524–536, in dem sieben Mutanten liegen, ist in beiden Zelltypen das Expressionsniveau deutlich unterdurchschnittlich.

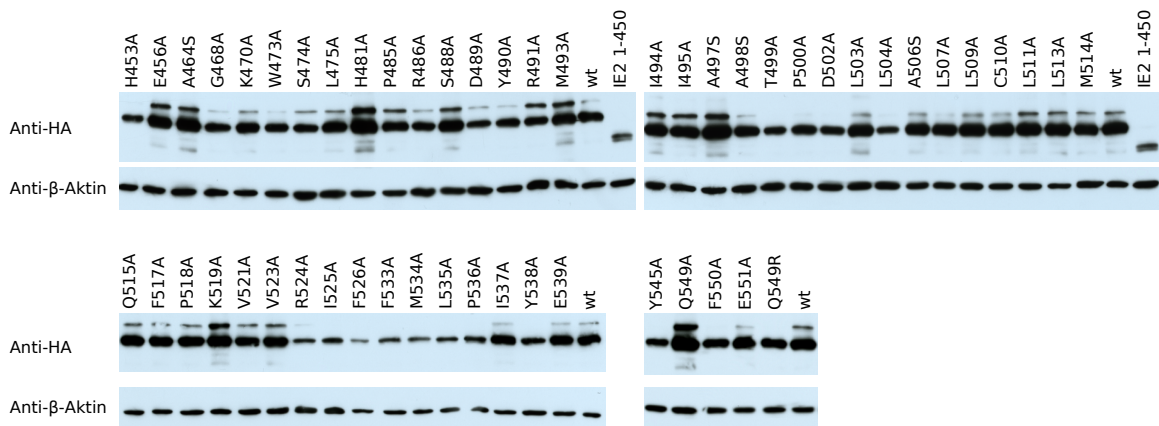
#### 3.2.1.3. Nukleäre Lokalisation

IE2 enthält zwei bekannte nukleäre Lokalisationssignale, die beide außerhalb der *Core*-Domäne liegen (Pizzorno *et al.*, 1991), weshalb eine Beeinflussung der intrazellulären Lokalisation durch die eingeführten Veränderungen unwahrscheinlich erscheint. Trotzdem sollte anhand einer Auswahl von IE2-Mutanten durch Immunfluoreszenz deren nukleäre Lokalisation untersucht werden, da Unterschiede im subnukleären Verteilungsmuster eventuell einen Einfluss auf das Funktions- und Expressionsniveau haben könnten (siehe Abschnitt 1.2.5.2). Zur Klärung dieser Frage wurden Wildtypprotein

### 3. Ergebnisse

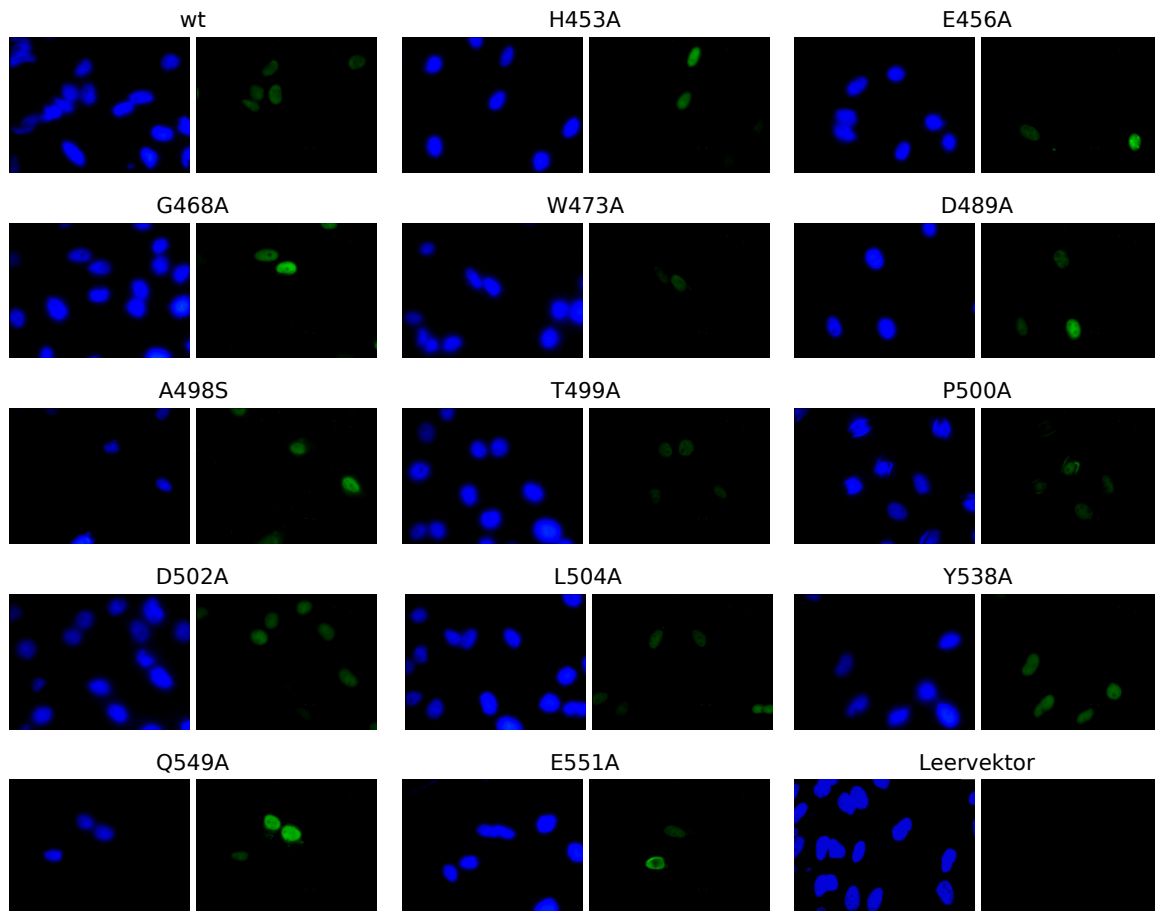


**Abbildung 3.5.:** (A) Verschiedene Mengen des IE2-Wildtypplasmids wurden zusammen mit dem Reporterkonstrukt pHM142 in U373-MG-Zellen transfiziert. Um die DNA-Gesamtmenge konstant zu halten, wurde mit pSG5-Leervektor auf dieselbe Gesamtmenge aufgefüllt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen wie beschrieben geerntet und extrahiert. Gezeigt ist die unterschiedliche Expressionsstärke im Immunoblot aus Ganzzellextrakten unter Verwendung eines Antikörpers gegen das HA-Epitop. (B) Die linken Balken zeigen die mittels der Software *Aida* quantifizierte Expressionsstärken aus (A) als relativen Wert, wobei die Expression nach Transfektion der maximalen Menge Effektor-DNA gleich 1 gesetzt wurde. Die rechten Balken zeigen die korrespondierende UL112/113-Reporteraktivierung. Hierzu wurde wie beschrieben die Luciferaseaktivität aus den Zellextrakten bestimmt. Sie ist in relativen Einheiten angegeben, wobei die Aktivität nach Transfektion der maximalen Menge Effektor-DNA gleich 1 gesetzt wurde.



**Abbildung 3.6.:** Immunoblot der mutierten IE2-Proteine im Vergleich zu Wildtyp. Extrakte aus HeLa-Zellen. Die chemilumineszierenden Banden des Immunoblots wurden auf Röntgenfilm belichtet.





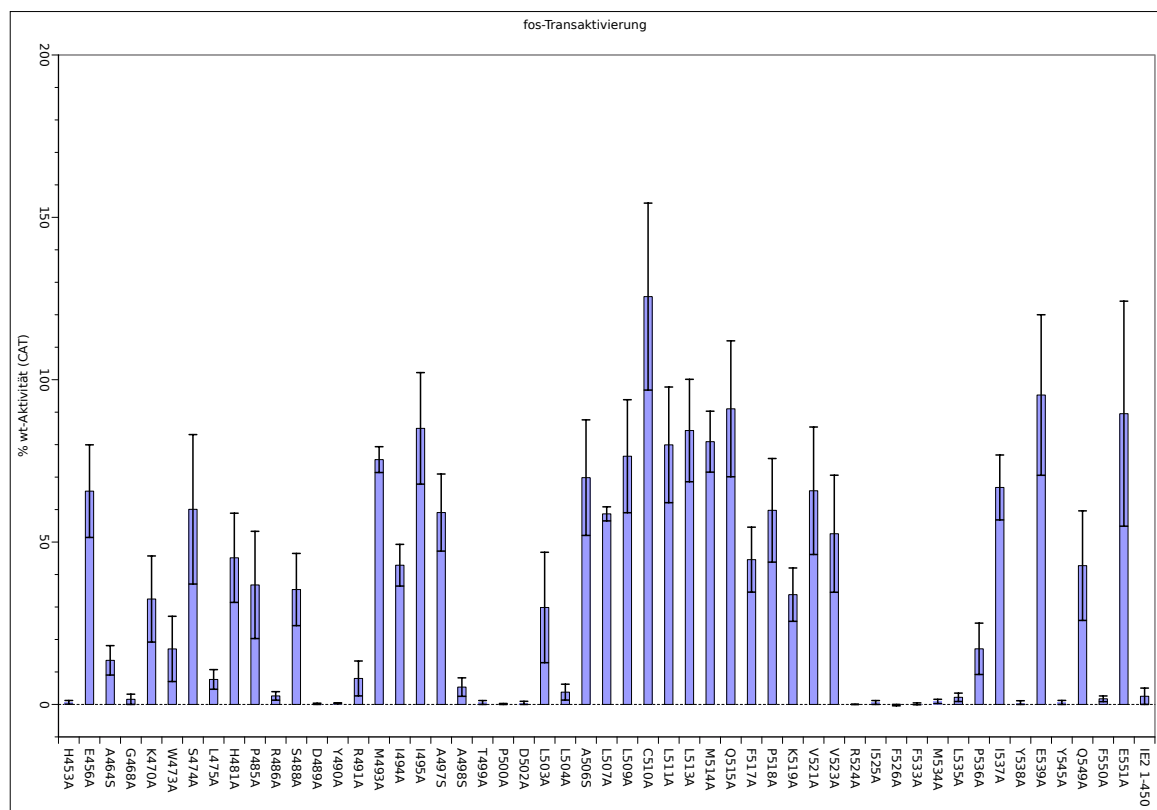
**Abbildung 3.7.:** Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der subzellulären Expression ausgewählter IE2-Mutanten. U373-MG-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit einem gegen das Exon 2 von IE1/2 gerichteten monoklonalen Antikörper und einem, mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Alexa Fluor 488* markierten, Zweitantikörper gefärbt. Außerdem erfolgte eine Färbung des Zellkerns durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Jeweils links in blau ist das DAPI-Signal, rechts in grün das IE2-Signal abgebildet.

und 13 IE2-Mutanten, die sich hinsichtlich Expressionsstärke und Einschränkungen in den einzelnen untersuchten Funktionen unterschieden, in U373-MG-Zellen zur Expression gebracht und mittels Immunfluoreszenz dargestellt, sie sind in Abb. 3.7 gezeigt. Wie erwartet, zeigten sämtliche Mutanten, ebenso wie IE2-Wildtyp, ein rein nukleäres Expressionsmuster ohne Ausbildung klarer Foci.

### 3.2.2. Transaktivierung

Die Transaktivierungsfähigkeit der IE2-Mutanten wurde in zwei unterschiedlichen Analysensystemen untersucht, um so die verschiedenen Wirkmechanismen der IE2-Trans-

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.8.:** Transaktivierung des fos-Promotors. Die IE2-Expressionsvektoren wurden wie beschrieben (siehe 3.1) zusammen mit dem Reporterkonstrukt pfosCAT in U373-MG-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Menge an gebildetem CAT-Enzym gemessen. Die basale Aktivität des fos-Promotors wurde als 0 %, die Aktivität von IE2-Wildtyp als 100 % definiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionen. Der Standardfehler ist als schmaler Balken dargestellt.

aktivierung zu erfassen. In den Arbeiten von Malone *et al.* (1990) und Pizzorno *et al.* (1991) wurde zwar die C-terminale Transaktivierungsdomäne auf einen Bereich kartiert (siehe Abb. 1.5), der außerhalb der hier untersuchten IE2-Mutanten liegt. Dass die Core-Domäne für die Transaktivierung trotzdem essenziell ist, wurde durch Asmar *et al.* (2004) gezeigt, wo alle Substitutionsmutanten in diesem Bereich kaum Transaktivierungsaktivität aufwiesen.

#### 3.2.2.1. fos-Promotoraktivierung

Die Ergebnisse der Transaktivierungsfähigkeit bezüglich des zellulären fos-Promotors sind in Abb. 3.8 dargestellt. Innerhalb der C-terminal gelegenen, sauren Aktivierungsdomäne zeigten zwei der Mutanten (Y545A und F550A) einen praktisch vollständigen

Funktionsverlust, während die beiden anderen Mutanten in diesem Bereich ein Funktionsniveau entsprechend Wildtyp (E551A) bzw. eine beträchtliche Restaktivität (Q549A) aufwiesen.

Der sich unmittelbar N-terminal anschließende Bereich erwies sich ebenfalls als relativ empfindlich: von den zehn Mutanten zwischen AS 524–539 waren sieben in diesem Experiment praktisch funktionslos. Im Gegensatz dazu scheint der Bereich von AS 506–523 robuster gegenüber einzelnen Mutationen zu sein. Die schwächste der 13 Mutanten in diesem Bereich wies immer noch eine Restaktivität von 34 % der Wildtypaktivität auf, die anderen lagen weitgehend auf Wildtypniveau.

Die weiter N-terminal gelegene Hälfte des *Core*-Bereichs stellt sich weniger einheitlich dar. Hier kommen sowohl vollständige und fast vollständige Funktionsverluste, als auch Mutanten mit Restaktivität bis hin zum Wildtypniveau vor. Es ließ sich auch hier ein sensibler Abschnitt zwischen AS 498–504 ausmachen, in welchem allerdings L503A noch auf knapp ein Drittel Wildtypniveau kommt.

#### 3.2.2.2. UL112/113-Promotoraktivierung

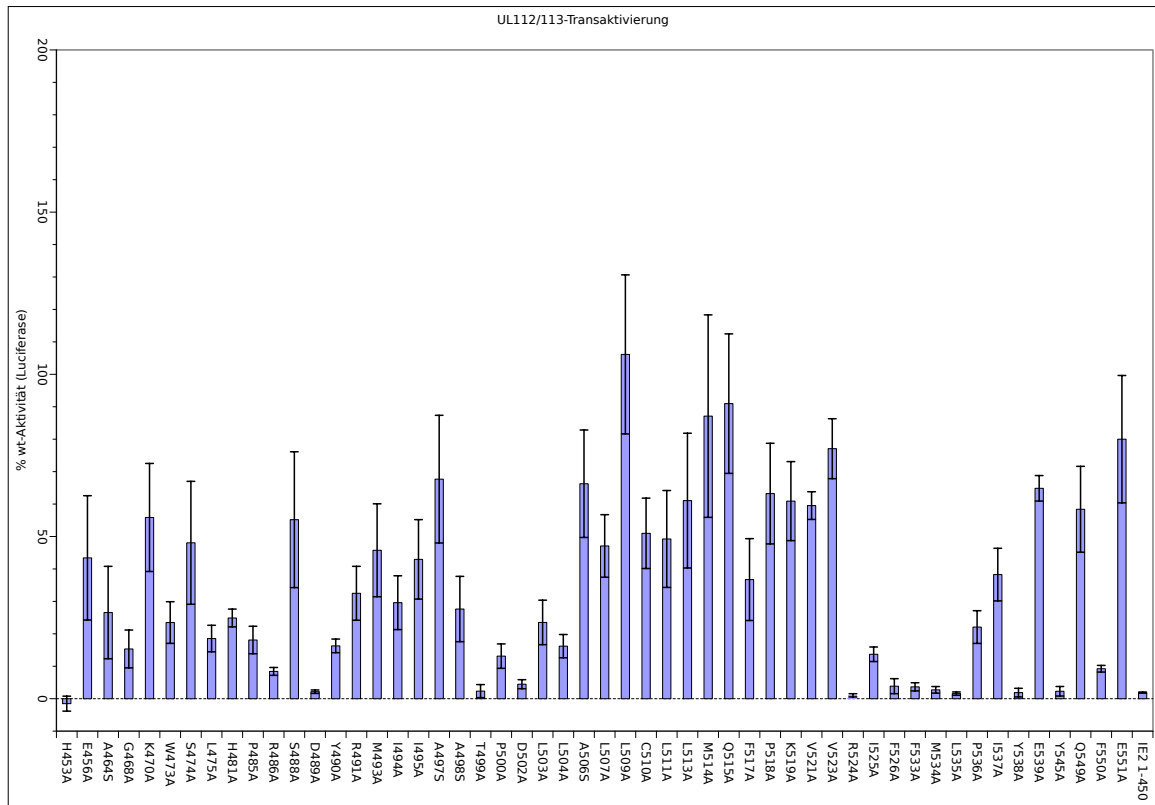
Zur Messung der Transaktivierung des viralen *early*-Promotors UL112/113, kamen Zellen zum Einsatz, die nicht nur mit dem IE2-Effektor- und dem UL112/113-Reporterkonstrukt transfiziert worden waren, sondern parallel auch mit dem Reporterkonstrukt für die Autorepressionsanalysen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.9 auf der nächsten Seite gezeigt.

Im Wesentlichen entsprechen die Ergebnisse denen der *fos*-Transaktivierung. Insbesondere findet sich wieder der Bereich mit weitgehend erhaltener Transaktivierungsfunktion (AS 506–523). Auch die Bereiche, in denen die Mutationen zu einem Ausfall der Promotoraktivierung führten, sind mit AS 524–535, 498–504 und 489–491 dieselben, allerdings findet sich bei einigen Konstrukten bezüglich des UL112/113-Promotors eine stärkere Restaktivität (z. B. G468A, Y490A, A498S, P500A, L504A und I525A).

#### 3.2.3. Autorepression

Die Repression der Transkription vom MIEP-Promotor wird zumindest zum Teil durch Bindung von IE2 an eine als *cis-repressive sequence* (CRS) bezeichnete Sequenz innerhalb des MIEP vermittelt (siehe 1.2.5) (Pizzorno und Hayward, 1990; Cherrington *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991). Die für die CRS-Bindung erforderliche Region in IE2 (AS 347–553) (Waheed *et al.*, 1998; Macias *et al.*, 1996) schließt die *Core*-Domäne vollständig ein.

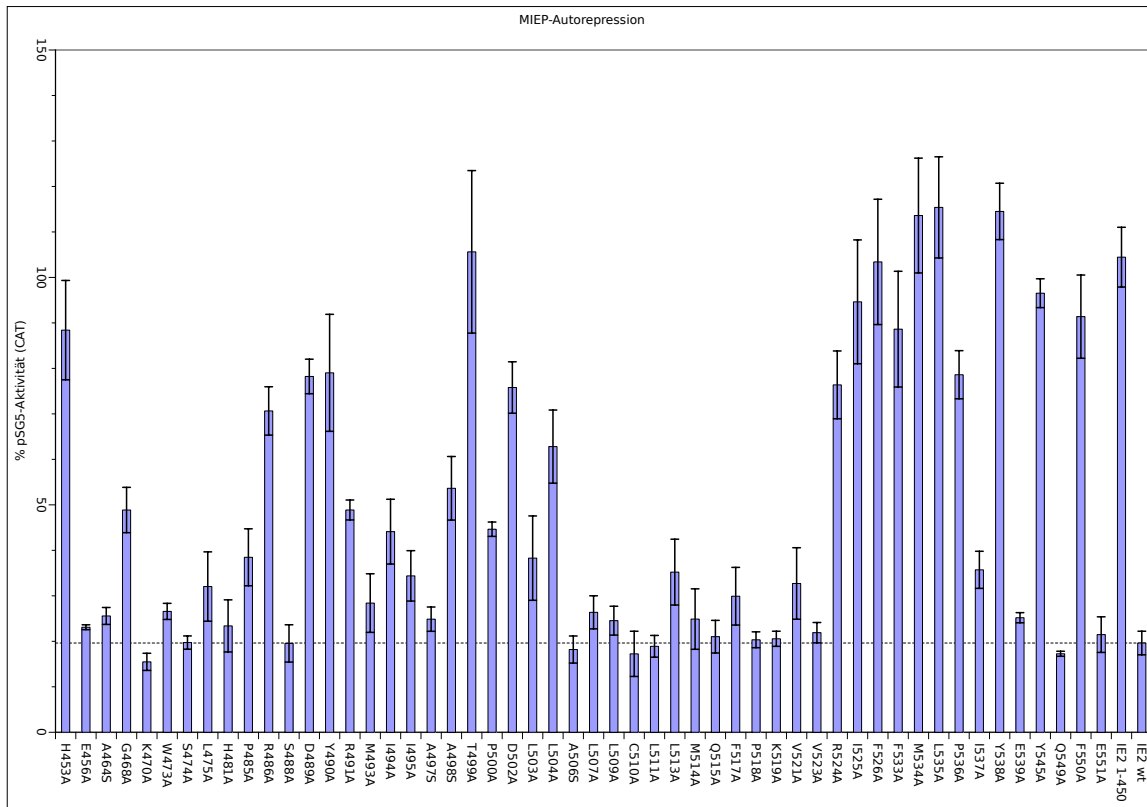
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.9.:** Transaktivierung des UL112/113-Promotors. Die IE2-Expressionsvektoren wurden wie beschrieben zusammen mit den Reporterkonstrukten pHM142 und pRR55 in U373-MG-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität in den Extrakten gemessen. Die basale Luciferaseaktivität wurde als 0 %, die durch IE2-Wildtyp induzierte als 100 % definiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionen. Der Standardfehler ist als schmaler Balken dargestellt.

Die Ergebnisse der Experimente zur Autorepression sind in Abb. 3.10 auf der nächsten Seite dargestellt. Auch diese Ergebnisse korrelieren offensichtlich mit denen der Transaktivierungsversuche. Es zeigen sich auch hier die deutlichsten Effekte in den Abschnitten 524–535 und etwas weniger deutlich 498–504. Die P536A-Mutante, die kaum autoreprimiert, weist allerdings noch eine deutliche Transaktivierungsfähigkeit auf. Der umgekehrte Fall findet sich bei den Konstrukten G468A und P500A, die insbesondere hinsichtlich des fos-Promotors sehr stark eingeschränkt sind, aber die MIEP-Expression noch um etwa die Hälfte reduzieren können.

Die Region von AS 506–523 zeigt sich auch in der Autorepression sehr robust gegenüber den Punktmutationen, auch wenn insbesondere die Konstrukte L513A und V521A nicht ganz auf das Repressionsniveau von Wildtyp-IE2 kommen.

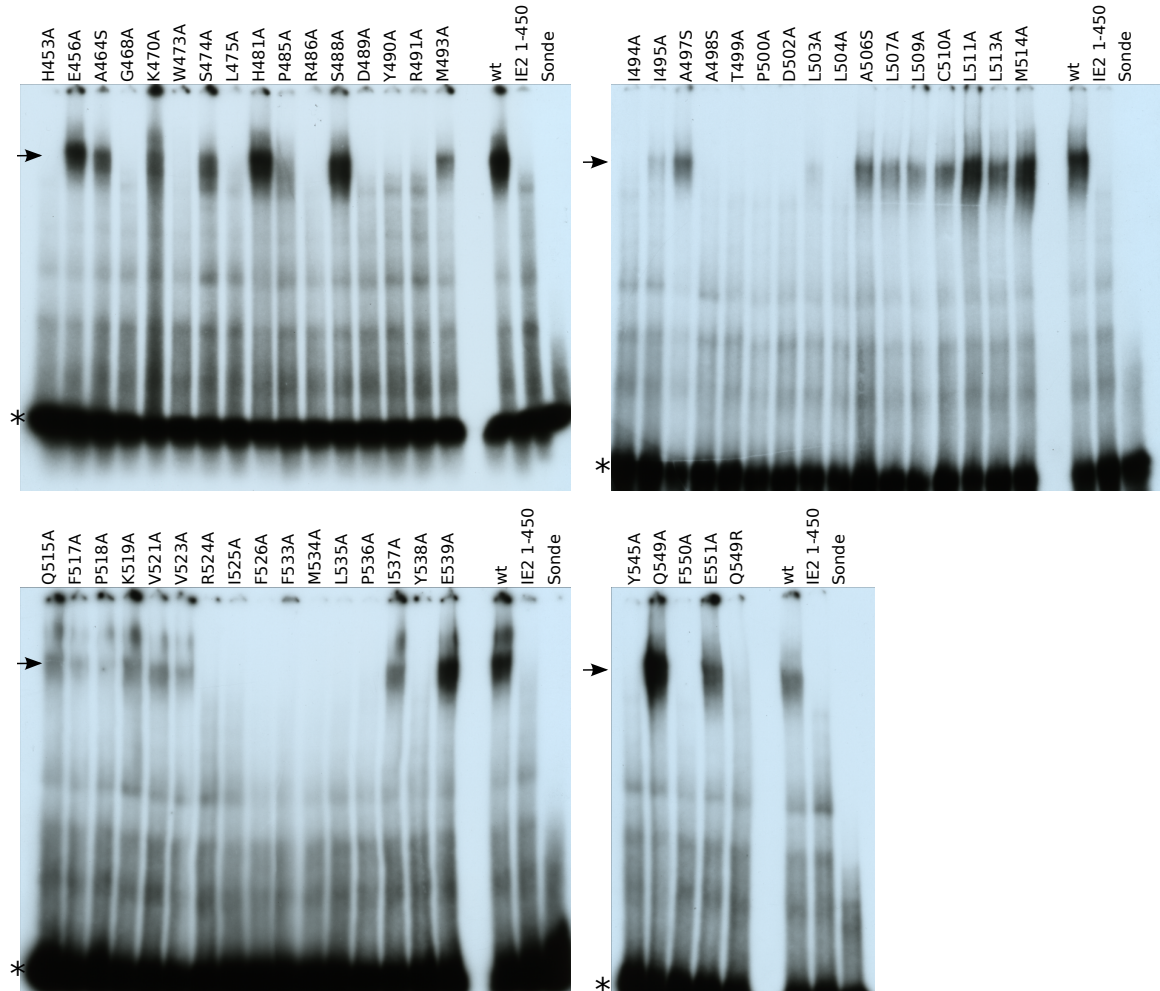


**Abbildung 3.10.:** Autorepressionsaktivität. Die IE2-Expressionsvektoren wurden wie beschrieben (siehe Abb. 3.9) zusammen mit den Reporterkonstrukten pHM142 und pRR55 in U373-MG-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Menge an gebildetem CAT-Enzym gemessen. Die basale Aktivität nach Transfektion von pSG5-3HA-Leervektor wurde als 100 % definiert. Das durch IE2-Wildtyp reprimierte Niveau der Reporterexpression ist durch eine gestrichelte Linie markiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionen. Der Standardfehler ist als schmaler Balken dargestellt.

### 3.2.4. DNA-Bindung

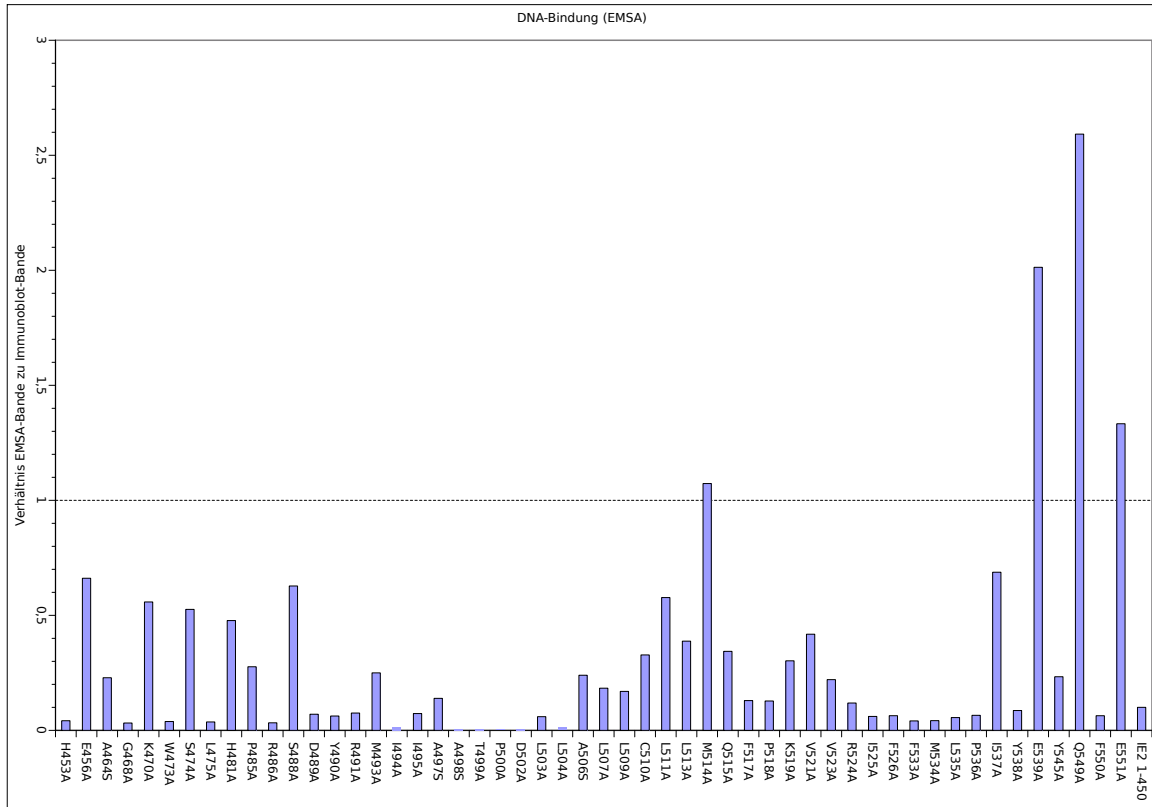
Wie bereits erwähnt, befindet sich die *Core*-Domäne in einem Bereich von IE2, der für die Bindung an die CRS von Bedeutung ist. Deshalb wurde auch die Fähigkeit der IE2-Mutanten, an diese Struktur zu binden, untersucht. Hierzu wurden die Konstrukte, anders als in den bisherigen Experimenten, in HeLa-Zellen exprimiert, da sich hier besonders hohe Transfektionseffizienzen und somit hohe Proteinausbeuten erzielen lassen. Geeignete Bedingungen für den Nachweis der DNA-Bindungsfähigkeit *in vitro* wurden von Asmar *et al.* (2004) beschrieben, wobei ebenfalls Extrakte aus HeLa-Zellen verwendet wurden. Die dort beschriebene Methode kam auch hier zur Anwendung. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.11 auf der nächsten Seite dargestellt.

### 3. Ergebnisse

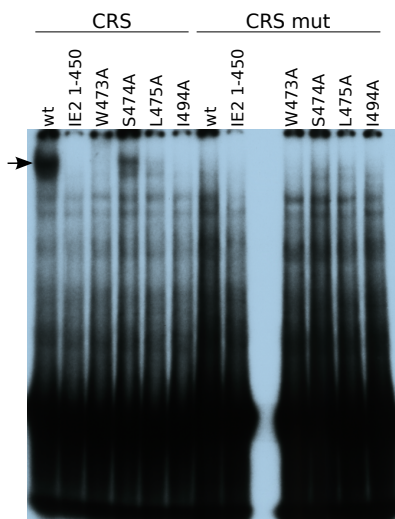


**Abbildung 3.11.:** Autoradiografie der Gelretardierungsexperimente. HeLa-Zellen wurden mit den IE2-Expressionskonstrukten transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und durch schonendes Sonizieren aufgeschossen. Die Extrakte wurden mit einer radioaktiv markierten 62-bp-Sondenduplex, welche die komplette CRS einschloss (siehe Tabelle A.3), inkubiert. Danach wurden die Bindungsansätze auf ein nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der retardierte Komplex aus Sonde und gebundenem IE2 ist mit Pfeilen markiert, während die ungebundene Sondenduplex (\*) am unteren Rand der Gele sichtbar ist.

### 3.2. Struktur-Funktionsanalyse des IE2-Proteins



**Abbildung 3.12.:** DNA-Bindung im Verhältnis zur Expressionsstärke. Die Stärke der Banden aus Abb. 3.11 (Gelretardierung) wurde durch die der Banden aus Abb. 3.6 (Immunoblot) geteilt, wobei in beiden Fällen die Wildtypbande als Referenzwert (=1) verwendet wurde. Das Verhältnis der Banden von Wildtypprotein ist als gestrichelte Linie dargestellt. Werte über dieser Linie entsprechen einer überproportional starken DNA-Bindung, Werte darunter einer unterproportionalen.



**Abbildung 3.13.:** Überprüfung ausgewählter IE2-Mutanten in DNA-Bindungsexperimenten mit mutierter CRS. Zur Erläuterung siehe Abb. 3.11.

### 3. Ergebnisse

Da in diesen Versuchen die Sonden-DNA im Überschuss vorliegt, ist die Stärke der retardierten Banden nicht nur von der Bindungsfähigkeit der Mutanten, sondern auch von ihrer Expressionstärke abhängig. Deshalb wurde ein Aliquot der Extrakte auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das enthaltene IE2 im Immunoblotverfahren mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop wie beschrieben nachgewiesen und quantifiziert (siehe Abb. 3.6 auf Seite 62). Die, jeweils mit der Software *Aida* ermittelten, Bandenstärken im Gelretardierungsexperiment und im Immunoblot wurden zueinander in Beziehung gesetzt, wobei in beiden Fällen die Bande von Wildtyp als Bezugsgröße (=1) verwendet wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.12 auf der vorherigen Seite dargestellt.

Aufgrund von theoretischen Überlegungen und bisherigen Forschungsergebnissen war ein direkter Zusammenhang zwischen Bindungsfähigkeit für die CRS und Autorepressionsaktivität zu erwarten (Pizzorno und Hayward, 1990; Cherrington *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1996; Macias *et al.*, 1996). Tatsächlich weisen alle Mutanten, die in den Gelretardierungsexperimenten eindeutig zur DNA-Bindung in der Lage waren auch Autorepressionsaktivität auf. Diese ist aber nicht immer voll ausgeprägt, nämlich bei den Konstrukten P485A, L513A, V521A und I537A. Umgekehrt zeigen sich noch deutlichere Differenzen: Die Mutanten I494A, L475A und vor allem W473A zeigen deutliche Autorepression, können aber im Gelretardierungsexperiment die Sonde nicht binden.

Um Fehler bei der Probenpräparation auszuschließen, wurden die Gelretardierungsexperimente für die zuletzt genannten Konstrukte mit neuen Extrakten wiederholt, wobei sich das gleiche Bild bot (siehe Abb. 3.13 auf der vorherigen Seite). Die nun bei der L475A-Mutante auf Höhe der Wildtypbande zu erahnende Bande findet sich auch bei mutierter CRS und wird vom Autor als unspezifisch angesehen.

Auch in diesem Experiment zeigte sich die Region von AS 506–523 als relativ unempfindlich gegenüber den gesetzten Mutationen, da hier alle Konstrukte eine messbare Bande im EMSA hervorrufen. In den Bereichen 489–491 sowie 524–536, die sich auch in den Experimenten zu Transaktivierung und Autorepression als vergleichsweise empfindlich herausgestellt hatten, ließ sich bei keiner Mutante eine DNA-Bindung nachweisen. Im Abschnitt 498–504 zeigte lediglich L503A eine schwache DNA-Bindung.

#### 3.2.4.1. In silico-Vorhersage

Die Ergebnisse der *in silico*-Vorhersage der Aminosäurereste mit DNA-Kontakt sind in Tabelle 3.1 auf der nächsten Seite aufgeführt. Im *Core*-Bereich finden sich 11 von



Pos.	AS	DP-Bind	DBS-PSSM	EMSA	Pos.	AS	DP-Bind	DBS-PSSM	EMSA
450	P	+			489	D	+		-
451	V	+			490	Y	+		-
452	T	+			491	R	+	+	-
453	H	+	+	-	492	N	+		
455	P		+		496	H	+		
459	Q	+			508	N	+	+	
460	R	+			517	F	+		(-)
470	K		+	+	524	R	+	+	-
486	R	+	+	-	538	Y		+	-
487	S	+	+		543	K	+	+	
488	S		+	+					

**Tabelle 3.1.:** Vorhersage des DNA-Kontakts mit den Programmen *DP-Bind* und *DBS-PSSM*. In der letzten Spalte ist bei Resten, zu denen experimentelle Daten aus den Gelretardierungsexperimenten vorlagen, angegeben, ob die Mutante DNA-Bindung zeigte (+) oder nicht (-).

insgesamt 152 (*DBS-PSSM*) bzw. 17 von 42 (*DP-Bind*) Resten mit DNA-Kontakt. In sieben Fällen wurden von beiden Programmen identische Reste identifiziert.

### 3.2.5. Zellzyklusarrest

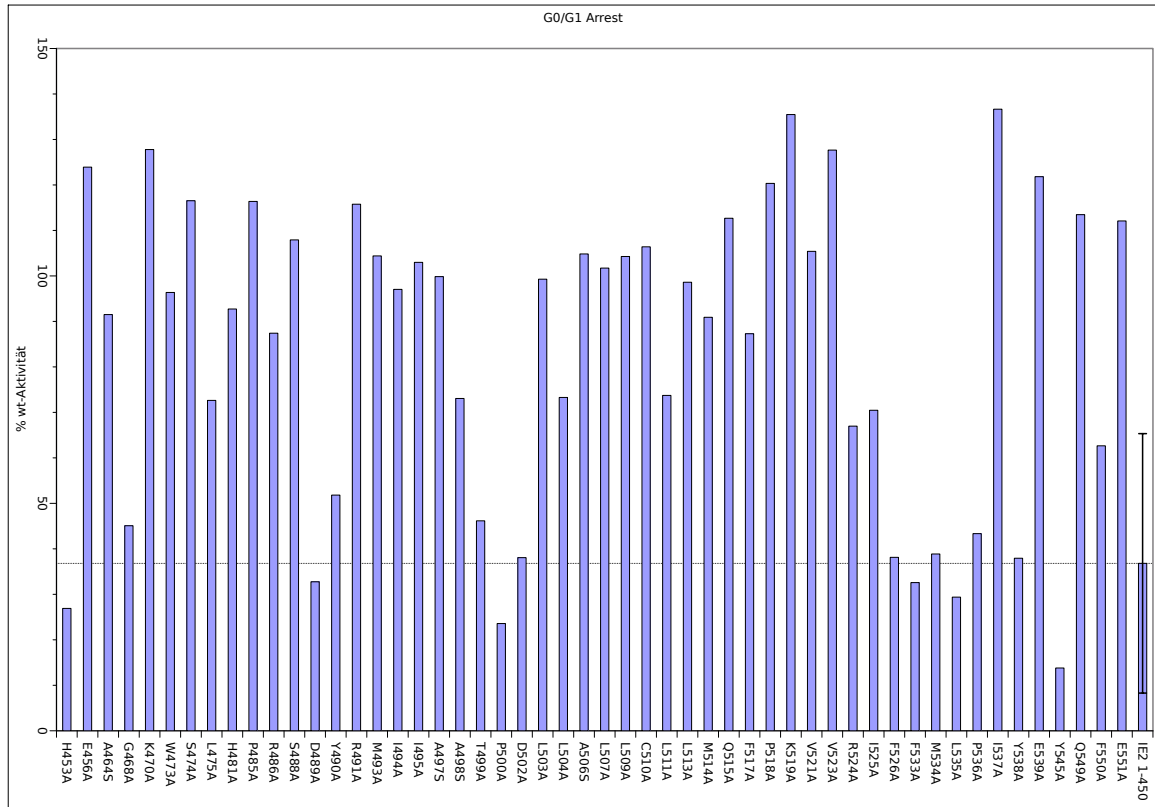
Die *Core*-Region ist im Gegensatz zu den anderen untersuchten IE2-Funktionen für den Zellzyklusarrest nicht absolut essenziell. Die C-terminale Deletionsmutante IE2 (1–450), bei der die *Core*-Domäne komplett fehlt, weist noch eine deutliche Restaktivität auf (siehe Abschnitt 3.1; Asmar *et al.* 2004).

Allerdings führten alle von Asmar *et al.* (2004) untersuchten Substitutionsmutationen innerhalb des *Core*-Bereichs zu einer Reduktion des Arrestphänotyps gegenüber Wildtyp.

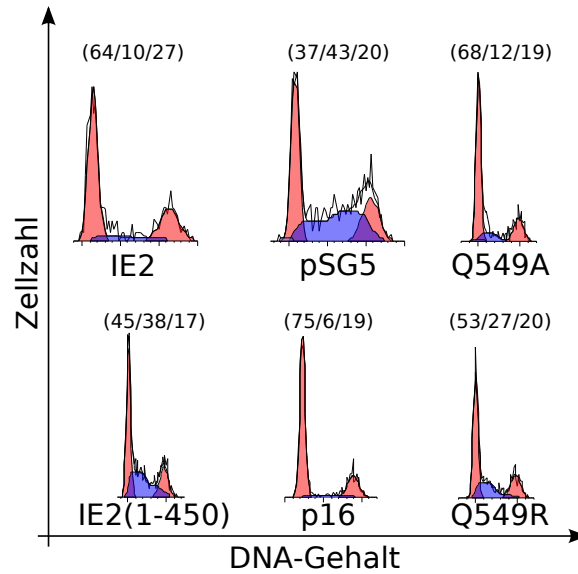
Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit auch diese Funktion untersucht werden. Die IE2-Mutanten wurden hierzu in U373-MG-Zellen zur Expression gebracht. Zur Transfektionskontrolle wurde ein Expressionskonstrukt für das humane B-Lymphozytenoberflächenprotein CD-20 kotransfiziert. Über eine Anfärbung dieses Proteins mit Fluoreszenzfarbstoff konnte eine Selektion der transfizierten Subpopulation in der Durchflusszytometrie erfolgen, sodass es möglich wurde, nur diese Zellen hinsichtlich ihres DNA-Gehaltes zu erfassen.

Die Messung des DNA-Gehaltes erfolgte durch Anfärbung der DNA der permeabilisierten Zellen mit Propidiumiodid. Am DNA-Gehalt lässt sich die Zellzyklusposition der

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.14.:** Zellzyklusarrest. U373-MG-Zellen wurden parallel mit den mutierten IE2-Expressionskonstrukten und einem CD20-Expressionskonstrukt transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und die enthaltene DNA mit Propidiumiodid gefärbt. Das CD20-Oberflächenprotein wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper markiert. Der DNA-Gehalt der Einzelzellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt, wobei nur diejenigen Zellen zur Auswertung kamen, deren CD20-Signal mindestens 20-fach über dem der untransfizierten Zellpopulation lag. Aus den so ermittelten Daten wurden mithilfe der Software *Modfit* die Anteile der verschiedenen Zellzyklusphasen berechnet. Der  $G_{1/0}$ -Anteil in der mit Leervektor transfizierten Population wurde als 0 % der der mit IE2-Wildtyp transfizierten als 100 % Wildtypaktivität definiert. Die gepunktete Linie entspricht der durchschnittlichen Zellzyklusarrestaktivität der C-terminalen Deletionsmutante IE2 (1–450).



**Abbildung 3.15.:** Q549-Mutanten. Transfektion und Ernte erfolgten wie in Abb. 3.14 beschrieben. Dargestellt sind die Zellzyklushistogramme (dünne Linien) mit den durch das Programm *Modfit* ermittelten Zellzyklusphasenanteilen. Die berechneten G<sub>1</sub>/S- und G<sub>2</sub>-Gipfel sind rot, das S-Phase-Plateau blau dargestellt. Die prozentualen Anteile der Zellzyklusverteilung sind in den Klammern über den Grafiken für G<sub>1</sub>/S/G<sub>2</sub> angegeben.

einzelnen Zellen erkennen. In allen G<sub>1</sub>/S-Zellen ist er identisch, in allen G<sub>2</sub>- und M-Zellen liegt er beim doppelten des Wertes für die G<sub>1</sub>-Zellen. Beide Subpopulationen zeigen sich im Histogramm des Propidiumiodid-Fluoreszenzsignals als deutliche Gipfel (siehe Abb. 3.1). Während der S-Phase führt die kontinuierliche DNA-Synthese zu einem DNA-Gehalt, der zwischen den beiden Gipfeln liegt, sodass sich diese Zellen im Histogramm als Plateau zwischen den beiden Gipfeln darstellen.

Obwohl die Auflösung dieses Analysesystems es nicht erlaubt, zwischen Zellen in der G<sub>1</sub> und solchen in der frühen S-Phase zu differenzieren (Wiebusch und Hagemeier, 2001), ist dieses geeignet, um den CMV vermittelten Arrest deutlich zu erkennen. Die am G<sub>1</sub>/S-Übergang arretierten Zellen erscheinen hierbei im G<sub>1</sub>/S-Gipfel, da es in ihnen nicht mehr zu nennenswerter DNA-Replikation kommt (Wiebusch und Hagemeier, 2001).

Bei der Analyse der IE2-transfizierten Zellen wurde so verfahren, dass der Anteil der Zellen im G<sub>1</sub>/S-Gipfel, der über das Niveau von mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen hinausgeht berechnet wurde. Die Ergebnisse der Mutanten wurden zur Aktivität von IE2-Wildtyp in Beziehung gesetzt, wobei die letztere als 100 % definiert wurde. Sie sind in Abb. 3.14 auf der vorherigen Seite dargestellt.

### 3. Ergebnisse

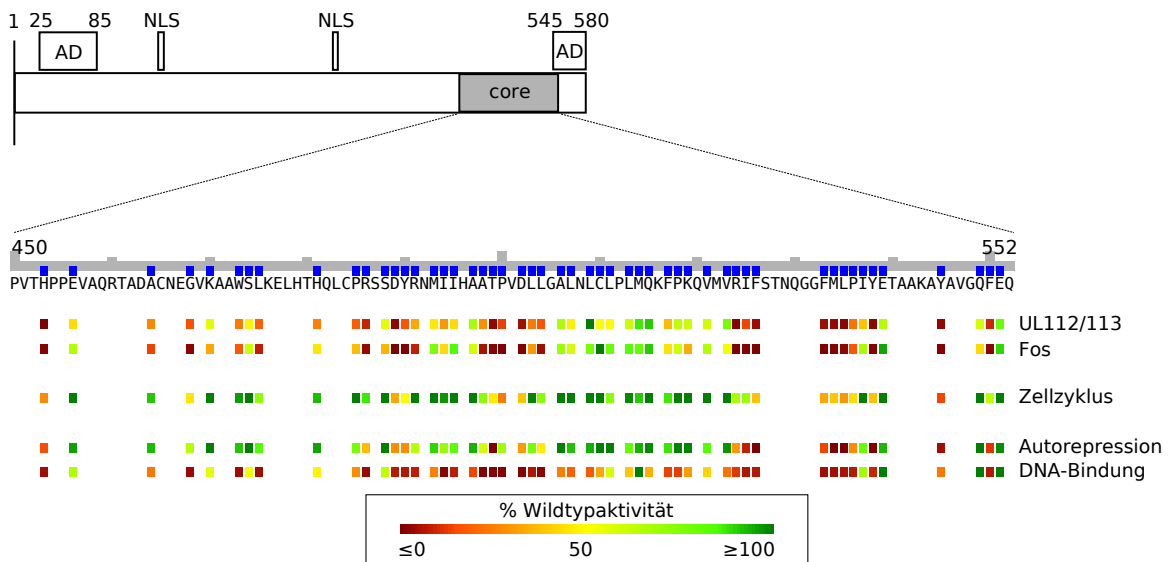
Wie erwartet, lag der Anteil der  $G_{1/0}$ -Fraktion bei allen Konstrukten über dem der pSG5-transfizierten Kontrollzellen. Bis auf eine Ausnahme (Y545A) kamen alle Mutanten mindestens auf das Funktionsniveau der C-terminalen Deletionsmutante IE2 (1–450). In der Region der AS 506–523 fanden sich auch in diesem Experiment keine Mutanten mit drastischen Funktionseinbußen, lediglich L504A und L511A erreichten nicht ganz das Wildtypniveau. Relativ wenige Mutanten lagen im intermediären Bereich von 50–85 % der wt-Aktivität (L475A, Y490A, A498S, L504A, L511A, R524A, I525A und F550A), sodass sich für die restlichen Konstrukte im Wesentlichen ein dichotomes Verteilungsmuster zwischen Wildtypniveau und dem von IE2 (1–450) ergibt. In den in Experimenten zu Transaktivierung, Autorepression und DNA-Bindung zeigten sich drei Bereiche besonders empfindlich für die eingeführten Mutationen. Diese ließen sich auch hier wiederfinden, wobei aber in einzelnen Positionen deutliche Unterschiede bestanden. Im Bereich 489–491 zeigte R491A volle Arrestfunktion, ebenso im Bereich 499–503 L503A. Der Abschnitt 524–536 zeigte einen sehr deutlichen Verlust an Zellzyklusarrestfunktion, wobei die Mutanten R524A und I525A diesbezüglich im intermediären Bereich lagen.

#### **Die Q549R-Mutante**

Noch während der Durchführung der praktischen Versuche zu der vorliegenden Arbeit wurde von Petrik *et al.* auf dem 30. Herpesvirusworkshop über die IE2 Mutante Q549R (548 in Towne-Nummerierung) berichtet, die in ihren Experimenten nicht mehr in der Lage war, einen Zellzyklusarrest hervorzurufen, jedoch noch zu Transaktivierung und Autoregulation befähigt war. Diese Arbeiten wurden später als Zeitschriftenaufsatz veröffentlicht (Petrik *et al.*, 2006). Um diese Ergebnisse mit den eigenen vergleichen zu können, wurde in pSG5-3HA ein weiteres Expressionskonstrukt mit diesem Genotyp erzeugt. Dieses Konstrukt wurde ebenfalls in U373-MG-Zellen zur Expression gebracht und wie beschrieben die Zellzyklusarrestfunktion im Durchflusszytometer bestimmt. Die hierbei ermittelten Daten sind in Abb. 3.15 auf der vorherigen Seite gezeigt.

Im hier verwendeten experimentellen System zeigt die Q549R-Mutante eine gegenüber IE2-Wildtyp reduzierte Zellzyklusarrestfunktion, die jedoch nicht auf dem Niveau der Leervektorkontrolle und auch nicht auf dem der C-terminalen Deletionsmutante IE2 (1–450) liegt. Sie erreicht 54 % der Wildtypaktivität und liegt damit, relativ zu den hier untersuchten Konstrukten, im intermediären Bereich.

Die Reihenfolge der Experimente erlaubte es, die Q549R-Mutante auch hinsichtlich der DNA-Bindung mit einzubeziehen. Hier zeigte sich im Gelretardierungsexperiment keine sichtbare Bande (siehe Abb. 3.11 auf Seite 68).



**Abbildung 3.16.:** Übersichtsdarstellung der Einzelfunktionen im Zusammenhang. Gezeigt ist der *Core*-Bereich als vergrößerter Ausschnitt aus IE2. In der obersten Zeile sind alle substituierten AS als blaue Kästchen dargestellt. Darunter sind die Ergebnisse der einzelnen Funktionsuntersuchungen in Prozent der Wildtypaktivität durch verschiedenfarbige Kästchen visualisiert.

### 3.2.6. Die Funktionen im Überblick

In den bisherigen Abschnitten wurden die Ergebnisse der einzelnen Funktionsuntersuchungen ausführlich dargestellt. In Abb. 3.16 werden die Mutanten nun noch einmal in übersichtlicher Form und unter Einbeziehung ihrer Position in der *Core*-Domäne gezeigt. Hier zeigt sich deutlich, dass die Mutanten in der Region von AS 524–536 in allen hier untersuchten Funktionen kaum, bzw. beim Zellzyklusarrest relativ geringe, Aktivität haben. Im Gegensatz dazu scheinen Mutationen im Bereich 506–523 allenfalls auf die DNA-Bindung einen moderaten Effekt zu haben. Unterschiede zwischen den einzelnen Funktionen finden sich vor allem bei Konstrukten mit insgesamt relativ starker Restaktivität. Nur wenige Mutanten mit Totalausfällen in einzelnen Funktionen haben in den anderen – mit Ausnahme der Zellzyklusbeeinflussung – noch Restaktivität, so die bereits erwähnten Y490A, A498S, L504A und I525A mit Unterschieden in der Transaktivierung von fos und UL112/113. P536A hat einen fast vollständigen Verlust der Autorepression, während die Transaktivierung noch deutliche Restaktivität zeigt. Schließlich sind G468A und P500A in Bezug auf die Transaktivierungsfunktionen untereinander, aber insbesondere auch in Bezug auf die Unterschiede zwischen der Transaktivierung und der Autorepression, auffällig.



## 4. Diskussion

IE2 ist ein multifunktionales Protein (Übersicht in: Stinski und Meier, 2007), das für das Zytomegalievirus von essenzieller Bedeutung ist (Heider *et al.*, 2002a). Deshalb bildet es auch einen der Schwerpunkte in der CMV-Forschung und in der Suche nach neuen Therapiezielen.

Gerade die Wichtigkeit von IE2 stellt aber auch eine Schwierigkeit in der Erforschung dar, weil IE2 deletierte Viren nicht vermehrungsfähig sind. Zwar wurden bereits Zelllinien erzeugt, die IE2 stabil exprimieren und somit theoretisch in der Lage wären, die Vermehrung von IE2 deletiertem Virus zu erlauben (Bonin und McDougall, 1997), doch konnte gezeigt werden, dass das IE2 dieser Zellen mutiert und nonfunktional ist (Murphy *et al.*, 2000). Auch Yuo *et al.* (1992) und Zhu *et al.* (1995) haben stabil IE2 exprimierende Zelllinien etabliert, verwendeten aber nichtviruspermissive HeLa-Zellen für diese Experimente.

Insgesamt erscheint logisch, dass ein intakter Zellzyklusarrestphänotyp – der auch in HeLa-Zellen beobachtet wurde (Wiebusch und Hagemeyer, 1999) – nicht mit der Etablierung einer vermehrungsfähigen Zelllinie vereinbar ist. Für die veröffentlichten Zelllinien ist deshalb wie gesagt davon auszugehen, dass entweder das dort exprimierte IE2 zumindest in Bezug auf die Arrestfunktion dysfunktional ist oder es im Verlauf ihrer Selektion in den transfizierten Zellen zu genomischen Veränderungen gekommen ist, die den Arrestphänotyp aufheben.

Die Forschung wird des Weiteren dadurch erschwert, dass IE2 mit einer Vielzahl von Proteinen viralen und zellulären Ursprungs interagiert (Übersicht in: Stinski und Meier, 2007; White und Spector, 2007) und nicht alle Interaktionspartner bekannt sind. Auch die Relevanz bestimmter bekannter Interaktionen hinsichtlich einzelner Funktionen – insbesondere des Zellzyklusarrests – ist noch nicht vollständig aufgeklärt (siehe Abschnitt 1.2.5.2). Deshalb wäre eine auch nur annähernd vollständige Untersuchung auf das Bindungsverhalten einer größeren Anzahl von IE2-Mutanten mit erheblichem Aufwand verbunden. Hinzu kommt, dass IE2 zahlreichen posttranslationalen Modifikationen unterworfen ist, die die Validität von Ergebnissen aus heterologen Expressionssystemen einschränken (Harel und Alwine, 1998; Hofmann *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2001; Barrasa *et al.*, 2005).

#### 4. Diskussion

Hauptsächlich durch Mutations- und Deletionsstudien, konnten einige (Primär-)Struktur-Funktionsbeziehungen des IE2-Proteins definiert werden. Allerdings liegen bisher keine experimentellen Daten zu Sekundär- und Tertiärstruktur dieses wichtigen Proteins vor, insbesondere fehlen Röntgenstruktur- oder Magnetresonanzspektroskopiedaten. Lediglich eine *in silico*-Analyse des C-Terminus erlaubt gewisse, diesbezügliche Vorhersagen (Barrasa *et al.*, 2003). Da jedoch auch zu verwandten Proteinen bisher keine Strukturdaten vorliegen, die als Vorlage für die *in silico*-Strukturvorhersage dienen könnten, ist diese als hoch spekulativ anzusehen (Barrasa *et al.*, 2003).

Wie bereits in der Einleitung (Abschnitt 1.3) erwähnt, wurde in früheren Arbeiten in unserem Labor ein als *Core*-Domäne bezeichneter Bereich identifiziert, der in allen untersuchten Funktionen sehr sensibel auf Mutationen reagierte (Asmar *et al.*, 2004; Asmar, 2004). Es war daher davon auszugehen, dass in diesem Bereich – der zwischen verschiedenen  $\beta$ -Herpesviren hoch konserviert ist – besonders wichtige Aminosäureseitenketten für die globale IE2-Struktur und/oder spezifische IE2-Funktionen zu finden sind. Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, durch systematische Einzelpunktmutation die Bedeutung einzelner Seitenketten in diesem Bereich zu erforschen.

### 4.1. Mutationsstrategie

Die Substitution einzelner Aminosäuren ist mittlerweile eine Standardmethode zur Aufklärung von Proteinstruktur-Funktionsbeziehungen (El-Gewely *et al.*, 2005). Hierbei werden unterschiedliche Strategien angewandt. Die systematische Substitution aller oder eines Teils der Aminosäuren zu Alanin wird als *alanine scanning mutagenesis* bezeichnet (Cunningham und Wells, 1989). Sie wurde zuerst zur Charakterisierung der Bindungsregion zwischen humanem Wachstumshormon und seinem Rezeptor angewandt (Cunningham und Wells, 1989). Inzwischen wurde *alanine scanning* in einer Vielzahl von Fragestellungen zu Protein-Protein-Interaktionen, aber auch in der Erforschung von Eiweißen ohne bekannte Bindungspartner, eingesetzt (Übersicht in: DeLano, 2002).

Durch die Substitution zu Alanin werden alle Seitenkettenatome der betreffenden Aminosäure hinter dem  $\beta$ -C-Atom amputiert, sodass als Rest nur eine Methylgruppe verbleibt. Im Gegensatz zu Glycin, welches nur ein H-Atom als Seitenkette besitzt, führt der Einsatz von Alanin aber nicht zur Einführung größerer Flexibilität in das Proteinrückgrat (Cunningham und Wells, 1989; Wells, 1992).

Prolin und Glycin als besondere Imino-/Aminosäuren in der Originalsequenz bieten



dabei neben Alanin selbst Schwierigkeiten. Wird Glycin zu Alanin substituiert, wird die jeweilige Seitenkette um eine Methylgruppe vergrößert und die Flexibilität der Konformation der Hauptkette eingeschränkt.

Prolin hingegen schränkt durch seine starre Ringstruktur die Rückgratflexibilität ein, sodass ein Alanin als Substituent diese erhöht. Andererseits erlaubt es im Gegensatz zu den Aminosäuren eine *cis*-Konfiguration der Peptidbindung. Bei der Planung von *alanine scanning* Experimenten zu Protein-Protein-Interaktionen wird daher oft auf die Mutagenese von Glycinen und Alaninen verzichtet, da auf dieser Basis keine valide Aussage zum spezifischen Beitrag der betreffenden Positionen zur Bindungsenergie gemacht werden kann (Wells, 1992).

Die abweichende Fragestellung in der vorliegenden Arbeit ließ es allerdings sinnvoll erscheinen, auch stark konservierte Alaninreste zu mutieren. Hierzu wurde Serin als Substituend ausgewählt. Serin unterscheidet sich nur durch eine Hydroxylgruppe am  $\beta$ -C-Atom von Alanin, ist aber im Gegensatz zu diesem polar. Auf die Mutation von Glycinen wurde verzichtet. Die einzige Ausnahme bildet das zwischen allen betrachteten IE2-homologen Proteinen konservierte Glycin an Position 468 (siehe Abb. 3.2), das durch Alanin substituiert wurde. Trotz ihrer Sonderrolle für die Proteinhauptkette werden Proline in den meisten *alanine scanning* Untersuchungen wie die eigentlichen Aminosäuren zu Alanin mutiert (da eine Erweiterung der Rückgratflexibilität ein geringeres Problem als ihre Beschränkung darstellt) (Cunningham und Wells, 1989; Pal *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenso verfahren.

Die gewählte Mutationsstrategie bedingt, dass nicht alle Substitutionen in ihren potenziellen Auswirkungen vergleichbar sind. So ist von der Mutation kleiner hydrophober Reste zu Alanin ein geringerer Effekt zu erwarten, als von der Mutation großer polarer oder geladener Reste. Trotzdem finden sich unter den Ergebnissen Beispiele für drastische Effekte auch wenig eingreifender Mutationen (z. B. L535A, A498S), ebenso wie relativ geringe Auswirkungen größerer Modifikationen (z. B. E456A, Q549A).

## 4.2. Unterschiede in der Expressionsstärke

Bei der Substitution der verschiedenen Aminosäuren wurde einerseits versucht, die Veränderungen der DNA-Sequenz so gering wie möglich zu halten, andererseits sollten, wo immer möglich, neue Restriktionsschnittstellen eingeführt werden. Deshalb wurden alle vier möglichen Alanin-Codons verwendet. Die Benutzung synonymen Codons ist in der Natur nicht zufällig verteilt und unterscheidet sich unter anderem zwischen Wirts-

#### 4. Diskussion

Codon	Min.	Mittel	Max.	n
GCA	71,69 %	95,46 %	119,22 %	2
GCC	24,69 %	62,56 %	148,86 %	21
GCG	12,19 %	85,22 %	146,06 %	17
GCT	25,01 %	65,26 %	105,23 %	8
Gesamt	12,19 %	72,41 %	148,86 %	48

**Tabelle 4.1.:** Expression der Alanin-Mutanten nach verwendetem Codon. Angaben in Prozent der Wildtypexpression in U373-MG-Zellen.

organismen und ihren Viren. Die zugrundeliegenden Mechanismen für diese Verteilung sind noch nicht verstanden (Grantham, 2005). Ein starker Einfluß nur eines einzelnen Codons auf die Expressionsstärke erscheint unwahrscheinlich, soll hier aber trotzdem diskutiert werden. In Tabelle 4.1 sind Durchschnittswerte, Minima und Maxima der Expression für die verschiedenen Alanincodons aufgeführt. Bei allen Codons kommt es zu Expressionsmaxima oberhalb des Wildtypniveaus, ebenso finden sich bei allen auch schwach exprimierende Vertreter. Das GCA-Codon bildet eine Ausnahme, die allerdings leicht dadurch zu erklären ist, dass es lediglich in zwei Fällen zum Einsatz kam.

Eine weitere mögliche Ursache für die beobachteten Expressionsunterschiede könnte in der Qualität der transfizierten DNA liegen. Es ist bekannt, dass die Transfektionseffizienz in hohem Maße von der zirkulären Form der transfizierten Plasmide abhängt (Chen und Okayama, 1987). Durch die verwendete Methode der DNA-Präparation und die Überprüfung der Präparationsergebnisse durch Gelelektrophorese können solche Einflüsse aber weitgehend ausgeschlossen werden.

Theoretisch ist ebenfalls denkbar, dass eine niedrige Expression durch Hintergrundmutationen im Bereich des HA-Epitops, dass zur Expressionskontrolle im Immunoblot nachgewiesen wurde, nur vorgetäuscht wird, indem die Affinität zum verwendeten Anti-HA-Antikörper herabgesetzt wird. Auch wenn dies im Einzelfall nicht ausgeschlossen werden kann, erscheint es äußerst unwahrscheinlich, dass dieser Faktor in größerem Maße Einfluss auf die Ergebnisse haben könnte.

Wie bereits erwähnt, kommen schwach exprimierende Mutanten beim *alanine scanning* relativ häufig vor. Dies wird häufig dadurch erklärt, dass durch Veränderungen von im Proteinkern verborgenen Aminosäureseitenketten die korrekte Proteinfaltung drastisch erschwert wird. Die fehlgefalteten Proteine induzieren in der Zelle eine als *heat shock response* bezeichnete Reaktion, in deren Folge die betroffenen Proteine einem beschleunigten Abbau unterliegen können (Übersicht in: Wickner *et al.*, 1999). Möglich

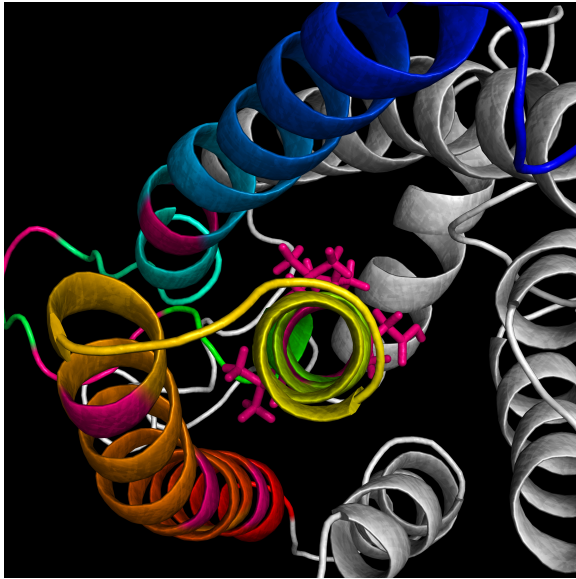
Mutante	∅ Expression	Zugänglichkeitsvorhersage
L504A	12,19 %	Verborgen
T499A	14,47 %	Verborgen
W473A	15,46 %	Verborgen
D489A	18,97 %	Keine
A498S	19,45 %	Verborgen
R524A	24,69 %	Verborgen
P485A	25,32 %	Keine
L503A	26,23 %	Verborgen
L475A	28,30 %	Verborgen
D502A	28,76 %	Keine
Y490A	30,10 %	Verborgen
R491A	30,23 %	Keine
Y545A	30,48 %	Verborgen
M534A	31,92 %	Verborgen
R486A	32,51 %	Keine

**Tabelle 4.2.:** Schlecht exprimierende Mutanten. Durchschnittswerte (in Prozent der Wildtypexpression) aus mindestens drei Transfektionen in U373-MG-Zellen. Vorhersage der Lösungsmittelzugänglichkeit aus Barrasa *et al.* (2003).

ist auch, dass fehlgefaltete Proteine zu unlöslichen Aggregaten assoziieren und sich dadurch dem Nachweis entziehen.

Insgesamt finden sich unter den hier untersuchten Mutanten 15 mit einem durchschnittlichen Expressionsniveau unterhalb eines Drittels des Wildtypniveaus. In der Sekundärstrukturanalyse von Barrasa *et al.* (2003) wurden für zehn dieser Seitenketten eine verborgene Position vorhergesagt, für die verbleibenden fünf Seitenketten konnte keine Vorhersage ermittelt werden, sodass keine einzige als oberflächlich klassifiziert wurde. Um die Rolle dieser Aminosäurereste besser einschätzen zu können, wurde auch das *in silico*-Strukturmodell von Barrasa *et al.* herangezogen. Dieses Modell basiert auf einem *Threading*-Algorithmus und sagt eine  $\alpha$ -helikale Struktur für den C-Terminus (349–580) voraus. Ein Drittel der betreffenden Positionen (siehe Abb. 4.1) befindet sich im Modell auf einer intern gelegenen, hauptsächlich hydrophoben Helix (494–516), was ebenfalls für eine strukturell wichtige Rolle dieser Positionen spricht.

Zum Nachweis einer drastischen Strukturveränderung durch die in Tab. 4.2 aufgeführten Mutanten wären zwar noch experimentelle Daten – z. B. native Antikörperbindungsstudien mit Ak gegen Epitope des C-Terminus – nötig, auch ist die Zuverlässigkeit der *in silico*-Strukturvorhersage beschränkt. Trotzdem wird deutlich, dass sich eine Interpreta-



**Abbildung 4.1.:** Interne Helix im 3D-Strukturmodell. *Cartoon*-Darstellung des C-Terminus von IE2. Der *Core*-Bereich ist mit einem Farbverlauf von N- (Blau) nach C-terminal (Rot) markiert. Die Positionen der in Tabelle 4.2 aufgeführten, schwach exprimierenden Mutanten sind Pink gefärbt. Zentral findet sich eine intern gelegene Helix (494–516) auf der sich fünf dieser Mutationsstellen befinden. Diese sind mit ihren (hier unmutiert dargestellten) Seitenketten ebenfalls in Pink dargestellt. Das Strukturmodell wurde freundlicherweise von M. Inmaculada Barrasa (Barrasa *et al.*, 2003) zur Verfügung gestellt. Die Abbildung wurde mit der Software *PyMOL*<sup>TM</sup> erzeugt.

tion der niedrigen IE2-Expression als Folge von Fehlfaltung und die Strukturvorhersage gegenseitig bestätigen.

### 4.3. Transaktivierung viraler und zellulärer Promotoren

Zwei Transaktivierungsdomänen gelten als essenziell für die IE2 vermittelte Promotor-transaktivierung (Pizzorno *et al.*, 1991; Stenberg *et al.*, 1990; Malone *et al.*, 1990). Die N-terminale Aktivator-domäne (25–85) liegt außerhalb des *Core*-Bereichs, die C-terminale (545–580) überlappt ihn nur wenig. Trotzdem haben schon frühere Experimente gezeigt, dass auch Mutationen innerhalb der *Core*-Domäne einen deutlichen Einfluss auf die Transaktivierungsfunktion haben können (Asmar *et al.*, 2004; Barrasa *et al.*, 2003; Heider *et al.*, 2002a).

Das IE2-Protein entfaltet seine aktivierende Funktion auf verschiedene Promotoren viralen und zellulären Ursprungs. Hierbei sollen sowohl Interaktionen mit basalen als auch mit sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren von Bedeutung sein (Übersicht in: Stinski und Meier, 2007). Außerdem wurden in den Promotoren einiger viraler Zielgene (Arlt *et al.*, 1994; Chen und Stinski, 2000; Huang und Stinski, 1995; Rodems *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 1994) und des zellulären Zielgens Zyklin E (Bresnahan *et al.*, 1998) CRS-ähnliche Bindungsstellen identifiziert, wobei sich die Sequenzhomologie teilweise auf das Vorhandensein von zwei CG-Dinukleotiden im Abstand von zehn Nukleotiden beschränkt.

Solche Sequenzen finden sich auch im hier verwendeten UL112/113-Promotor (Arlt

*et al.*, 1994; Schwartz *et al.*, 1994). Die Deletion dieser Bindungsstellen schränkt die Aktivierbarkeit dieses Promotors zwar deutlich ein, allerdings bleibt immer noch eine deutliche IE2-Responsivität erhalten (Arlt *et al.*, 1994). Schließlich haben Rodems *et al.* (1998) in Experimenten mit rekombinantem Virus gezeigt, dass sich die Bedeutung der verschiedenen Bindungsstellen im UL112/113-Promotor im Verlauf des Infektionszyklus verändert. Während der *early*-Phase ist hauptsächlich eine ATF/CREB-Bindungsstelle von Bedeutung, hingegen kann in der *late*-Phase, in der die Transkription an einer weiter abwärts gelegenen Stelle startet, diese nur in Anwesenheit einer bestimmten IE2-Bindungsstelle erfolgen.

Über die Umstände, die zur Transaktivierung des zellulären fos-Promotors durch IE2 führen, ist weniger bekannt. Es wird allerdings vermutet, dass hier Interaktionen mit basalen Transkriptionsfaktoren zum Tragen kommen (Hagemeier *et al.*, 1992b).

Trotz der vermuteten Unterschiede in den Transaktivierungsmechanismen, zeigen sich für die hier getesteten IE2-Mutanten keine qualitativen Differenzen zwischen beiden Promotoraktivitäten. Auftretende Differenzen sind eher quantitativer Natur und müssen mit Vorsicht interpretiert werden. In der Arbeit von Barrasa *et al.* (2003) zeigt sich nämlich deutlich, dass die Dosis-Wirkungsbeziehungen in komplexer Weise sowohl vom verwendeten Promotor als auch von der vorliegenden Mutation beeinflusst werden. Zwar lassen sich die hier ermittelten Werte untereinander vergleichen, aufgrund der Expression außerhalb des Viruskontexts sind die Aktivitätsunterschiede aber nicht ohne Weiteres auf die Verhältnisse in der infizierten Zelle zu übertragen. Wegen der oben beschriebenen Phasenabhängigkeit der Expression vom UL112/113-Promotor kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich zu späteren Zeitpunkten im Infektionszyklus nicht doch noch Unterschiede zwischen den Promotoraktivitäten zeigen würden, die hier nicht beobachtet werden können, weil sich die Verhältnisse der *late*-Phase in der transienten Transfektion nicht nachbilden lassen.

Ein großer Teil der Mutanten mit drastischen Defekten der Transaktivierung kann auch in den anderen hier untersuchten Bereichen keine Funktion mehr ausüben. Zusammengefasst mit der schlechten Expression dieser Konstrukte, erscheint es wahrscheinlich, dass hier globale Störungen der Struktur für die Verluste verantwortlich zu machen sind.

Bei den übrigen Mutanten müssen für das Fehlen von deutlichen Unterschieden zwischen den Promotoraktivitäten verschiedene Möglichkeiten diskutiert werden. So ist es denkbar, dass – zumindest für die *early*-Phase – doch identische Transaktivierungsmethoden die wichtigste Rolle spielen. Wenn tatsächlich unterschiedliche Mechanismen benötigt werden, könnten diese strukturell außerhalb der hier mutierten Region liegen. Die Mutationen würden dann nur indirekt wirken, beispielsweise durch Konformati-

#### 4. Diskussion

änderung oder durch veränderte posttranslationale Modifikationen, dann aber in gleicher Weise auf beide hier getesteten Promotoren.

Schon früher und teilweise während der Entstehung der vorliegenden Arbeit wurden Mutationsstudien im selben Bereich von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt und die Ergebnisse veröffentlicht.

In der Arbeit von Barrasa *et al.* (2003), in der der Einfluss verschiedener Unterschiede zwischen den IE2-Proteinen aus den Stämmen Towne und AD169 auf die Transaktivierung untersucht wurde, zeigte sich, dass die Transaktivierungsaktivität von IE2<sub>AD169</sub> zwei- bis dreifach stärker als die von IE2<sub>Towne</sub> ausgeprägt ist. Der Unterschied ließ sich fast vollständig durch Mutation eines Threonins im Towne-Protein zu Alanin an Position 541 (542 in AD169) aufheben. Die Anwesenheit der K455E-Mutation (456 in AD169) erbrachte hingegen keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Transaktivierung. Während in der vorliegenden Arbeit die Position 542 nicht mutiert wurde, liegen Ergebnisse zur Position 456 vor. Eine Mutation dieses Glutamatrestes zu Alanin reduziert die Promotoraktivität auf 65,68 % (fos) bzw. 43,42 % (UL112/113), während die anderen Funktionen unbeeinflusst bleiben. An dieser Position könnte also das Vorhandensein eines geladenen Restes für die Transaktivierung vorteilhaft sein. In derselben Arbeit wurde auch die Position 463 (464 in AD169) mutiert. In beiden Virusstämmen kommt hier ein Alanin vor, jedoch enthält eine häufig verwendete cDNA hier ein Threonin. Dieses führte zu einer gegenüber Towne nochmals deutlich reduzierten Transaktivierung. Die in der vorliegenden Arbeit – allerdings im IE2<sub>AD169</sub> durchgeführte – Substitution zu Serin führte ebenfalls zu einer Reduktion der Transaktivierung auf 13,58 % (fos) und 26,56 % (UL112/113). In beiden Fällen führen polare Reste zur deutlichen Reduktion der Transaktivierungsfähigkeit.

Eine Mutation des Cysteins an Position 510 zu Glycin im rekombinanten Virus führte in den Experimenten von Heider *et al.* (2002a) zu einem temperatursensitiven (ts) Phänotyp bezüglich Virusvermehrung und der Transaktivierung des UL112/113- sowie des SV40-Promotors. Andere IE2-Funktionen wurden von Heider *et al.* nicht untersucht. Derselbe Cysteinrest wurde auch für die vorliegende Arbeit, hier allerdings zu Alanin, mutiert. Die Temperatursensitivität der C510A-Mutante wurde nicht geprüft. In den Experimenten von Heider *et al.* wurden 32,5 °C als permissive und 39,5 °C als nichtpermissive Temperatur angewendet. Bei 37 °C zeigte die C510A-Mutante nicht nur volle Autorepression, Zellzyklusarrest und deutliche DNA-Bindung, sondern auch keine Einschränkung der fos-Transaktivierung. Die UL112/113-Aktivität war jedoch gegenüber Wildtyp auf die Hälfte reduziert. Unter der Annahme, dass der ts-Phänotyp der C510G-Mutante auf dem Verlust einer Disulfidbrücke basiert, erscheint es wahrscheinlich, dass

auch die C510A-Mutante einen solchen aufweist. Weitere Experimente sind notwendig, um die Temperatursensitivität zu prüfen, könnten aber wertvolle Erkenntnisse in Hinblick auf die Strukturvoraussetzungen einzelner IE2-Funktionen liefern.

In der Arbeit von Petrik *et al.* (2007) wurden verschiedene IE2-Mutanten hinsichtlich Transaktivierung und Autorepression untersucht. Hauptgegenstand der Untersuchungen in rekombinantem Towne-Virus sowie in Transfektionsstudien war eine Doppelmutante P535A/Y537A (entsprechend Positionen 536/538 in AD169). Die Doppelmutante zeigt Einschränkungen in der Transaktivierung von *early*-Promotoren, welche kompatibel mit den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Funktionsverlusten für die beiden Einzelmutanten P536A und insbesondere Y538A sind. Eine L534A-Mutante (Towne) zeigte bei Petrik *et al.* nur geringe Einschränkungen in Viruswachstum, Autorepression und Transaktivierung des viralen *early*-Promotors UL127 und wurde als Positivkontrolle in einem Teil der Experimente verwendet.

Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den hier ermittelten Ergebnissen der entsprechenden Mutante L535A. Diese gehört zu den Mutanten mit den deutlichsten Funktionsverlusten in allen untersuchten Bereichen. Es erscheint wenig wahrscheinlich, dass sich diese Unterschiede durch die Sequenzabweichungen zwischen den zugrundeliegenden Virusstämmen erklären lassen. Verschiedene Differenzen im experimentellen Aufbau erschweren allerdings den Vergleich der Resultate:

(1.) In der Arbeit von Petrik *et al.* wird teils mit rekombinantem Virus, teils mit einem Expressionskonstrukt gearbeitet, das von UL121 bis UL128 reicht. Die Expression von IE2 steht also immer unter der Kontrolle des MIEP, sodass die Expression durch die Autorepression beeinflusst wird. Auch wenn dies die tatsächlichen Verhältnisse im Viruskontext widerspiegelt, erschwert es doch die Interpretation der Ergebnisse. Diese wird des Weiteren durch die Koexpression von IE1 und weiteren Spleißprodukten verkompliziert. Im Gegensatz hierzu erfolgte in dieser Arbeit die Expression von IE2 und IE2-Mutanten von cDNA-Konstrukten.

(2.) Petrik *et al.* haben in den Reporterexperimenten zur Autorepression und Transaktivierung ein  $\beta$ -Gal-Expressionskonstrukt kotransfiziert. Die ermittelten Mengen an Reportersubstanz in diesen Versuchen wurde zum Ausgleich von Transfektionsschwankungen auf die  $\beta$ -Gal Expression normiert. Solche Transfektionskontrollen sind aufgrund der relativ wahllosen Transaktivierungsaktivität von IE2 problematisch, weshalb in der vorliegenden Arbeit auf solche verzichtet wurde. Der von Petrik *et al.* für das  $\beta$ -Gal-Expressionskonstrukt gewählte SV40-Promotor ließ sich in den Experimenten von Heider *et al.* (2002a) zehn- bis hundertfach durch IE2 induzieren.

(3.) Obwohl Petrik *et al.* in Reporterexperimenten die Transaktivierung des auch

#### 4. Diskussion

hier verwendeten UL112/113-Promotors untersucht haben, verzichteten sie hier auf die Untersuchung der L534A-Mutante; dadurch bleibt eine direkte Vergleichsmöglichkeit leider verwehrt. Allerdings zeigen Petrik *et al.*, dass L534A im CHIP-Experiment an den UL112/113-Promotor rekrutiert wird.

In einer jüngeren Arbeit wurden von Harris *et al.* (2010) die Aminosäuren 535–545 des IE2-Proteins aus dem Towne-Stamm einzeln zu Alanin oder Valin mutiert (entsprechend AS 536–546 in AD169). Untersucht wurde die Transaktivierung der viralen Promotoren UL54 und UL112/113 sowie die Autorepression. Auch hierbei zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten Promotoren. Funktionsverluste wurden bei den Positionen 535, 536, 537, 543 und 544 festgestellt. Für die Mutante T541A konnten die Autoren nur einen deutlichen Funktionsverlust für UL54, nicht aber für UL112/113 feststellen. Einige der entsprechenden Mutanten wurden auch in der vorliegenden Arbeit im AD169-Kontext untersucht. Hierbei ergeben sich Abweichungen der UL112/113-Aktivität bei P536 (22,1 %) und I537A (38,3 %), die bei Harris *et al.* deutlich unter 10 % Wildtypaktivität gemessen wurden sowie Y545A (2,3 %) und E539A (64,9 %), die bei Harris *et al.* eine etwas höhere Aktivität zeigen.

Auch diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich teilweise mit den bereits o. g. Unterschieden in Virusstamm und insbesondere experimentellem System erklären. So kam auch bei Harris *et al.* als Expressionskonstrukt ein Plasmid mit vollständiger MIE-Region zum Einsatz. Allerdings wurden P535A und Y544A auch mittels cDNA-Konstrukten untersucht, wobei die Abweichungen bestehen blieben, sodass hier eventuell die Unterschiede zwischen den Virusstämmen als wahrscheinlichste Ursache in Betracht kommen. In der Mitte der von Harris *et al.* untersuchten Region liegt an Position 542 (Towne) die bereits o. g. Sequenzabweichung zwischen Towne und AD169, die für einen Großteil des Unterschieds in der Transaktivierungsaktivität der beiden Virusstämme verantwortlich ist.

#### 4.4. DNA-Bindung und Autorepression

Alle im Gelretardierungsexperiment bindungsaktiven Mutanten – auch solche mit relativ schwachen Banden – führen zu einer deutlichen, wenn auch nicht immer voll ausgeprägten, Repression des MIEP. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Vorstellung, dass eine Bindung an die CRS hinreichend ist, um durch sterische Hinderung die effiziente Initiation der Transkription zu verhindern.

Unerwartet war jedoch der Befund, dass auch Mutanten, die im Gelretardierungsex-



periment nicht an die CRS binden konnten, im Reporterexperiment zur Autorepression in der Lage waren. Auch von Asmar (2004) wurden bindungsinactive Mutanten mit einer gewissen Autorepressionsaktivität beobachtet. In Experimenten zu einem IE2-responsiven CRS-Homolog im viralen US3-Promotor wurde ebenfalls eine Repression des Reporterkonstrukts durch eine IE2-Mutante beobachtet, die nicht zur CRS-Bindung im EMSA in der Lage war. Die Autorepressionsaktivität war zwar deutlich schwächer als die von wt-IE2, aber dosisabhängig (Lashmit *et al.*, 1998).

Die hier beobachteten Abweichungen zwischen DNA-Bindung und Autorepression haben jedoch eine andere Qualität, einige Konstrukte wie W473A, L475A und I494A erreichen fast das Repressionsniveau von Wildtypprotein. Mit der relativ schwachen Expression dieser Mutanten lässt sich diese Beobachtung nicht erklären, weil die DNA-Bindungsstärke auf die Expressionsniveaus normiert wurde.

Als Ursache für die Unterschiede kommen verschiedene Faktoren in Betracht. So ist denkbar, dass auch IE2-Mutanten, die *in vitro* nicht in der Lage sind, an die CRS zu binden, in der Zelle Bedingungen unterliegen, in denen eine Bindung ermöglicht wird. *In silico*-Vorhersagen des DNA-Kontakts (s. u.) ergeben an allen drei Positionen keinen direkten Kontakt der Seitenketten mit DNA, sodass eine mittelbare Beeinträchtigung der Bindungsfähigkeit wahrscheinlich scheint. Eventuelle Unterschiede in posttranslationalen Modifikationen an den IE2-Proteinen zwischen den für die EMSA-Extrakte verwendeten HeLa-Zellen und den U373-MG-Zellen, welche in den Reporterexperimenten verwendet wurden, müssen in Betracht gezogen werden. Voraussetzung für letztere Erklärung wäre allerdings, dass eventuelle Unterschiede in den Proteinmodifikationen entweder exklusiv die aufgeführten Mutanten betreffen oder nur bei diesen den beobachteten Phänotyp hervorrufen. Interessant ist in diesem Zusammenhang allerdings, dass die *in vitro* DNA-Bindungsfähigkeit von bakteriell exprimiertem GST/IE2-Fusionsprotein durch Behandlung mit HeLa-Kernextrakten aufgehoben werden konnte (Waheed *et al.*, 1998). Als Erklärung hierfür wurde von den Autoren die Phosphorylierung des Fusionsproteins durch in den Extrakten vorhandene Kinasen vorgeschlagen. Die beiden o. g. Mutanten W473A und L475A liegen in direkter Nachbarschaft zu einer potenziellen Phosphorylierungsstelle (S474). Durch die Mutationen wird die Konsensussequenz nicht beeinträchtigt. Es ist vorstellbar, dass die Mutationen die Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstelle verbessern und so die CRS-Bindungsfähigkeit aufheben. Eine Alaninmutante dieses Serinrestes, die eine Phosphorylierung unmöglich macht, kann im EMSA die CRS binden. Doppelmutanten aus S474A und den beiden benachbarten Resten könnten diese Hypothese bestätigen oder widerlegen.

Neben der CRS, die im Bereich des Transkriptionsstartpunktes gelegen ist, existieren

#### 4. Diskussion

im MIEP noch mindestens zwei weitere Bindungsstellen für IE2, die eine Repression der Transkription vermitteln können (Huang und Chen, 2002). Diese liegen in den Bereichen -242 bis -229 und -178 bis -165 und sind somit im verwendeten Reporterkonstrukt pRR55 (siehe Abschnitt 2.10), nicht jedoch in der Sonde für die Gelretardierungsexperimente enthalten. Diese Sequenzen enthalten zwar das Bindungsmotiv der CRS (CG(N)<sub>10</sub>CG), sind aber nicht mit dieser identisch. So ist nicht auszuschließen, dass IE2-Mutanten zwar nicht mehr an die in der Sonde enthaltene CRS, jedoch noch an die hierzu homologen Sequenzen im MIEP binden und so repressiv wirksam werden können. Andererseits zeigen Huang und Chen anhand von Deletionsstudien, dass die Wirkung der CRS im Bereich des Transkriptionsstarts die der zusätzlichen Sequenzen im MIEP deutlich übersteigt. Weitere Gelretardierungsexperimente mit den alternativen Bindungssequenzen als Sonde könnten zur Aufklärung dieser Frage beitragen.

Es ist ebenfalls zu diskutieren, ob IE2 auch ohne direkte Bindung an die CRS oder Homologe, z. B. durch Interaktion mit Proteinen der zellulären Transkriptionsmaschinerie, eine autorepressive Wirkung entfalten kann. Auch dies könnte die beobachteten Unterschiede zwischen DNA-Bindung und Autorepression erklären. Dagegen spricht jedoch, dass in verschiedenen Studien Deletionen oder Mutationen der CRS zur Aufhebung der Repression geführt haben und IE2 den mutierten MIEP teilweise sogar aktivieren konnte (Pizzorno und Hayward, 1990; Cherrington *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1993). Auch die zu späten Zeitpunkten durch IE2 hervorgerufenen Chromatinmodifikationen im Bereich des MIEP sind von einer intakten CRS abhängig (Reeves *et al.*, 2006). In den genannten Studien erfolgte die IE2-Expression im Kontext des viralen Genoms (Reeves *et al.*, 2006) oder es kamen Expressionskonstrukte mit Kopien des MIE-Lokus aus dem Virusgenom zum Einsatz. Auch wenn im letzteren Fall meist durch Deletion des Exons 4 die Expression von IE1 verhindert wurde, ist anzunehmen, dass neben dem 86 kDa-IE2-Protein auch andere Spleißprodukte exprimiert wurden (siehe Abschnitt 1.2.5.1). Dies erschwert die Vergleichbarkeit der Experimente mit den hier vorliegenden, bei denen ein IE2-Expressionskonstrukt auf der Basis von cDNA verwendet wurde.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Isomura *et al.* erschwert die Interpretation der Daten weiter. Es wurde gezeigt, dass Mutationen im Bereich der CRS in viralem Kontext nicht nur zum Verlust der Autorepression, sondern auch zu Veränderungen im Spleißen der MIE-Transkripte, in der *early*-Genexpression und letztlich auch der DNA-Replikation führen (Isomura *et al.*, 2008). Vor diesem Hintergrund ist in Frage zu stellen, ob ein mutationsbedingter Verlust der IE2-Bindungsfähigkeit für die CRS mit einer fehlenden Bindung durch Mutation der CRS selbst gleichwertig ist.

Die bereits im Abschnitt 4.3 erwähnte transaktivierungsdefiziente Doppelmutante

P535A/Y537A<sub>Towne</sub> hat in der Arbeit von Petrik *et al.* (2007) eine gegenüber Wildtyp kaum eingeschränkte Autorepressionsaktivität gezeigt. Hingegen zeigte sich die Einzelpunktmutante P536A<sub>AD169</sub> in der vorliegenden Arbeit hier stark eingeschränkt; die Y538A<sub>AD169</sub>-Mutante war zu keinerlei Repression des MIEP in der Lage. Es erscheint unwahrscheinlich, dass das Vorhandensein der jeweils anderen Mutation die Autorepressionsfähigkeit wiederherstellt. Diese Frage müsste durch Untersuchung der Doppelmutante im hier verwendeten experimentellen System geklärt werden. Die Unterschiede in den verwendeten Systemen, die Abweichungen zwischen den Ergebnissen erklären könnten, wurden im Abschnitt 4.3 ausführlich dargestellt.

In der bereits in Abschnitt 4.3 besprochenen Arbeit von Harris *et al.* (2010) wurde auch die Autorepression des MIEP untersucht. Im Gegensatz zur Transaktivierung zeigen sich hier gegenüber der vorliegenden Arbeit noch deutlichere Unterschiede, als bei der Autorepression, wo bei Harris *et al.* Mutationen im Bereich der AS 535–537 und 544 (entsprechend 536–538 und 545 in AD169) alle eine drastische Aktivierung des MIEP zeigten, die sich in der vorliegenden Arbeit so nicht zeigte. Nur bei Y538A und Y545A war in der vorliegenden Arbeit eine vollständige Aufhebung oder leichte Aktivierung des MIEP feststellbar. P535A (27,1 %) hat Restaktivität und I536A erreicht mit 80,5 % fast Wildtypniveau.

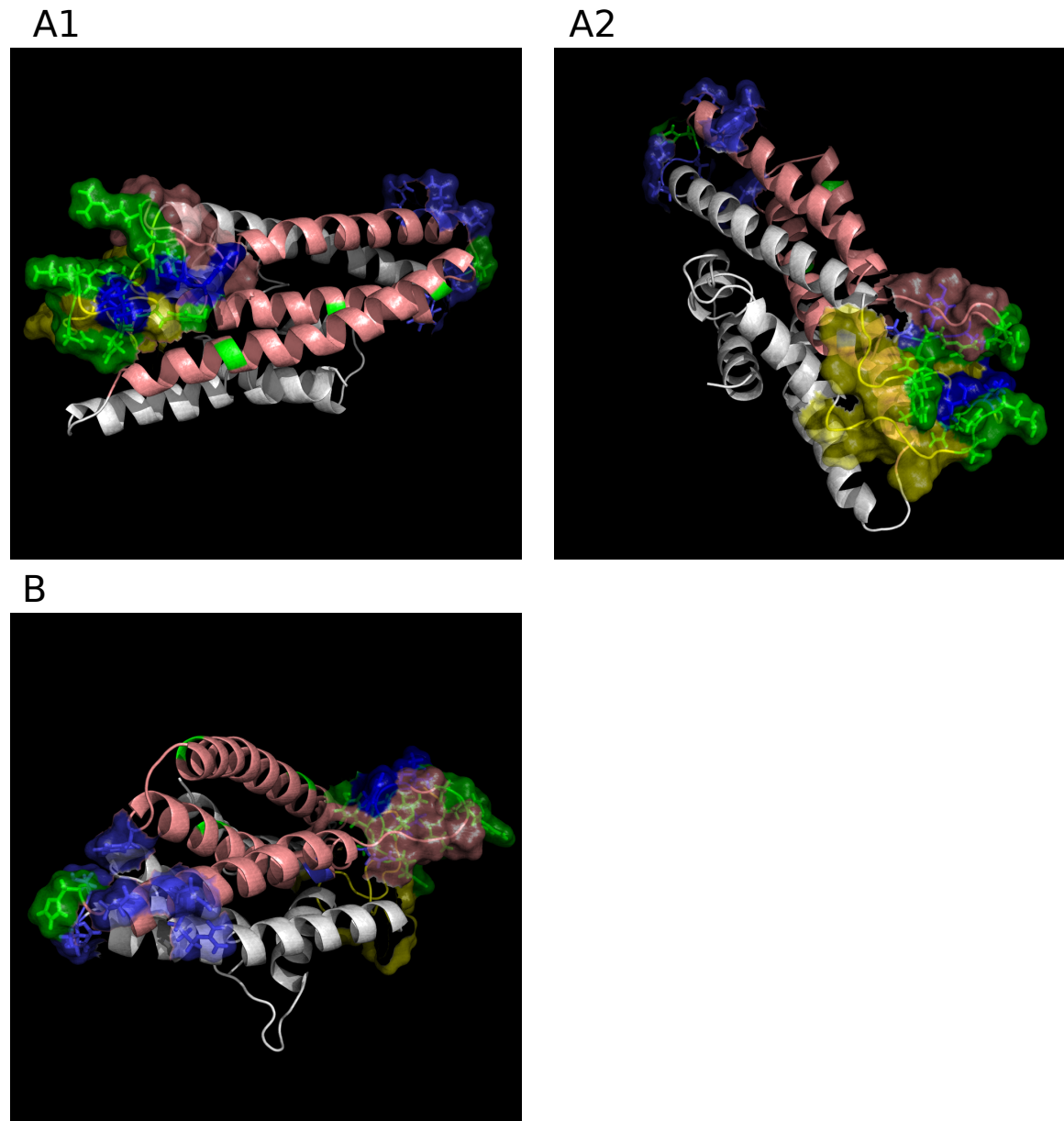
Neben einer Mutation von Seitenketten, die in direkter Interaktion mit der DNA stehen, kommen für den Ausfall der CRS-Bindungsfähigkeit noch zahlreiche andere Gründe in Betracht. Neben einer Beeinträchtigung der Proteinstruktur könnten auch ein Verlust der Dimerisierungsfähigkeit oder Einflüsse auf posttranslationale Modifikationen hierfür verantwortlich sein. Trotzdem erscheint es sinnvoll, diejenigen Seitenketten, die in Kontakt mit DNA treten, zu identifizieren, um in zukünftigen Untersuchungen das (die) DNA-Bindungsmotiv(e) in IE2 aufzuklären. Bislang konnten keine überzeugenden Bindungsmotive beschrieben werden.

Um Anhaltspunkte zu erhalten, welche Aminosäurereste in der *Core*-Domäne in unmittelbarem DNA-Kontakt stehen könnten, wurde eine *in silico*-Vorhersage mit den Programmen *DP-Bind* und *DBS-PSSM* durchgeführt.

Hierbei zeigten für die Reste H453, R486, S487, R491, N508, R524 und K543 beide Programme einen wahrscheinlichen DNA-Kontakt. Von vier dieser Kandidaten (H453, R486, R491 und R524) stehen EMSA-Daten aus der vorliegenden Arbeit zur Verfügung und in allen Fällen zeigte sich ein Verlust der Bindungsfähigkeit durch Mutation der betreffenden Reste zu Alanin. Diesen Positionen sollte daher in weiteren Arbeiten zur IE2-DNA-Interaktion besondere Aufmerksamkeit gewährt werden.

Interessant ist auch, dass die von den Programmen vorhergesagten Reste mit DNA-

#### 4. Diskussion



**Abbildung 4.2.:** Reste mit vorhergesagtem DNA-Kontakt. Dargestellt ist das Strukturmodell des IE2 C-Terminus aus Barrasa *et al.* (2003). Hierbei sind Reste mit positiver DNA-Kontaktvorhersage hervorgehoben. Grüne Reste werden von beiden Programmen übereinstimmend vorhergesagt, blaue nur von *DP-Bind*. Außer den Resten im *Core*-Bereich (rosa) sind auch Reste auf der benachbarten Schleife (398–421, gelb) eingezeichnet. In den Teilabbildungen A1 und A2 sind die Schleifen 398–421 und 486–491 im Vordergrund, in B der Bereich von 450–453.

Kontakt im 3D-Strukturmodell (siehe Abschnitt 4.2) hauptsächlich in Schleifen an den Polen der  $\alpha$ -helikalen Domäne zu finden sind. Besonders auffällig ist eine ausgedehnte Schleife in der Mitte des *Core*-Bereichs (486–491), die zusammen mit einer benachbarten Schleife außerhalb des *Core*-Bereichs (398–421) eine zusammenhängende Oberfläche mit vielen benachbarten potenziellen DNA-Kontaktstellen bildet. Diese Regionen sind in Abbildung 4.2 auf der vorherigen Seite dargestellt.

Es soll nicht verschwiegen werden, dass die Annahme eines direkten DNA-Kontakts der hier genannten Reste nicht immer mit der in Abschnitt 4.2 diskutierten Lösungsmittelzugänglichkeit dieser Positionen vereinbar ist.

## 4.5. Zellzyklusarrest

Eine IE2-Mutante, bei der die C-terminalen 152 Aminosäuren deletiert wurden, zeigte sowohl in den Experimenten von Asmar *et al.* (2004), als auch in den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden eine gegenüber Wildtyp drastisch eingeschränkte Zellzyklusarrestfunktion. Die IE2 (1–450)-Mutante erreichte hier im Durchschnitt nur 36,8 % des Anstiegs der  $G_{0/1}$ -Population, der durch IE2-Wildtyp hervorgerufen wurde. Wie bereits in Abschnitt 3.2.5 erwähnt, fand sich unter den Mutanten im *Core*-Bereich nur eine (Y545A) mit einer gegenüber IE2 (1–450) weiter reduzierten Arrestaktivität. Im Vergleich zu den anderen Faktoren zeigte sich der Zellzyklusarrest am resistantesten gegenüber den hier gesetzten Mutationen, was wahrscheinlich in der Entbehrlichkeit des C-Terminus für diese Funktion *per se* begründet ist. Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die bekannt niedrige Dosisabhängigkeit dieser Funktion (Wiebusch, 2001) einen Anteil an dieser Beobachtung hat.

Das hier verwendete experimentelle System erlaubt eine Quantifizierung der einzelnen Zellzyklusfraktionen. Ein Anwachsen der  $G_{0/1}$ -Fraktion kann theoretisch sowohl durch einen Zellzyklusarrest in der  $G_1$ - oder der sehr frühen S-Phase, als auch durch eine stark verlangsamte Passage der S-Phase bedingt sein. Für IE2-Wildtyp konnte durch Zugabe des Spindelgifts Nocodazol gezeigt werden, dass der erstere Fall zutrifft (Wiebusch und Hagemeyer, 1999). Für die Interpretation der Daten der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, dass das Gleiche auch für die hier untersuchten IE2-Mutanten gilt.

Neben den auch in den anderen Funktionsbereichen untersuchten IE2-Mutanten wurde in den Zellzyklusexperimenten zusätzlich zur ursprünglich geplanten Q549A- auch eine Q549R-Mutante untersucht. Diesem Vorgehen lag, wie bereits erwähnt, ein Vortrag

#### 4. Diskussion

von Petrik *et al.* (2005) zugrunde. Die entsprechende Towne-Mutante Q548R war im Viruskontext replikationsfähig, zeigte aber ein verlangsamtes Viruswachstum, welches von den Autoren auf einen Defekt der Zellzyklusarrestfunktion zurückgeführt wurde (Petrik *et al.*, 2006). In Reporterexperimenten war die IE2-Mutante zu Autoregulation und Transaktivierung befähigt. Allerdings kamen die gleichen Expressionskonstrukte wie in (Petrik *et al.*, 2007) zum Einsatz und somit gelten dieselben Einschränkungen in der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den hier erhobenen (siehe Abschnitt 4.3).

Auch im hier verwendeten experimentellen System zeigte sich die Q549R-Mutante in der Arrestfunktion eingeschränkt. Allerdings war dieser Effekt weniger deutlich, als der von Petrik *et al.* beschriebene. Während die Zellzyklusverteilung von mit rekombinantem IE2<sub>Q548R</sub>-Virus infizierten HFF-Zellen der von nicht infizierten gleicht, zeigt sich in der transienten Transfektion der IE2<sub>Q549R</sub>-Mutante in U373-Zellen immer noch 54 % der Wildtyparrestaktivität. Damit liegt die Arrestaktivität über dem durchschnittlichen Niveau der C-terminalen Deletionsmutante. Für diese Unterschiede kommen verschiedene Erklärungen in Betracht:

(1.) Die bei Petrik *et al.* und hier verwendeten Zelltypen unterscheiden sich hinsichtlich der Expression verschiedener Zellzyklusregulationsproteine. Vor diesem Hintergrund erscheint es möglich, dass die beobachteten Differenzen hierauf beruhen. Ebenfalls möglich wäre eine Beeinflussung des Ergebnisses durch den Erntezeitpunkt. Eher unwahrscheinlich erscheint, dass die Synchronisation der Zellen durch Serumentzug, die von Petrik *et al.* vor der Infektion durchgeführt wurde, die Unterschiede erklärt.

(2.) In den Experimenten von Petrik *et al.* wird der Zellzyklusarrest ausschließlich im Viruskontext untersucht, während in der vorliegenden Arbeit isoliertes IE2-Protein untersucht wird. Einerseits kommen im Viruskontext weitere Proteine mit zellzyklusinhibitorischer Wirkung zur Expression (siehe Abschnitt 1.2.4.1); andererseits ist aber auch denkbar, dass die Restaktivität, die hier für isoliertes Q549R beobachtet wird, im Viruskontext durch promitotische Faktoren (z. B. pUL82 (Kalejta *et al.*, 2003; Kalejta und Shen, 2003)) aufgehoben wird. Ebenfalls denkbar scheint, dass Unterschiede in der Expression von IE2 unter den Bedingungen der transienten Transfektion Voraussetzung für die beobachtete Restfunktion von IE2<sub>Q549R</sub> ist (wobei allerdings Wiebusch und Hagemeyer (1999) gezeigt haben, dass die Expressionsniveaus mit denen in infizierten Zellen vergleichbar sind).

(3.) Letztlich müssen auch hier wieder die bekannten Unterschiede zwischen den AD169- und Towne-Varianten von IE2 als mögliche Einflussfaktoren betrachtet werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Experimente des Autors zum Zeitpunkt der Vorstel-

lung der Q548R-Mutante durch Petrik *et al.* bereits weit fortgeschritten waren, konnten die Untersuchungen zu Transaktivierung und Autorepression der entsprechenden Q549R-Mutante nicht mehr durchgeführt werden. Allerdings konnte die Mutante in die Gelretardierungsexperimente zur CRS-Bindung eingebunden werden; interessanterweise zeigte sich die Q549R-Mutante hier ebenfalls inaktiv.

In einer jüngeren Publikation wurde die Q548R-Mutante von Burgdorf *et al.* (2011) erneut untersucht, wobei eine IE2 exprimierende Zelllinie zum Einsatz kam, um ausreichende Virustiter zu erreichen. Interessanterweise konnte von Burgdorf *et al.* der Zellzyklusarrestdefektphänotyp nicht bestätigt werden. Es zeigte sich vielmehr eine verminderte Expression von der späten Produkte der MIE-Region IE2-p40 und IE2-p60 sowie von UL83 und UL84. Das rekombinante Virus zeigte außerdem einen Defekt der Autorepression, was konsistent mit dem hier gezeigten Fehlen einer Bande im Gelretardierungsexperiment (siehe Abschnitt 4.4) ist.

## 4.6. Die IE2-Core-Domäne

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ergab sich aus der Beobachtung von Asmar *et al.*, dass durch Veränderungen in dem als *Core*-Domäne bezeichneten Abschnitt alle von den Autoren untersuchten Funktionen verloren gehen. Hieraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass dort funktionelle Domänen des Proteins überlappen. Die Grenzen des *Core*-Bereichs wurden von Asmar *et al.* N-terminal im Bereich von AS 450–470 und C-Terminal bei AS 552 festgelegt.

Während einige Erkenntnisse über die funktionellen Domänen in IE2 vorliegen (siehe Abschnitt 1.2.5.2), finden sich leider keine Informationen zu strukturellen Domänen. Allerdings lassen die verschiedenen Spleißvarianten einerseits und *in silico*-Vorhersagen andererseits die Vermutung zu, dass sich eine Domänengrenze im Bereich von AS 338–385 befinden könnte. So bilden LP40 (338–580) und IE55 ( $\cong$ IE2 $\Delta$ 365–519) jeweils eigenständige Genprodukte. Der Internetdienst *DomPred*, der unterschiedliche Methoden zur Vorhersage einsetzt, sagt mögliche Grenzen an den Positionen 385 bzw. im Bereich 350–360 voraus.

Obwohl die *Core*-Domäne wahrscheinlich keine strukturell unabhängige Einheit darstellt, erscheint die Abgrenzung zur N-terminal gelegenen, sogenannten spezifischen essenziellen Modulator-domäne (SEM) aufgrund der deutlich unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Mutationen gerechtfertigt (Asmar *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden im N-terminalen Grenzbereich nur relativ wenige

#### 4. Diskussion

Mutanten untersucht. Aus den stark konservierten fünf Resten im Bereich 450–470 zeigen zwei (H453A und G468A) einen deutlichen Verlust in allen untersuchten Funktionen. Insgesamt ist das Bild durchaus mit dem des restlichen *Core*-Bereiches vergleichbar, so dass die N-terminale Grenze der *Core*-Domäne mindestens bis zur Position 453 reichen muss.

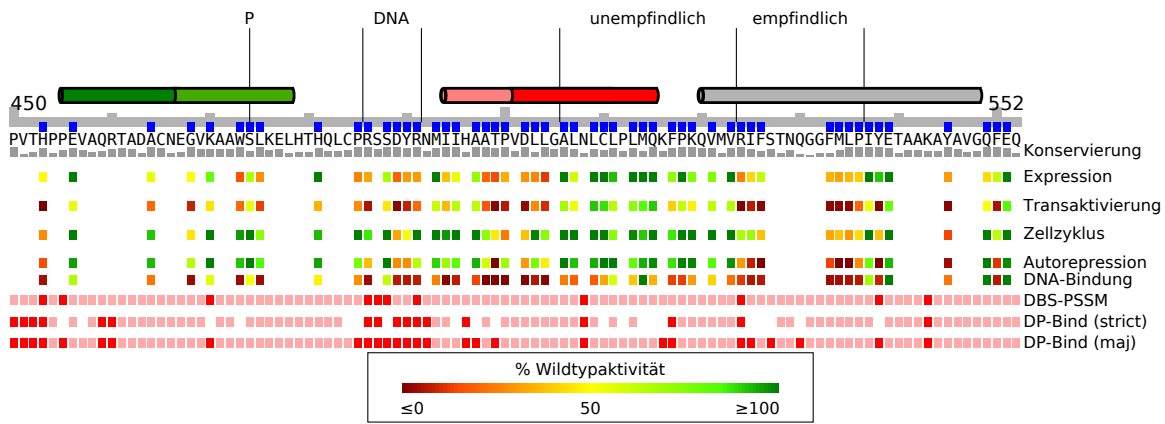
Insgesamt zeigt sich in der vorliegenden Arbeit gegenüber der Forschung von Asmar *et al.* für die *Core*-Domäne ein differenzierteres Bild. Während ein beträchtlicher Teil der hochkonservierten Reste nach Mutation zu Alanin nicht nur einen fast kompletten Funktionsverlust zeigt, sondern auch nur in deutlich geringerer Menge als Wildtypprotein in der Zelle zu finden ist, zeigen andere – ebenfalls hochkonservierte – ein von Wildtypprotein kaum unterscheidbares Expressions- und Funktionsprofil. Dies legt die Deutung nahe, dass die von Asmar *et al.* beobachtete Überlappung der funktionellen Domänen in Wirklichkeit auf der strukturellen Bedeutung der *Core*-Domäne beruht. Ein beträchtlicher Teil dieser Domäne scheint an einem hydrophoben Proteinkern beteiligt zu sein, dessen Integrität für alle untersuchten Funktionen Voraussetzung ist. Hierfür sprechen neben den experimentellen Befunden auch die rechnergestützten Vorhersagemodelle.

Dies schließt allerdings nicht aus, dass andere Reste in der *Core*-Domäne tatsächlich in direktem Kontakt mit DNA- und Proteininteraktionspartnern stehen. Tatsächlich ergeben die Daten auch hierfür Anhaltspunkte, z. B. bei der Untersuchung der DNA-Bindung (siehe Abschnitt 4.4).

Ein genaueres Bild der IE2-*Core*-Domäne ist, basierend auf den hier vorgestellten experimentellen Daten, in Abbildung 4.3 auf der nächsten Seite dargestellt. Außerdem wurden die besprochenen *in silico* generierten Modelle integriert, soweit diese zu einem besseren Verständnis der Region beitragen können.

Prinzipbedingt – durchschnittlich wurde nur ca. jede zweite Position mutiert – bleibt dieses neue Bild lückenhaft. Trotzdem lassen sich einige Muster erkennen. Im C-terminalen Abschnitt sagen die Vorhersagen eine amphiphile Helix voraus. Dazu passt, dass hier Mutationen auf der hydrophilen Seite deutlich geringere funktionelle Einbußen zur Folge haben, als solche auf der hydrophoben Seite. Die ungefähr in der Mitte der *Core*-Domäne vorhergesagte, hauptsächlich hydrophobe Helix muss in einen empfindlicheren C-terminalen Anteil und einen unempfindlicheren N-terminalen eingeteilt werden. Glaubt man dem 3D-Strukturmodell, so liegt diese Helix insbesondere mit dem C-terminalen Anteil intern, zwischen den anderen Helices des Proteins (siehe Abb. 4.1). Der N-terminale Anteil geht in einen nicht als helikal prädierten Abschnitt des Proteins über, der ebenfalls recht unempfindlich gegenüber den hier eingeführten Mutationen ist.





**Abbildung 4.3.:** Hier wird die Darstellung der IE2-Einzelfunktionen aus der Abbildung 3.16 wieder aufgenommen. Zusätzlich sind in dieser Abbildung die hier diskutierten potenziellen Strukturelemente eingezeichnet. Der grüne Zylinder kennzeichnet die amphiphile Helix, der rote die hydrophobe. In beiden Fällen ist der Teil in dem sich 2D- und 3D-Strukturvorhersage decken kräftiger gezeichnet, als der Teil, der nur auf dem Tertiärstrukturmodell basiert. Der graue Zylinder kennzeichnet einen Bereich, der im 3D-Modell ebenfalls helikal ist, jedoch in der 2D-Vorhersage nur in einem kleinen Bereich und auch dort nur mit geringer Verlässlichkeit als  $\alpha$ -Helix klassifiziert wird. Die potenzielle Phosphorylierungsstelle ist mit einem P gekennzeichnet. Die Schleife, für die ein direkter Kontakt mit DNA vorhergesagt ist, ist ebenso wie der relativ unempfindliche und der relativ empfindliche Teil der Core-Domäne gekennzeichnet. Zur Vorhersage des DNA-Kontakts siehe Abschnitt 4.4. In kräftigem Rot sind Reste markiert, für die DNA-Kontakt vorhergesagt wurde, blassrot jene, für die kein Kontakt vorhergesagt wurde. Für die Konservierungsbalken unter den Buchstabencodes wurde das in Abb. 3.2 gezeigte *Alignment* ausgewertet. Die Höhe der Balken wurden mit Hilfe der *BLOSUM62*-Matrix nach folgender Formel berechnet:  $f(i) = (\sum_{k=1}^{n(i)} \text{Blosum}(\text{Aln}_{1,i}, \text{Aln}_{k,i})) / (\text{Blosum}(\text{Aln}_{1,i}, \text{Aln}_{1,i}) \cdot n(i))$ , wobei *Aln* für die *Alignment*-Matrix und *n(i)* für die Anzahl der Reste an Position *i* steht. In die Berechnung gingen nur die Zytomegalievirussequenzen ein. Lücken wurden mit dem niedrigstmöglichen *BLOSUM*-Score bewertet.

Im N-terminalen Anteil der Core-Region liegt ein Bereich, für den keine verlässliche Sekundärstrukturvorhersage vorliegt. Dieser ist besonders mutationsempfindlich und bildet die einzige zusammenhängende Region mit drastischen Ausfällen auch in Bezug auf die Zellzyklusarrestfunktion von IE2. Erstaunlicherweise wird die Region von einigen kaum konservierten Aminosäureresten unterbrochen, für die leider keine experimentellen Daten vorliegen.

Betrachtet man nicht einzelne Positionen des Core-Bereichs sondern die funktionellen Konsequenzen der Mutationen bestimmter Klassen von Aminosäuren, fällt auf, dass die Alaninsubstitutionen saurer Aminosäuren deutlich weniger Funktionsverluste zur Folge haben, als die Mutation von basischen Resten. Positiv geladene Reste spielen bei unspezifischen Protein-DNA-Interaktionen oft eine wichtige Rolle, da hier elektrostatische, anziehende Kräfte zum negativ geladenen DNA-Rückgrat auftreten. Diese

#### 4. Diskussion

Effekte sind jedoch auch für spezifische Protein-DNA-Interaktionen oft von essenzieller Bedeutung (Kerppola, 2005). Dies könnte auch den zunächst erstaunlichen Befund erklären, dass die Ergebnisse der CRS-Bindung mit denen der Transaktivierung besser korrelieren, als mit denen der Autorepression. Wenn nämlich in beiden Fällen zunächst unspezifische Wechselwirkungen mit DNA die Voraussetzungen für eine spezifische Interaktion mit den jeweiligen Bindungspartnern wären.

Zuletzt soll noch kurz auf die Positionen eingegangen werden, an denen die Mutationen nur geringe (506–523) oder auch gar keine (M514, E539, E551) hier feststellbaren Funktionsdefizite zur Folge hatten. Einerseits scheint es kaum verwunderlich, dass nicht alle Reste von essenzieller Bedeutung sind. Andererseits stellt sich die Frage, welcher Selektionsdruck dazu geführt haben mag, dass diese Positionen trotz der scheinbar beliebigen Austauschbarkeit mit Alanin hochkonserviert geblieben sind. Eine mögliche Erklärung wäre, dass diese Mutationen im Virus- bzw. Wirtskontext doch die hier untersuchten Funktionen beeinträchtigen. Denkbar ist aber auch, dass diese Reste für hier nicht untersuchte und evtl. noch unbekannt, wichtige IE2-Funktionen essenziell sind. Eine Untersuchung des Phänotyps dieser Mutationen im Viruskontext erscheint deshalb – trotz unauffälliger Befunde in der vorliegenden Arbeit – vielversprechend.

## 5. Zusammenfassung

Das IE2-Protein von HCMV ist ein essenzielles Schlüsselprotein in der *immediate early*-Phase des HCMV-Replikationszyklus. Als solches war es Gegenstand einer Vielzahl von Experimenten zur Aufklärung seiner Struktur und Funktionsweise. Neben der Transaktivierung von viralen und zellulären Promotoren sind eine repressive Wirkung auf den MIE-Promotor, eine Beeinflussung des Zellzyklus im Sinne eines Arrests der zellulären DNA-Replikation am G<sub>1</sub>/S-Übergang und eine direkte Bindung an eine als CRS bezeichnete DNA-Sequenz bekannt. Zudem werden Interaktionen mit pRB, p53 und dem viralen pUL84 beschrieben. Auch ein antiapoptotischer Effekt ist bekannt.

Trotzdem ist es bisher, mit Ausnahme der Transaktivierung, nicht gelungen, Mutanten zu finden, in welchen nur einzelne der bekannten Funktionen ausfallen, während die übrigen unbeeinträchtigt bleiben.

Um solche Mutanten zu finden, schien insbesondere die *Core*-Domäne ein vielversprechendes Ziel für weitere Mutationsstudien zu sein. Die vorangehenden Arbeiten von Asmar *et al.* hatten für diese etwa 100 AS umfassende Region im C-Terminus des Proteins gezeigt, dass hier auch relativ subtile Substitutionsmutationen zu einem vollständigen Verlust aller untersuchten Funktionen führen.

Viele bisher publizierte IE2-Mutanten, sowohl experimentell erzeugte, als auch solche, die in verschiedenen Virusstämmen vorkommen, weisen in diesem Bereich Veränderungen auf. Gleichzeitig ist dieser Bereich allerdings zwischen den IE2 homologen Genen verschiedener Betaherpesviren hoch konserviert.

Diskriminierende Proteinmutanten können ein wichtiges Hilfsmittel sein, um die Bedeutung einzelner Proteinfunktionen im Kontext der viralen Replikation und der Virus-Wirt-Interaktionen zu evaluieren. Auf lange Sicht versprechen Sie die Identifikation potenzieller Angriffspunkte von neuen antiviralen Wirkstoffen. Darüberhinaus lassen sich aus Mutationsstudien auch Hinweise auf die Proteinstruktur ableiten, die im Fall von IE2 noch unbekannt ist. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit eine systematische Mutationsanalyse der IE2-*Core*-Domäne vorgenommen werden.

Hierzu wurden auf Basis ihres Konservierungsgrades 52 geeignete Kandidaten aus den Aminosäuren des *Core*-Bereich ausgewählt. Für diese wurden Expressionskonstrukte

## 5. Zusammenfassung

erstellt und die mutierten IE2-Proteine in viruspermissiven Zellen exprimiert, wobei nicht alle Mutanten das Expressionsniveau von Wildtypprotein erreichten.

Unter den IE2-Funktionen wurden sowohl die Transaktivierung, als auch Autorepression, Zellzyklusarrest und DNA-Bindungsfähigkeit in bereits im Labor etablierten experimentellen Systemen untersucht.

Die hier gewonnenen Daten ergaben ein differenzierteres Bild der *Core*-Domäne. Im Bereich der AS 524–536 zeigten die Substitutionen einen Effekt, der weitestgehend dem der Deletion des gesamten C-Terminus entsprach. Auch der Bereich AS 498–504 stellte sich als sensibles *Cluster* dar. Im Gegensatz dazu zeigten die Mutanten im Bereich AS 506–523 nur moderate Effekte im Vergleich zu Wildtyp-IE2.

Unter den untersuchten Funktionen erschien der Zellzyklusarrest am unempfindlichsten gegenüber Einzelpunktmutationen im *Core*-Bereich. In den Experimenten zur DNA-Bindung zeigten sich die deutlichsten Effekte. Interessanterweise zeigten nicht alle Mutanten mit Autorepressionsfunktion eine intakte DNA-Bindung.

Die teilweise deutlich unter Wildtypniveau liegenden Expressionsniveaus einzelner Mutanten, lassen sich möglicherweise durch Fehlfaltung erklären. Diese Deutung legt, ebenso wie die Analyse von *in silico*-Strukturanalysen, eine strukturell wichtige Rolle vieler Reste in der *Core*-Domäne nahe. Demnach wäre die *Core*-Domäne an der Ausbildung eines hydrophoben Proteinkerns beteiligt.

Außerdem ergaben sich aus den Ergebnissen Anhaltspunkte für eine direkte Beteiligung von Seitenketten der *Core*-Domäne an – wahrscheinlich unspezifischen – IE2-Protein-Interaktionen.

Eine diskriminierende IE2-Mutante, im Sinne eines vollständigen Verlusts nur einzelner Funktionen, fand sich unter den getesteten Substitutionen nicht. Dennoch erbrachte die vorliegende Arbeit eine Fülle von Informationen über die C-terminale *Core*-Domäne des IE2-Proteins. Die gründliche Interpretation dieser Daten, auch in Zusammenhang mit rechnergestützten Strukturvorhersagen, zeigt Ansatzpunkte für die weitere Erforschung dieses wichtigen HCMV-Proteins auf.

## A. Verwendete Oligonukleotide

**Tabelle A.1.:** Mutagene Oligonukleotide, Metabion international AG, Martinsried. Die gegenüber wt veränderten Nukleotide sind unterstrichen. Dort wo eine neue Restriktionschnittstelle eingeführt werden konnte, ist das entsprechende Enzym in der letzten Spalte angegeben.

H453A	5' -ATG CCC GTG ACA <u>GCT</u> CCA CCC GAA GTG-3'	
E456A	5' -ACA CAT CCA CCC <u>GCG</u> GTG GCG CAG CGC-3'	<i>SacII</i>
A464S	5' -CGC ACA GCC GAT <u>TCT</u> TGT AAC GAA GGC-3'	
G468A	5' -GCT TGT AAC GAA <u>GCC</u> GTC AAG GCC GCG-3'	
K470A	5' -AAC GAA GGC GTC <u>GCG</u> GCC GCG TGG AGC-3'	
W473A	5' -GTC AAG GCC GCG <u>GCT</u> AGC CTC AAA GAA-3'	<i>NheI</i>
S474A	5' -AAG GCC GCG TGG <u>GCC</u> CTC AAA GAA TTG-3'	
L475A	5' -GCC GCG TGG AGC <u>GCT</u> AAA GAA TTG CAC-3'	
H481A	5' -GAA TTG CAC ACC <u>GCC</u> CAA TTA TGC CCC-3'	
P485A	5' -CAC CAA TTA TGC <u>GCC</u> CGT TCC TCC GAT-3'	
R486A	5' -CAA TTA TGC CCC <u>GCT</u> TCC TCC GAT TAC-3'	
S488A	5' -TGC CCC CGT TCC <u>GCC</u> GAT TAC CGC AAC-3'	
D489A	5' -CCC CGT TCC TCC <u>GCT</u> TAC CGC AAC ATG-3'	
Y490A	5' -CGT TCC TCC GAT <u>GCG</u> CGC AAC ATG ATC-3'	
R491A	5' -TCC TCC GAT TAC <u>GCC</u> AAC ATG ATC ATC-3'	
M493A	5' -GAT TAC CGC AAC <u>GCG</u> ATC ATC CAC GCT-3'	
I494A	5' -TAC CGC AAC ATG <u>GCC</u> ATC CAC GCT GCC-3'	
I495A	5' -CGC AAC ATG ATC <u>GCC</u> CAC GCT GCC ACC-3'	
A497S	5' -ATG ATC ATC CAC <u>TCT</u> GCC ACC CCC GTG-3'	
A498S	5' -ATC ATC CAC GCT <u>AGC</u> ACC CCC GTG GAC-3'	<i>NheI</i>
T499A	5' -ATC CAC GCT GCG <u>GCG</u> CCC GTG GAC CTG-3'	<i>NarI</i>
P500A	5' -CAC GCT GCC ACC <u>GCC</u> GTG GAC CTG TTG-3'	
D502A	5' -GCC ACC CCC GTG <u>GCC</u> CTG TTG GGC GCT-3'	
L503A	5' -ACC CCC GTG GAC <u>GCG</u> TTG GGC GCT CTC-3'	<i>MluI</i>
L504A	5' -CCC GTG GAC CTG <u>GCG</u> GGC GCT CTC AAC-3'	
A506S	5' -GAC CTG TTG GGA <u>TCC</u> CTC AAC CTG TGC CTG-3'	<i>BamHI</i>
L507A	5' -CTG TTG GGC GCT <u>GCC</u> AAC CTG TGC CTG-3'	
L509A	5' -GGC GCT CTC AAC <u>GCG</u> TGC CTG CCC CTG-3'	
C510A	5' -GCT CTC AAC CTG <u>GCC</u> CTG CCC CTG ATG-3'	
L511A	5' -CTC AAC CTG TGC <u>GCG</u> CCC CTG ATG CAA-3'	<i>BssHII</i>
L513A	5' -CTG TGC CTG CCC <u>GCG</u> ATG CAA AAG TTT-3'	
M514A	5' -TGC CTG CCC CTG <u>GCG</u> CAA AAG TTT CCC-3'	
Q515A	5' -CTG CCC CTG ATG <u>GCA</u> AAG TTT CCC AAA-3'	
F517A	5' -CTG ATG CAA AAG <u>GCT</u> CCC AAA CAG GTC-3'	

## A. Verwendete Oligonukleotide

P518A	5´-ATG CAA AAG TTT <u>GCC</u> AAA CAG GTC ATG-3´
K519A	5´-CAA AAG TTT CCC <u>GCA</u> CAG GTC ATG GTG-3´
V521A	5´-TTT CCC AAA CAG <u>GCC</u> ATG GTG CGC ATC-3´
V523A	5´-AAA CAG GTC ATG <u>GCG</u> CGC ATC TTC TCC-3´
R524A	5´-CAG GTC ATG GTG <u>GCC</u> ATC TTC TCC ACC-3´
I525A	5´-GTC ATG GTG CGC <u>GCC</u> TTC TCC ACC AAC-3´
F526A	5´-ATG GTG CGC ATC <u>GCC</u> TCC ACC AAC CAG-3´
F533A	5´-AAC CAG GGT GGG <u>GCC</u> ATG CTG CCT ATC-3´
M534A	5´-CAG GGT GGG TTC <u>GCG</u> CTG CCT ATC TAC-3´
L535A	5´-GGT GGG TTC ATG <u>GCG</u> CCT ATC TAC GAG-3´
P536A	5´-GGG TTC ATG CTG <u>GCT</u> ATC TAC GAG ACG-3´
I537A	5´-TTC ATG CTG CCT <u>GCC</u> TAC GAG ACG GCC-3´
Y538A	5´-ATG CTG CCT ATC <u>GCC</u> GAG ACG GCC GCG-3´
E539A	5´-CTG CCT ATC TAC <u>GCG</u> ACG GCC GCG AAG-3´
Y545A	5´-GCC GCG AAG GCC <u>GCC</u> GCC GTG GGG CAG-3´
Q549A	5´-TAC GCC GTG GGG <u>GCG</u> TTT GAG CAG CCC-3´
F550A	5´-GCC GTG GGG CAG <u>GCT</u> GAG CAG CCC ACC-3´
E551A	5´-GTG GGG CAG TTT <u>GCG</u> CAG CCC ACC GAG-3´
Q549R	5´-TAC GCC GTG GGG <u>CGG</u> TTT GAG CAG CCC-3´

---

T7-Oligonukleotid	5´-AATACGACTCACTATAG-3´
SG5-antisense	5´-ACCACAAGTGAATGCAG-3´

**Tabelle A.2.:** Sequenzier-Primer. Die *Primer* sind an ihrem 5´-Ende mit einer Fluoreszenz-Markierung (IRD800) versehen. Die *Primer* waren aus früheren Versuchen bereits im Labor vorhanden (Asmar *et al.*, 2004).

MIEP sense	5´ -GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT <u>CGTTTAGTGAACCGTCAGA</u> -TCGCCTGGAGAC - 3´
MIEP antisense	5´ -GATGCGTCTCCAGGCGATCTG <u>ACGGTTCACTAAACGAGCTCTGCT</u> -TATATAGACCTCC - 3´
MIEP crs mut sense	5´ -GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCCTAGGTAGTGAACCGTCAGA-TCGCCTGGAGAC - 3´
MIEP crs mut antisense	5´ -GATGCGTCTCCAGGCGATCTG <u>ACGGTTCACTACCTAGGCTCTGCT</u> -TATATAGACCTCC - 3´

**Tabelle A.3.:** CRS-Sonden Oligonukleotide. Die Oligonukleotide waren aus früheren Versuchen bereits im Labor vorhanden (Asmar *et al.*, 2004). Für andere Anwendungen ist der Sense-Strang mit einer 5´-Biotinmarkierung versehen. Die CRS – bzw. bei der mutierten Sonde der mit dieser identische Abschnitt – ist unterstrichen.

## B. Abkürzungsverzeichnis

AC	<i>(virion) assembly compartment</i>
Akt	Akt1, Proteinkinase B
Amp	Ampicillin
AP1	<i>activator protein 1</i>
AS	Aminosäure
ATF	<i>activating transcription factor</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
C/EBP	CCAAT/ <i>enhancer binding protein</i>
CAT	Chloramphenicoltransferase
CBP	CREB <i>binding protein</i> (p300)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i>
Cdk <sub>i</sub>	<i>Cdk inhibitor</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CREB	cAMP <i>responsive element binding protein</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DE	<i>delayed-early</i>
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i> , Gelretardierungsexperiment
ERF	<i>Ets2 repressor factor</i>
ETS	<i>erythroblast transformation specific (domain)</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
GAS	IFN- $\gamma$ - <i>activated site</i>
GCV	Ganciclovir
Gfi-1	<i>Growth factor independent 1</i>
HA	Hämagglutinin
HAT	Histonacetyltransferase
HCMV	<i>human cytomegalovirus</i> , humanes Zytomegalievirus
HDAC	<i>histone deacetylase</i>
IE	<i>immediate-early</i>
IFN	Interferon



IL-8	Interleukin-8
IRF	<i>interferon response factor</i>
IRL	<i>internal repeat long</i>
IRS	<i>internal repeat short</i>
ISG	<i>interferon-stimulated gene</i>
kbp	Kilobasenpaare
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
MCM	<i>mini-chromosome maintenance complex</i>
MCP	<i>major capsid protein</i>
MCP-2	<i>monocyte chemotactic protein-2</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIE	<i>major immediate-early</i>
MIEP/E	<i>major-immediate-early-promoter-enhancer</i>
MIEP	<i>major immediate-early promoter</i>
MIG	<i>monokine induced by interferon-<math>\gamma</math></i>
MIP-1 $\alpha$	<i>macrophage inflammatory protein-1<math>\alpha</math></i>
MnCP	<i>minor capsid protein</i>
MnCP-bp	<i>MnCP-binding protein</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA, Boten-RNA</i>
NF-1	<i>nuclear factor 1</i>
NIEP	<i>non infectious enveloped particle</i>
NK-Zelle	<i>natural-killer-Zelle</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis, Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PI-3	<i>Phosphoinositid-3'-OH</i>
pRB	<i>Retinoblastomprotein</i>
RANTES	<i>regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i>
RNA	<i>ribonucleic acid, Ribonukleinsäure</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
SCP	<i>small capsid protein</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SUMO	<i>small ubiquitinlike modifier</i>
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TBS	<i>tris-buffered saline, Tris-gepufferte Salzlösung</i>
TE	<i>Tris-EDTA-Puffer</i>
TRL	<i>terminal repeat long</i>
TRS	<i>terminal repeat short</i>
TTBS	<i>tris-tween-buffered saline, Tris-gepufferte Polysorbat-Salzlösung</i>
UL	<i>emphunique long</i>
US	<i>emphunique short</i>
vICA	<i>viral inhibitor of caspase-8 activation</i>

## B. Abkürzungsverzeichnis

vMIA	<i>viral mitochondrial inhibitor of apoptosis</i>
wt	Wildtyp
YY1	<i>Yin-Yang-1</i>

## C. Tabellenverzeichnis

1.1. Unterschiede der IE2-Sequenz <i>Towne/AD169</i> . . . . .	19
2.1. Kunststoffschalen verschiedener Größe . . . . .	41
3.1. DNA-Kontaktvorhersage . . . . .	71
4.1. Expression nach Codon . . . . .	80
4.2. Schlecht exprimierende Mutanten. . . . .	81
A.1. Mutagene Oligonukleotide . . . . .	99
A.2. Sequenzier- <i>Primer</i> . . . . .	100
A.3. CRS-Sonden Oligonukleotide . . . . .	101

## D. Abbildungsverzeichnis

1.1. HCMV-Genom –Schematisch . . . . .	3
1.2. NF- $\kappa$ B/HCMV-Wechselwirkungen – Schema . . . . .	12
1.3. Zellzyklus – Schema . . . . .	13
1.4. <i>Major immediate-early</i> -Promotorregion – Schematisch . . . . .	18
1.5. <i>Immediate-early-2</i> -Protein – Schematisch . . . . .	25
3.1. Experimentelles System – Übersicht . . . . .	56
3.2. Aminosäuresequenzen verschiedener IE2 homologer Proteine . . . . .	59
3.3. Expression in U373-MG-Zellen – <i>Immunoblot</i> . . . . .	60
3.4. Expression in U373-MG-Zellen – Balkengrafik . . . . .	61
3.5. Dosis Wirkungsanalyse UL112/113 . . . . .	62
3.6. Expression in HeLa-Zellen – Immunoblot . . . . .	62
3.7. Immunfluoreszenz . . . . .	63
3.8. Transaktivierung – fos – Balkengrafik . . . . .	64
3.9. Transaktivierung – UL112/113 – Balkengrafik . . . . .	66
3.10. Autorepression – Balkengrafik . . . . .	67
3.11. Gelretardierungsexperimente – Autoradiografie . . . . .	68
3.12. Gelretardierungsexperimente – Balkengrafik . . . . .	69
3.13. Gelretardierungsexperimente (Wiederholung) – Autoradiografie . . . . .	69
3.14. Zellzyklusarrest – Balkengrafik . . . . .	72
3.15. Q549-Mutanten – Zellzyklushistogramme . . . . .	73
3.16. Übersichtsdarstellung der Ergebnisse . . . . .	75
4.1. Interne Helix im 3D-Strukturmodell . . . . .	82
4.2. Strukturmodell – DNA-Kontakte . . . . .	90
4.3. Struktur-Funktionsbeziehungen der IE2- <i>Core</i> -Domäne – Schematisch . .	95

## E. Literaturverzeichnis

- ABUBAKAR, Sazaly; AU, William W.; LEGATOR, Marvin S. und ALBRECHT, Thomas. Induction of chromosome aberrations and mitotic arrest by cytomegalovirus in human cells. *Environ Mol Mutagen*, 12(4):409–420 (1988). DOI:10.1002/em.2860120409.
- AHMAD, Shandar und SARAI, Akinori. PSSM-based prediction of DNA binding sites in proteins. *BMC Bioinformatics*, 6(1):33 (2005). DOI:10.1186/1471-2105-6-33.
- AHN, J. H.; CHIOU, C. J. und HAYWARD, G. S. Evaluation and mapping of the DNA binding and oligomerization domains of the IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus using yeast one and two hybrid interaction assays. *Gene*, 210(1):25–36 (1998a).
- AHN, J. H. und HAYWARD, G. S. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol*, 71(6):4599–4613 (1997). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/71/6/4599>.
- AHN, J. H.; JANG, W. J. und HAYWARD, G. S. The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10). *J Virol*, 73(12):10458–10471 (1999). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/73/12/10458>.
- AHN, Jin-Hyun; BRIGNOLE, III, Edward J. und HAYWARD, Gary S. Disruption of PML Subnuclear Domains by the Acidic IE1 Protein of Human Cytomegalovirus Is Mediated through Interaction with PML and May Modulate a RING Finger-Dependent Cryptic Transactivator Function of PML. *Mol Cell Biol*, 18(8):4899–4913 (1998b). <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/18/8/4899>.
- AHN, Jin-Hyun; XU, Yixun; JANG, Won-Jong; MATUNIS, Michael J. und HAYWARD, Gary S. Evaluation of Interactions of Human Cytomegalovirus Immediate-Early IE2 Regulatory Protein with Small Ubiquitin-Like Modifiers and Their Conjugation Enzyme Ubc9. *J. Virol.*, 75(8):3859–3872 (2001). DOI:10.1128/JVI.75.8.3859-3872.2001.
- ALBRECHT, T.; BOLDOGH, I.; FONS, M.; ABUBAKAR, S. und DENG, C. Z. Cell activation signals and the pathogenesis of human cytomegalovirus. *Intervirology*, 31(2-4):68–75 (1990).
- ALLART, Sophie; MARTIN, Helene; DETRAVES, Claire; TERRASSON, Jerome; CAPUT, Daniel und DAVRINCHE, Christian. Human Cytomegalovirus Induces Drug Resistance and Alteration of Programmed Cell Death by Accumulation of Delta N-p73alpha. *J Biol Chem*, 277(32):29063–29068 (2002). DOI:10.1074/jbc.M201974200.

- ANDERS, David G.; KERRY, Julie A. und S.PARI, Gregory. DNA synthesis and late viral gene expression. In: Arvin *et al.* (2007), Kap. 19, S. 295–310.
- ANDERSON, K. P.; FOX, M. C.; BROWN-DRIVER, V.; MARTIN, M. J. und AZAD, R. F. Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by an antisense oligonucleotide complementary to immediate-early RNA. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(9):2004–2011 (1996). <http://aac.asm.org/cgi/content/abstract/40/9/2004>.
- ANDONIOU, Christopher E und DEGLI-ESPOSTI, Mariapia A. Insights into the mechanisms of CMV-mediated interference with cellular apoptosis. *Immunol Cell Biol*, 84(1):99–106 (2006). DOI:10.1111/j.1440-1711.2005.01412.x.
- ARLT, H.; LANG, D.; GEBERT, S. und STAMMINGER, T. Identification of binding sites for the 86-kilodalton IE2 protein of human cytomegalovirus within an IE2-responsive viral early promoter. *J Virol*, 68(7):4117–4125 (1994).
- ARVIN, Ann; CAMPADELLI-FIUME, Gabriella; MOCARSKI, Edward; MOORE, Patrick S.; ROIZMAN, Bernard; WHITLEY, Richard und YAMANISHI, Koichi (Hg.). *Human Herpesviruses. Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, Cambridge (2007).
- ASMAR, Jasmin. *Struktur-Funktionsanalyse des Immediate-Early Proteins 2 (IE2) des humanen Zytomegalievirus*. Dissertation Dr. rer. nat., Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin (2004).
- ASMAR, Jasmin; WIEBUSCH, Lüder; TRUSS, Matthias und HAGEMEIERS, Christian. 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):11853–11864 (2004). DOI: 10.1128/JVI.78.21.11853-11864.2004.
- BAIN, Mark; MENDELSON, Marc und SINCLAIR, John. Ets-2 Repressor Factor (ERF) mediates repression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter in undifferentiated non-permissive cells. *J Gen Virol*, 84(1):41–49 (2003). DOI: 10.1099/vir.0.18633-0.
- BARACCHINI, Edgardo; GLEZER, Emilia; FISH, Kenneth; STENBERG, Richard M.; NELSON, Jay A. und GHAZAL, Peter. An isoform variant of the cytomegalovirus immediate-early auto repressor functions as a transcriptional activator. *Virology*, 188(2):518–529 (1992). <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WXR-4BNVGYH-3V/2/eedb53222c1b279f9c7cafd469c26c4d>.
- BARRASA, M. Inmaculada; HAREL, Noam; YU, Yongjun und ALWINE, James C. Strain variations in single amino acids of the 86-kilodalton human cytomegalovirus major immediate-early protein (IE2) affect its functional and biochemical properties: implications of dynamic protein conformation. *J Virol*, 77(8):4760–4772 (2003). DOI: 10.1128/JVI.77.8.4760-4772.2003.

- BARRASA, M. Inmaculada; HAREL, Noam Y und ALWINE, James C. The phosphorylation status of the serine-rich region of the human cytomegalovirus 86-kilodalton major immediate-early protein IE2/IEP86 affects temporal viral gene expression. *J Virol*, 79(3):1428–1437 (2005). DOI:10.1128/JVI.79.3.1428-1437.2005.
- BEITZ, E. TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics*, 16(2):135–139 (2000).
- BENSON, J D und HUANG, E S. Human cytomegalovirus induces expression of cellular topoisomerase II. *J. Virol.*, 64(1):9–15 (1990). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/64/1/9>.
- BIRNBOIM, H. C. und DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6):1513–1523 (1979).
- BIRON, K. K.; FYFE, J. A.; STANAT, S. C.; LESLIE, L. K.; SORRELL, J. B.; LAMBE, C. U. und COEN, D. M. A human cytomegalovirus mutant resistant to the nucleoside analog 9-([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine (BW B759U) induces reduced levels of BW B759U triphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(22):8769–8773 (1986).
- BISWAS, Nilima; SANCHEZ, Veronica und SPECTOR, Deborah H. Human cytomegalovirus infection leads to accumulation of geminin and inhibition of the licensing of cellular DNA replication. *J Virol*, 77(4):2369–2376 (2003). DOI:10.1128/JVI.77.4.2369-2376.2003.
- BOECKH, M.; GLEAVES, C. A.; BINDRA, R. und MEYERS, J. D. Comparison of MRC-5 and U-373MG astrocytoma cells for detection of cytomegalovirus in shell vial centrifugation cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 10(7):569–572 (1991).
- BOEHME, Karl W; GUERRERO, Mario und COMPTON, Teresa. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol*, 177(10):7094–7102 (2006).
- BOLDOGH, I; ABUBAKAR, S und ALBRECHT, T. Activation of proto-oncogenes: an immediate early event in human cytomegalovirus infection. *Science*, 247(4942):561–564 (1990). DOI:10.1126/science.1689075.
- BOLOVAN-FRITTS, Cynthia A.; MOCARSKI, Edward S. und WIEDEMAN, Jean A. Peripheral Blood CD14+ Cells From Healthy Subjects Carry a Circular Conformation of Latent Cytomegalovirus Genome. *Blood*, 93(1):394–398 (1999). <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/bloodjournal;93/1/394>.
- BONIN, L. R. und McDUGALL, J. K. Human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein binds p53 but does not abrogate G1 checkpoint function. *J Virol*, 71(8):5861–5870 (1997).

- BOSHART, M.; WEBER, F.; JAHN, G.; DORSCH-HÄSLER, K.; FLECKENSTEIN, B. und SCHAFFNER, W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 41(2):521–530 (1985).
- BOYLE, K. A. und COMPTON, T. Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Virol*, 72(3):1826–1833 (1998).
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254 (1976). DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- BRESNAHAN, W. A.; BOLDOGH, I.; THOMPSON, E. A. und ALBRECHT, T. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology*, 224(1):150–160 (1996). DOI:10.1006/viro.1996.0516.
- BRESNAHAN, WA; THOMPSON, EA und ALBRECHT, T. Human cytomegalovirus infection results in altered Cdk2 subcellular localization. *J Gen Virol*, 78(8):1993–1997 (1997). <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/78/8/1993>.
- BRESNAHAN, Wade A.; ALBRECHT, Thomas und THOMPSON, E. Aubrey. The Cyclin E Promoter Is Activated by Human Cytomegalovirus 86-kDa Immediate Early Protein. *J. Biol. Chem.*, 273(34):22075–22082 (1998). DOI:10.1074/jbc.273.34.22075.
- BRITT, William J. Maturation and egress. In: Arvin *et al.* (2007), Kap. 20, S. 311–323.
- BRITT, William J. Virus entry into host, establishment of infection, spread in host, mechanisms of tissue damage. In: Arvin *et al.* (2007), Kap. 41, S. 737–764.
- BROWNE, Edward P. und SHENK, Thomas. Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20):11439–11444 (2003). DOI:10.1073/pnas.1534570100.
- BRYANT, L. A.; MIXON, P.; DAVIDSON, M.; BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. und SINCLAIR, J. H. The human cytomegalovirus 86-kilodalton major immediate-early protein interacts physically and functionally with histone acetyltransferase P/CAF. *J Virol*, 74(16):7230–7237 (2000).
- BURGDORF, Sarah W.; CLARK, Charles L.; BURGDORF, James R. und SPECTOR, Deborah H. Mutation of Glutamine to Arginine at position 548 of IE2 86 in Human Cytomegalovirus leads to decreased expression of IE2 40, IE2 60, UL83 and UL84 and increased transcription of US8-9 and US29-32. *J Virol* (2011). DOI:10.1128/JVI.05315-11.
- CASTILLO, Jonathan P; FRAME, Fiona M; ROGOFF, Harry A; PICKERING, Mary T; YUROCHKO, Andrew D und KOWALIK, Timothy F. Human cytomegalovirus IE1-72 activates ataxia telangiectasia mutated kinase and a p53/p21-mediated growth arrest response. *J Virol*, 79(17):11467–11475 (2005). DOI:10.1128/JVI.79.17.11467-11475.2005.



- CASWELL, R.; HAGEMEIER, C.; CHIOU, C. J.; HAYWARD, G.; KOUZARIDES, T. und SINCLAIR, J. 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):2691–2698 (1993).
- CHEN, C. und OKAYAMA, H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, 7(8):2745–2752 (1987).
- CHEN, Jiping und STINSKI, Mark F. Activation of Transcription of the Human Cytomegalovirus Early UL4 Promoter by the Ets Transcription Factor Binding Element. *J. Virol.*, 74(21):9845–9857 (2000). DOI:10.1128/JVI.74.21.9845-9857.2000.
- CHERRINGTON, J. M.; KHOURY, E. L. und MOCARSKI, E. S. Human cytomegalovirus ie2 negatively regulates alpha gene expression via a short target sequence near the transcription start site. *J Virol*, 65(2):887–896 (1991).
- CHERRINGTON, J. M. und MOCARSKI, E. S. Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J Virol*, 63(3):1435–1440 (1989).
- CHILD, Stephanie J; HAKKI, Morgan; NIRO, Katherine L De und GEBALLE, Adam P. Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *J Virol*, 78(1):197–205 (2004).
- CHIOU, C. J.; ZONG, J.; WAHEED, I. und HAYWARD, G. S. Identification and mapping of dimerization and DNA-binding domains in the C terminus of the IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus. *J Virol*, 67(10):6201–6214 (1993).
- CINATL, Jr., Jindrich; CINATL, Jaroslav; VOGEL, Jens-U.; RABENAU, Holger; KORNHUBER, Bernhard und DOERR, Hans W. Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. *Intervirology*, 39(4):259–269 (1996).
- COLIGAN, J.E.; KRUISBEEK, A.M.; MARGULIES, D.H.; SHEVACH, E.M. und STROBER, W. (Hg.). *Current protocols in immunology*. John Wiley & Sons, New York, NY (1991).
- COLLETTI, Kelly S; XU, Yiyang; CEI, Sylvia A; TARRANT, Margaret und PARI, Gregory S. Human cytomegalovirus UL84 oligomerization and heterodimerization domains act as transdominant inhibitors of oriLyt-dependent DNA replication: evidence that IE2-UL84 and UL84-UL84 interactions are required for lytic DNA replication. *J Virol*, 78(17):9203–9214 (2004). DOI:10.1128/JVI.78.17.9203-9214.2004.
- COLLETTI, Kelly S.; XU, Yiyang; YAMBOLIEV, Irena und PARI, Gregory S. Human Cytomegalovirus UL84 Is a Phosphoprotein That Exhibits UTPase Activity and Is a Putative Member of the DExD/H Box Family of Proteins. *J Biol Chem*, 280(12):11955–11960 (2005). DOI:10.1074/jbc.C400603200.

- COMPTON, T.; NOWLIN, D. M. und COOPER, N. R. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, 193(2):834–841 (1993). DOI:10.1006/viro.1993.1192.
- COMPTON, Teresa und FEIRE, Adam. Early events in human cytomegalovirus infection. In: Arvin *et al.* (2007), Kap. 16, S. 231–240.
- COMPTON, Teresa; KURT-JONES, Evelyn A; BOEHME, Karl W; BELKO, John; LATZ, Eicke; GOLENBOCK, Douglas T und FINBERG, Robert W. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol*, 77(8):4588–4596 (2003).
- CUNNINGHAM, Brian C. und WELLS, James A. High-Resolution Epitope Mapping of hGH-Receptor Interactions by Alanine-Scanning Mutagenesis. *Science*, 244(4908):1081–1085 (1989). <http://www.jstor.org/stable/1704002>.
- DAL MONTE, P; PIGNATELLI, S.; ZINI, N.; MARALDI, N. M.; PERRET, E.; PREVOST, M. C. und LANDINI, M. P. Analysis of intracellular and intraviral localization of the human cytomegalovirus UL53 protein. *J Gen Virol*, 83(5):1005–1012 (2002). <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/83/5/1005>.
- DAS, Subhendu; VASANJI, Amit und PELLETT, Philip E. Three-Dimensional Structure of the Human Cytomegalovirus Cytoplasmic Virion Assembly Complex Includes a Reoriented Secretory Apparatus. *J Virol*, 81(21):11861–11869 (2007). DOI:10.1128/JVI.01077-07.
- DELANO, Warren L. Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(1):14–20 (2002). <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VS6-452VM6X-4/1/865008a7b6a6f02039abc9e50d218f4f>.
- DEMERITT, Ian B.; MILFORD, Liesl E. und YUROCHKO, Andrew D. Activation of the NF-kappaB Pathway in Human Cytomegalovirus-Infected Cells Is Necessary for Efficient Transactivation of the Major Immediate-Early Promoter. *J Virol*, 78(9):4498–4507 (2004). DOI:10.1128/JVI.78.9.4498-4507.2004.
- DITTMER, D und MOCARSKI, ES. Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition. *J Virol*, 71(2):1629–1634 (1997). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/71/2/1629>.
- DOWER, W. J.; MILLER, J. F. und RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16(13):6127–6145 (1988).
- DUNN, Walter; CHOU, Cassie; LI, Hong; HAI, Rong; PATTERSON, David; STOLC, Viktor; ZHU, Hua und LIU, Fenyong. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24):14223–14228 (2003). DOI:10.1073/pnas.2334032100.

- DUNN, Walter; TRANG, Phong; ZHONG, Qiu; YANG, Edward; VAN BELLE, Christopher und LIU, Fenyong. Human cytomegalovirus expresses novel microRNAs during productive viral infection. *Cell Microbiol*, 7(11):1684–1695 (2005). DOI:10.1111/j.1462-5822.2005.00598.x.
- EL-GEWELY, M Raafat; FENTON, Chris; SALOMONSEN, Laila J und XU, Hao. Mutagenesis: Site-specific. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, Bd. 12, S. 493–505. John Wiley & Sons, Chichester (2005).
- FICKENSCHER, H.; STAMMINGER, T.; RÜGER, R. und FLECKENSTEIN, B. The role of a repetitive palindromic sequence element in the human cytomegalovirus major immediate early enhancer. *J Gen Virol*, 70 (Pt 1):107–123 (1989).
- FISH, K. N.; SODERBERG-NAUCLER, C.; MILLS, L. K.; STENGLER, S. und NELSON, J. A. Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *J Virol*, 72(7):5661–5668 (1998).
- FORTUNATO, E. A.; SOMMER, M. H.; YODER, K. und SPECTOR, D. H. 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):8176–8185 (1997).
- FORTUNATO, E. A. und SPECTOR, D. H. p53 and RPA are sequestered in viral replication centers in the nuclei of cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol*, 72(3):2033–2039 (1998).
- FORTUNATO, Elizabeth A.; DELL'AQUILA, Marie L. und SPECTOR, Deborah H. Specific chromosome 1 breaks induced by human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(2):853–858 (2000). DOI:10.1073/pnas.97.2.853.
- FORTUNATO, Elizabeth A.; SANCHEZ, Veronica; YEN, Judy Y. und SPECTOR, Deborah H. Infection of Cells with Human Cytomegalovirus during S Phase Results in a Blockade to Immediate-Early Gene Expression That Can Be Overcome by Inhibition of the Proteasome. *J Virol*, 76(11):5369–5379 (2002). DOI:10.1128/JVI.76.11.5369-5379.2002.
- FURNARI, B. A.; POMA, E.; KOWALIK, T. E.; HUONG, S. M. und HUANG, E. S. Human cytomegalovirus immediate-early gene 2 protein interacts with itself and with several novel cellular proteins. *J Virol*, 67(8):4981–4991 (1993).
- FUXE, J.; AKUSJÄRVI, G.; GOIKE, H. M.; ROOS, G.; COLLINS, V. P. und PETTERSSON, R. F. Adenovirus-mediated overexpression of p15INK4B inhibits human glioma cell growth, induces replicative senescence, and inhibits telomerase activity similarly to p16INK4A. *Cell Growth Differ*, 11(7):373–384 (2000).
- GAWN, Jonathan M und GREAVES, Richard F. Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a broad block to viral delayed-early gene expression. *J Virol*, 76(9):4441–4455 (2002). DOI:10.1128/JVI.76.9.4441-4455.2002.

- GIBSON, W. Structure and assembly of the virion. *Intervirology*, 39(5–6):389–400 (1996).
- GOLDMACHER, V. S.; BARTLE, L. M.; SKALETSKAYA, A.; DIONNE, C. A.; KEDERSHA, N. L.; VATER, C. A.; HAN, J. W.; LUTZ, R. J.; WATANABE, S.; MCFARLAND, E. D. Cahir; KIEFF, E. D.; MOCARSKI, E. S. und CHITTENDEN, T. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22):12536–12541 (1999). <http://www.pnas.org/cgi/content/full/96/22/12536>.
- GRANTHAM, Richard L. Codon Usage in Molecular Evolution. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, Bd. 4, S. 651–657. John Wiley & Sons, Chichester (2005).
- GRANZOW, Harald; KLUPP, Barbara G.; FUCHS, Walter; VEITS, Jutta; OSTERRIEDER, Nikolaus und METTENLEITER, Thomas C. Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study. *J Virol*, 75(8):3675–3684 (2001). DOI:10.1128/JVI.75.8.3675-3684.2001.
- GREY, Finn; ANTONIEWICZ, Andy; ALLEN, Edwards; SAUGSTAD, Julie; MCSHEA, Andy; CARINGTON, James C und NELSON, Jay. Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *J Virol*, 79(18):12095–12099 (2005). DOI: 10.1128/JVI.79.18.12095-12099.2005.
- HAGEMEIER, C.; CASWELL, R.; HAYHURST, G.; SINCLAIR, J. und KOUZARIDES, T. Functional interaction between the HCMV IE2 transactivator and the retinoblastoma protein. *EMBO J*, 13(12):2897–2903 (1994).
- HAGEMEIER, C.; WALKER, S.; CASWELL, R.; KOUZARIDES, T. und SINCLAIR, J. The human cytomegalovirus 80-kilodalton but not the 72-kilodalton immediate-early protein transactivates heterologous promoters in a TATA box-dependent mechanism and interacts directly with TFIID. *J Virol*, 66(7):4452–4456 (1992a).
- HAGEMEIER, C.; WALKER, S. M.; SISSONS, P. J. und SINCLAIR, J. H. The 72K IE1 and 80K IE2 proteins of human cytomegalovirus independently trans-activate the c-fos, c-myc and hsp70 promoters via basal promoter elements. *J Gen Virol*, 73 (Pt 9):2385–2393 (1992b).
- HAGEMEIER, Christian. Site-Directed Mutagenesis Using a Uracil-Containing Phagemid Template. In: TROWER, Michael K. (Hg.), *In Vitro Mutagenesis Protocols.*, Nr. 57 in *Methods in Molecular Biology.*, Kap. 4, S. 45–54. Humana Press Inc., Totowa, NJ (1996).
- HAREL, N. Y. und ALWINE, J. C. Phosphorylation of the human cytomegalovirus 86-kilodalton immediate-early protein IE2. *J Virol*, 72(7):5481–5492 (1998).
- HARRIS, Siabhon M; BULLOCK, Brady; WESTGARD, Elizabeth; ZHU, Hua; STENBERG, Richard M und KERRY, Julie A. Functional properties of the human cytomegalovirus IE86 protein required for transcriptional regulation and virus replication. *J Virol*, 84(17):8839–8848 (2010). DOI:10.1128/JVI.00327-10.

- HAYAJNEH, W. A.; CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D. G.; LESPERANCE, M. M.; VENEGAS, A. M. und COLBERG-POLEY, A. M. The carboxyl terminus of the human cytomegalovirus UL37 immediate-early glycoprotein is conserved in primary strains and is important for transactivation. *J Gen Virol*, 82(Pt 7):1569–1579 (2001). <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/full/82/7/1569>.
- HAYASHI, Mansuo Lu; BLANKENSHIP, Catherine und SHENK, Thomas. 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):2692–2696 (2000). DOI:10.1073/pnas.050587597.
- HEIDER, Julie A; BRESNAHAN, Wade A und SHENK, Thomas E. Construction of a rationally designed human cytomegalovirus variant encoding a temperature-sensitive immediate-early 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5):3141–3146 (2002a). DOI: 10.1073/pnas.052710599.
- HEIDER, Julie A; YU, Yongjun; SHENK, Thomas und ALWINE, James C. Characterization of a human cytomegalovirus with phosphorylation site mutations in the immediate-early 2 protein. *J Virol*, 76(2):928–932 (2002b). DOI:10.1128/JVI.76.2.928-932.2002.
- HERMISTON, T W; MALONE, C L; WITTE, P R und STINSKI, M F. Identification and characterization of the human cytomegalovirus immediate-early region 2 gene that stimulates gene expression from an inducible promoter. *J. Virol.*, 61(10):3214–3221 (1987). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/61/10/3214>.
- HERTEL, Laura; CHOU, Sunwen und MOCARSKI, Edward S. Viral and cell cycle-regulated kinases in cytomegalovirus-induced pseudomitosis and replication. *PLoS Pathog*, 3(1):e6 (2007). DOI:10.1371/journal.ppat.0030006.
- HERTEL, Laura und MOCARSKI, Edward S. Global analysis of host cell gene expression late during cytomegalovirus infection reveals extensive dysregulation of cell cycle gene expression and induction of Pseudomitosis independent of US28 function. *J Virol*, 78(21):11988–12011 (2004). DOI:10.1128/JVI.78.21.11988-12011.2004.
- HOFMANN, H.; FLÖSS, S. und STAMMINGER, T. Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J Virol*, 74(6):2510–2524 (2000).
- HOMMAN-LOUDIYI, M.; HULTENBY, K.; BRITT, W. und SODERBERG-NAUCLER, C. Envelopment of Human Cytomegalovirus Occurs by Budding into Golgi-Derived Vacuole Compartments Positive for gB, Rab 3, Trans-Golgi Network 46, and Mannosidase II. *J Virol*, 77(5):3191–3203 (2003). DOI:10.1128/JVI.77.5.3191-3203.2003.
- HORN, P. B. Vander; DAVIS, M. C.; CUNNIFF, J. J.; RUAN, C.; McARDLE, B. F.; SAMOLS, S. B.; SZASZ, J.; HU, G.; HUYER, K. M.; DOMKE, S. T.; BRUMMETT, S. R.; MOFFETT, R. B. und FULLER, C. W. Thermo Sequenase DNA polymerase and *T. acidophilum* pyrophosphatase: new thermostable enzymes for DNA sequencing. *Biotechniques*, 22(4):758–62, 764–5 (1997).

- HSU, Chih-Hung; CHANG, Margaret D T; TAI, Kang-Yu; YANG, Yu-Ting; WANG, Pei-Shan; CHEN, Chi-Ju; WANG, Yan-Hsiung; LEE, Sheng-Chung; WU, Cheng-Wen und JUAN, Li-Jung. HCMV IE2-mediated inhibition of HAT activity downregulates p53 function. *EMBO J*, 23(11):2269–2280 (2004). DOI:10.1038/sj.emboj.7600239.
- HUANG, C.H. und CHEN, J.Y. Identification of Additional IE2-p86-Responsive cis - Repressive Sequences within the Human Cytomegalovirus Major Immediate Early Gene Promoter. *J Biomed Sci*, 9(5):460–470 (2002). DOI:10.1159/000064557.
- HUANG, L und STINSKI, MF. Binding of cellular repressor protein or the IE2 protein to a cis- acting negative regulatory element upstream of a human cytomegalovirus early promoter. *J. Virol.*, 69(12):7612–7621 (1995). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/69/12/7612>.
- HUANG, TH; OKA, T; ASAI, T; OKADA, T; MERRILLS, BW; GERTSON, PN; WHITSON, RH und ITAKURA, K. Repression by a differentiation-specific factor of the human cytomegalovirus enhancer. *Nucl. Acids Res.*, 24(9):1695–1701 (1996). DOI:10.1093/nar/24.9.1695.
- HUME, Adam J; FINKEL, Jonathan S; KAMIL, Jeremy P; COEN, Donald M; CULBERTSON, Michael R und KALEJTA, Robert F. Phosphorylation of retinoblastoma protein by viral protein with cyclin-dependent kinase function. *Science*, 320(5877):797–799 (2008). DOI:10.1126/science.1152095.
- HWANG, Seungwoo; GOU, Zhenkun und KUZNETSOV, Igor B. DP-Bind: a web server for sequence-based prediction of DNA-binding residues in DNA-binding proteins. *Bioinformatics*, 23(5):634–636 (2007). DOI:10.1093/bioinformatics/btl672.
- ISHOV, A. M.; STENBERG, R. M. und MAUL, G. G. Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol*, 138(1):5–16 (1997).
- ISOMURA, Hiroki; STINSKI, Mark F; KUDOH, Ayumi; NAKAYAMA, Sanae; MURATA, Takayuki; SATO, Yoshitaka; IWAHORI, Satoko und TSURUMI, Tatsuya. A cis Element between the TATA Box and the Transcription Start Site of the Major Immediate-Early Promoter of Human Cytomegalovirus Determines Efficiency of Viral Replication. *J. Virol.*, 82(2):849–858 (2008). DOI:10.1128/JVI.01593-07.
- ISOMURA, Hiroki; TSURUMI, Tatsuya und STINSKI, Mark F. Role of the Proximal Enhancer of the Major Immediate-Early Promoter in Human Cytomegalovirus Replication. *J. Virol.*, 78(23):12788–12799 (2004). DOI:10.1128/JVI.78.23.12788-12799.2004.
- ISTAS, A. S.; DEMMLER, G. J.; DOBBINS, J. G. und STEWART, J. A. Surveillance for congenital cytomegalovirus disease: a report from the National Congenital Cytomegalovirus Disease Registry. *Clin Infect Dis*, 20(3):665–670 (1995).
- JARVIS, Michael A. und NELSON, Jay A. Molecular basis of persistence and latency. In: Arvin *et al.* (2007), Kap. 42, S. 765–779.

- JAULT, F. M.; JAULT, J. M.; RUCHTI, F.; FORTUNATO, E. A.; CLARK, C.; CORBEIL, J.; RICHMAN, D. D. und SPECTOR, D. H. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol*, 69(11):6697–6704 (1995).
- JENKINS, D. E.; MARTENS, C. L. und MOCARSKI, E. S. Human cytomegalovirus late protein encoded by ie2: a trans-activator as well as a repressor of gene expression. *J Gen Virol*, 75 (Pt 9):2337–2348 (1994).
- JUPP, R.; HOFFMANN, S.; DEPTO, A.; STENBERG, R. M.; GHAZAL, P. und NELSON, J. A. Direct interaction of the human cytomegalovirus IE86 protein with the cis repression signal does not preclude TBP from binding to the TATA box. *J Virol*, 67(9):5595–5604 (1993a).
- JUPP, R.; HOFFMANN, S.; STENBERG, R. M.; NELSON, J. A. und GHAZAL, P. Human cytomegalovirus IE86 protein interacts with promoter-bound TATA-binding protein via a specific region distinct from the autorepression domain. *J Virol*, 67(12):7539–7546 (1993b).
- KAHL, M.; SIEGEL-AXEL, D.; STENGLEIN, S.; JAHN, G. und SINZGER, C. Efficient lytic infection of human arterial endothelial cells by human cytomegalovirus strains. *J Virol*, 74(16):7628–7635 (2000).
- KALEJTA, Robert F; BECHTEL, Jill T und SHENK, Thomas. 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):1885–1895 (2003). DOI:10.1128/MCB.23.6.1885-1895.2003.
- KALEJTA, Robert F und SHENK, Thomas. The human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) accelerates progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Virol*, 77(6):3451–3459 (2003). DOI:10.1128/JVI.77.6.3451-3459.2003.
- KAWAI, T und AKIRA, S. TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13(5):816–825 (2006). DOI: 10.1038/sj.cdd.4401850.
- KERPPOLA, Tom K. Protein-DNA Interactions: Structure and Energetics. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, Bd. 15, S. 477–486. John Wiley & Sons, Chichester (2005).
- KERRY, JA; SEHGAL, A; BARLOW, SW; CAVANAUGH, VJ; FISH, K; NELSON, JA und STENBERG, RM. Isolation and characterization of a low-abundance splice variant from the human cytomegalovirus major immediate-early gene region. *J. Virol.*, 69(6):3868–3872 (1995). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/69/6/3868>.
- KIM, W. R.; BADLEY, A. D.; WIESNER, R. H.; PORAYKO, M. K.; SEABERG, E. C.; KEATING, M. R.; EVANS, R. W.; DICKSON, E. R.; KROM, R. A. und PAYA, C. V. The economic impact of cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Transplantation*, 69(3):357–361 (2000).

E. Literaturverzeichnis

- KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M.; GRIFFIN, Diane E.; MARTIN, Malcolm A.; LAMB, Robert A.; ROIZMAN, Bernard und STRAUS, Stephen E. (Hg.). *Fields' virology*, Bd. 2. Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, fünfte Aufl. (2007).
- KROSKY, Paula M.; BAEK, Moon-Chang und COEN, Donald M. The Human Cytomegalovirus UL97 Protein Kinase, an Antiviral Drug Target, Is Required at the Stage of Nuclear Egress. *J Virol*, 77(2):905–914 (2003). DOI:10.1128/JVI.77.2.905-914.2003.
- KUNKEL, T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(2):488–492 (1985).
- KYHSE-ANDERSEN, J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10(3–4):203–209 (1984). DOI:10.1016/0165-022X(84)90040-X.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685 (1970). DOI:10.1038/227680a0.
- LANG, D.; GEBERT, S.; ARLT, H. und STAMMINGER, T. Functional interaction between the human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein and the cellular transcription factor CREB. *J Virol*, 69(10):6030–6037 (1995).
- LANG, Dieter und STAMMINGER, Thomas. Minor groove contacts are essential for an interaction of the human cytomegalovirus IE2 protein with its DNA target. *Nucl. Acids Res.*, 22(16):3331–3338 (1994). DOI:10.1093/nar/22.16.3331.
- LASHMIT, Philip E.; STINSKI, Mark F.; MURPHY, Eain A. und BULLOCK, Grant C. A cis Repression Sequence Adjacent to the Transcription Start Site of the Human Cytomegalovirus US3 Gene Is Required To Down Regulate Gene Expression at Early and Late Times after Infection. *J. Virol.*, 72(12):9575–9584 (1998). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/72/12/9575>.
- LEE, Gary; WU, Jun; LUU, Percy; GHAZAL, Peter und FLORES, Osvaldo. Inhibition of the association of RNA polymerase II with the preinitiation complex by a viral transcriptional repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(6):2570–2575 (1996). DOI:10.1073/pnas.93.6.2570.
- LEE, Hye-Ra und AHN, Jin-Hyun. Sumoylation of the major immediate-early IE2 protein of human cytomegalovirus Towne strain is not required for virus growth in cultured human fibroblasts. *J Gen Virol*, 85(Pt 8):2149–2154 (2004). DOI:10.1099/vir.0.79954-0.
- LEMSTROM, Karl; SIHVOLA, Roope; BRUGGEMAN, Cathrien; HAYRY, Pekka und KOSKINEN, Petri. Cytomegalovirus Infection–Enhanced Cardiac Allograft Vasculopathy Is Abolished by DHPG Prophylaxis in the Rat. *Circulation*, 95(12):2614–2616 (1997). <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/95/12/2614>.
- LEVINE, Arnold J. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 88:323–331 (1997).



- LIN, Aifen; XU, Huihui und YAN, Weihua. Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion. *Cell Mol Immunol*, 4(2):91–98 (2007).
- LIU, B.; HERMISTON, T. W. und STINSKI, M. F. A cis-acting element in the major immediate-early (IE) promoter of human cytomegalovirus is required for negative regulation by IE2. *J Virol*, 65(2):897–903 (1991).
- LIU, B. und STINSKI, M. F. Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol*, 66(7):4434–4444 (1992).
- LIU, Ru; BAILLIE, Joan; SISSONS, J.G. Patrick und SINCLAIR, John H. The transcription factor YY1 binds to negative regulatory elements in the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter and mediates repression in nonpermissive cells. *Nucl. Acids Res.*, 22(13):2453–2459 (1994). DOI:10.1093/nar/22.13.2453.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. und RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1):265–275 (1951).
- LU, M. und SHENK, T. Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *J Virol*, 70(12):8850–8857 (1996).
- LU, M. und SHENK, T. Human cytomegalovirus UL69 protein induces cells to accumulate in G1 phase of the cell cycle. *J Virol*, 73(1):676–683 (1999).
- LUKAC, D. M.; HAREL, N. Y.; TANESE, N. und ALWINE, J. C. TAF-like functions of human cytomegalovirus immediate-early proteins. *J Virol*, 71(10):7227–7239 (1997).
- LUKAC, D. M.; MANUPPELO, J. R. und ALWINE, J. C. Transcriptional activation by the human cytomegalovirus immediate-early proteins: requirements for simple promoter structures and interactions with multiple components of the transcription complex. *J Virol*, 68(8):5184–5193 (1994).
- MACIAS, M. P.; HUANG, L.; LASHMIT, P. E. und STINSKI, M. F. Cellular or viral protein binding to a cytomegalovirus promoter transcription initiation site: effects on transcription. *J Virol*, 70(6):3628–3635 (1996).
- MACIAS, M. P. und STINSKI, M. F. An in vitro system for human cytomegalovirus immediate early 2 protein (IE2)-mediated site-dependent repression of transcription and direct binding of IE2 to the major immediate early promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(2):707–711 (1993).
- MALONE, C. L.; VESOLE, D. H. und STINSKI, M. F. Transactivation of a human cytomegalovirus early promoter by gene products from the immediate-early gene IE2 and augmentation by IE1: mutational analysis of the viral proteins. *J Virol*, 64(4):1498–1506 (1990).

- MARCHINI, A.; LIU, H. und ZHU, H. Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J Virol*, 75(4):1870–1878 (2001). DOI:10.1128/JVI.75.4.1870-1878.2001.
- MARSDEN, Russell L; MCGUFFIN, Liam J und JONES, David T. Rapid protein domain assignment from amino acid sequence using predicted secondary structure. *Protein Sci*, 11(12):2814–2824 (2002).
- MARWICK, C. First "antisense" drug will treat CMV retinitis. *JAMA*, 280(10):871 (1998).
- MCCORMICK, A. Louise und MOCARSKI, Jr., Edward S. Viral modulation of the host response to infection. In: Arvin *et al.* (2007), Kap. 21, S. 324–337.
- MCVOY, M A und ADLER, S P. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol*, 68(2):1040–1051 (1994). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/68/2/1040>.
- MEIER, J. L. und STINSKI, M. F. Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology*, 39(5-6):331–342 (1996).
- MEIER, Jeffery L. Reactivation of the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Regulatory Region and Viral Replication in Embryonal NTera2 Cells: Role of Trichostatin A, Retinoic Acid, and Deletion of the 21-Base-Pair Repeats and Modulator. *J. Virol.*, 75(4):1581–1593 (2001). DOI:10.1128/JVI.75.4.1581-1593.2001.
- MEIER, Jeffery L. und PRUESSNER, Jonathan A. The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Distal Enhancer Region Is Required for Efficient Viral Replication and Immediate-Early Gene Expression. *J. Virol.*, 74(4):1602–1613 (2000). DOI:10.1128/JVI.74.4.1602-1613.2000.
- MENDELSON, M.; MONARD, S.; SISSONS, P. und SINCLAIR, J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol*, 77 ( Pt 12):3099–3102 (1996).
- METTENLEITER, Thomas C. Herpesvirus Assembly and Egress. *J Virol*, 76(4):1537–1547 (2002). DOI:10.1128/JVI.76.4.1537-1547.2002.
- MILLER, J. E.; DOWER, W. J. und TOMPKINS, L. S. High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(3):856–860 (1988).
- MISAGHI, Shahram; SUN, Zhen-Yu J; STERN, Patrick; GAUDET, Rachelle; WAGNER, Gerhard und PLOEGH, Hidde. Structural and functional analysis of human cytomegalovirus US3 protein. *J Virol*, 78(1):413–423 (2004). DOI:10.1128/JVI.78.1.413-423.2004.
- MOCARSKI, E. S.; KEMBLE, G. W.; LYLE, J. M. und GREAVES, R. F. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(21):11321–11326 (1996).

- MOCARSKI, Edward S., Jr.; SHENK, Thomas und PASS, Robert F. Cytomegaloviruses. In: Knipe *et al.* (2007), Kap. 69, S. 2701 – 2772.
- MONTAG, Christina; WAGNER, Jutta; GRUSKA, Iris und HAGEMEIERS, Christian. Human cytomegalovirus blocks tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-mediated NF-kappaB signaling. *J Virol*, 80(23):11686–11698 (2006). DOI:10.1128/JVI.01168-06.
- MUGANDA, P; CARRASCO, R. und QIAN, Q. The human cytomegalovirus IE2 86 kDa protein elevates p53 levels and transactivates the p53 promoter in human fibroblasts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 44(2):321–331 (1998).
- MURANYI, Walter; HAAS, Jürgen; WAGNER, Markus; KROHNE, Georg und KOSZINOWSKI, Ulrich H. Cytomegalovirus Recruitment of Cellular Kinases to Dissolve the Nuclear Lamina. *Science*, 297(5582):854–857 (2002). DOI:10.1126/science.1071506.
- MURPHY, E. A.; STREBLOW, D. N.; NELSON, J. A. und STINSKI, M. F. The human cytomegalovirus IE86 protein can block cell cycle progression after inducing transition into the S phase of permissive cells. *J Virol*, 74(15):7108–7118 (2000).
- MURPHY, Eain; YU, Dong; GRIMWOOD, Jane; SCHMUTZ, Jeremy; DICKSON, Mark; JARVIS, Michael A.; HAHN, Gabriele; NELSON, Jay A.; MYERS, Richard M. und SHENK, Thomas E. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25):14976–14981 (2003). DOI: 10.1073/pnas.2136652100.
- MURPHY, Jane C; FISCHLE, Wolfgang; VERDIN, Eric und SINCLAIR, John H. Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J*, 21(5):1112–1120 (2002). DOI:10.1093/emboj/21.5.1112.
- NELSON, J A und GROUDINE, M. Transcriptional regulation of the human cytomegalovirus major immediate-early gene is associated with induction of DNase I-hypersensitive sites. *Mol. Cell. Biol.*, 6(2):452–461 (1986). <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/6/2/452>.
- NELSON, J A; REYNOLDS-KOHLER, C und SMITH, B A. Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol. Cell. Biol.*, 7(11):4125–4129 (1987). <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/7/11/4125>.
- NEVELS, Michael; PAULUS, Christina und SHENK, Thomas. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(49):17234–17239 (2004). DOI:10.1073/pnas.0407933101.
- NORIS, Emanuela; ZANNETTI, Claudia; DEMURTAS, Anna; SINCLAIR, John; ANDREA, Marco De; GARIGLIO, Marisa und LANDOLFO, Santo. Cell cycle arrest by human cytomegalovirus 86-kDa IE2 protein resembles premature senescence. *J Virol*, 76(23):12135–12148 (2002). DOI:10.1128/JVI.76.23.12135-12148.2002.

- PAL, Gabor; FONG, Shun-Yin; KOSSIAKOFF, Anthony A. und SIDHU, Sachdev S. Alternative views of functional protein binding epitopes obtained by combinatorial shotgun scanning mutagenesis. *Protein Sci*, 14(9):2405–2413 (2005). DOI:10.1110/ps.051519805.
- PARI, G S und ANDERS, D G. Eleven loci encoding trans-acting factors are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA replication. *J Virol*, 67(12):6979–6988 (1993). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/67/12/6979>.
- PAULUS, Christina; KRAUSS, Steffen und NEVELS, Michael. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(10):3840–3845 (2006). DOI:10.1073/pnas.0600007103.
- PELLETT, Philip E. und ROIZMAN, Bernard. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: Knipe *et al.* (2007), Kap. 66, S. 2479–2499.
- PERRY, C. M. und BALFOUR, J. A. Fomivirsin. *Drugs*, 57(3):375–80; discussion 381 (1999). <http://www.ingentaconnect.com/content/adis/dgs/1999/00000057/00000003/art00010>.
- PETRIK, Dustin T.; SCHMITT, Kimberly P. und STINSKI, Mark F. A single point mutation in the human cytomegalovirus IE86 prevents manipulation of the cell cycle by the virus. In: *30th International Herpesvirus Workshop* (2005).
- PETRIK, Dustin T; SCHMITT, Kimberly P und STINSKI, Mark F. Inhibition of cellular DNA synthesis by the human cytomegalovirus IE86 protein is necessary for efficient virus replication. *J Virol*, 80(8):3872–3883 (2006). DOI:10.1128/JVI.80.8.3872-3883.2006.
- PETRIK, Dustin T; SCHMITT, Kimberly P und STINSKI, Mark F. The autoregulatory and transactivating functions of the human cytomegalovirus IE86 protein use independent mechanisms for promoter binding. *J Virol*, 81(11):5807–5818 (2007). DOI:10.1128/JVI.02437-06.
- PFEFFER, Sébastien; SEWER, Alain; LAGOS-QUINTANA, Mariana; SHERIDAN, Robert; SANDER, Chris; GRÄSSER, Friedrich A; VAN DYK, Linda F; HO, C. Kiong; SHUMAN, Stewart; CHIEN, Minchen; RUSSO, James J; JU, Jingyue; RANDALL, Glenn; LINDENBACH, Brett D; RICE, Charles M; SIMON, Viviana; HO, David D; ZAVOLAN, Mihaela und TUSCHL, Thomas. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*, 2(4):269–276 (2005). DOI:10.1038/nmeth746.
- PIZZORNO, M. C. und HAYWARD, G. S. 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):6154–6165 (1990).
- PIZZORNO, M. C.; MULLEN, M. A.; CHANG, Y. N. und HAYWARD, G. S. The functionally active IE2 immediate-early regulatory protein of human cytomegalovirus is an 80-kilodalton

- polypeptide that contains two distinct activator domains and a duplicated nuclear localization signal. *J Virol*, 65(7):3839–3852 (1991).
- PIZZORNO, M. C.; O'HARE, P.; SHA, L.; LAFEMINA, R. L. und HAYWARD, G. S. trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus. *J Virol*, 62(4):1167–1179 (1988).
- PREIKSAITIS, Jutta K; BRENNAN, Daniel C; FISHMAN, Jay und ALLEN, Upton. Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant*, 5(2):218–227 (2005). DOI:10.1111/j.1600-6143.2004.00692.x.
- PRICHARD, Mark N.; SZTUL, Elizabeth; DAILY, Shannon L.; PERRY, Amie L.; FREDERICK, Samuel L.; GILL, Rachel B.; HARTLINE, Caroll B.; STREBLOW, Daniel N.; VARNUM, Susan M.; SMITH, Richard D. und KERN, Earl R. Human Cytomegalovirus UL97 Kinase Activity Is Required for the Hyperphosphorylation of Retinoblastoma Protein and Inhibits the Formation of Nuclear Aggregosomes. *J. Virol.*, 82(10):5054–5067 (2008). DOI:10.1128/JVI.02174-07.
- PUCHTLER, E und STAMMINGER, T. An inducible promoter mediates abundant expression from the immediate-early 2 gene region of human cytomegalovirus at late times after infection. *J. Virol.*, 65(11):6301–6306 (1991). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/65/11/6301>.
- QIAN, Zhikang; LEUNG-PINEDA, Van; XUAN, Baoqin; PIWNICA-WORMS, Helen und YU, Dong. Human cytomegalovirus protein pUL117 targets the mini-chromosome maintenance complex and suppresses cellular DNA synthesis. *PLoS Pathog*, 6(3):e1000814 (2010). DOI:10.1371/journal.ppat.1000814.
- RADLOFF, R.; BAUER, W. und VINOGRAD, J. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 57(5):1514–1521 (1967).
- REBOREDO, Mercedes; GREAVES, Richard F und HAHN, Gabriele. Human cytomegalovirus proteins encoded by UL37 exon 1 protect infected fibroblasts against virus-induced apoptosis and are required for efficient virus replication. *J Gen Virol*, 85(Pt 12):3555–3567 (2004). DOI:10.1099/vir.0.80379-0.
- REEVES, M. B.; MACARY, P. A.; LEHNER, P. J.; SISSONS, J. G. P. und SINCLAIR, J. H. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11):4140–4145 (2005). DOI:10.1073/pnas.0408994102.
- REEVES, Matthew; MURPHY, Jane; GREAVES, Richard; FAIRLEY, Jennifer; BREHM, Alex und SINCLAIR, John. Autorepression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer at late times of infection is mediated by the recruitment of chromatin remodeling enzymes by IE86. *J Virol*, 80(20):9998–10009 (2006). DOI: 10.1128/JVI.01297-06.

- RENART, J.; REISER, J. und STARK, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(7):3116–3120 (1979).
- RODEMS, Steven M.; CLARK, Charles L. und SPECTOR, Deborah H. Separate DNA Elements Containing ATF/CREB and IE86 Binding Sites Differentially Regulate the Human Cytomegalovirus UL112-113 Promoter at Early and Late Times in the Infection. *J. Virol.*, 72(4):2697–2707 (1998). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/72/4/2697>.
- ROMANOWSKI, M. J.; GARRIDO-GUERRERO, E. und SHENK, T. pIRS1 and pTRS1 are present in human cytomegalovirus virions. *J Virol*, 71(7):5703–5705 (1997).
- SALVANT, Bryan S.; FORTUNATO, Elizabeth A. und SPECTOR, Deborah H. 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):3729–3741 (1998). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/72/5/3729>.
- SAMBROOK, Joseph; FRITSCH, Edward F. und MANIATIS, Thomas. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).
- SAMBUCETTI, L. C.; CHERRINGTON, J. M.; WILKINSON, G. W. und MOCARSKI, E. S. NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J*, 8(13):4251–4258 (1989).
- SAMPAIO, Kerstin Laib; CAVIGNAC, Yolaine; STIERHOF, York-Dieter und SINZGER, Christian. Human Cytomegalovirus Labeled with Green Fluorescent Protein for Live Analysis of Intracellular Particle Movements. *J Virol*, 79(5):2754–2767 (2005). DOI:10.1128/JVI.79.5.2754-2767.2005.
- SANCHEZ, Veronica; GREIS, Kenneth D.; SZTUL, Elizabeth und BRITT, William J. Accumulation of Virion Tegument and Envelope Proteins in a Stable Cytoplasmic Compartment during Human Cytomegalovirus Replication: Characterization of a Potential Site of Virus Assembly. *J Virol*, 74(2):975–986 (2000). DOI:10.1128/JVI.74.2.975-986.2000.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. und COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–5467 (1977).
- SARISKY, R. T. und HAYWARD, G. S. Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLyt-dependent DNA replication and formation of replication compartments in cotransfection assays. *J Virol*, 70(11):7398–7413 (1996).
- SCHIERLING, Karina; STAMMINGER, Thomas; MERTENS, Thomas und WINKLER, Michael. Human cytomegalovirus tegument proteins ppUL82 (pp71) and ppUL35 interact and cooperatively activate the major immediate-early enhancer. *J Virol*, 78(17):9512–9523 (2004). DOI:10.1128/JVI.78.17.9512-9523.2004.

- SCHLEISS, Mark R. Role of breast milk in acquisition of cytomegalovirus infection: recent advances. *Curr Opin Pediatr*, 18(1):48–52 (2006). DOI:10.1097/01.mop.0000192520.48411.fa.
- SCHWARTZ, R.; HELMICH, B. und SPECTOR, D. H. CREB and CREB-binding proteins play an important role in the IE2 86-kilodalton protein-mediated transactivation of the human cytomegalovirus 2.2-kilobase RNA promoter. *J Virol*, 70(10):6955–6966 (1996).
- SCHWARTZ, R; SOMMER, M H; SCULLY, A und SPECTOR, D H. Site-specific binding of the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein to an early gene promoter. *J. Virol.*, 68(9):5613–5622 (1994). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/68/9/5613>.
- SHELBOURN, S.L.; KOTHARI, S.K.; SISSONS, J.G.P. und SINCLAIR, J.H. Repression of human cytomegalovirus gene expression associated with a novel immediate early regulatory region binding factor. *Nucl. Acids Res.*, 17(22):9165–9171 (1989). DOI:10.1093/nar/17.22.9165.
- SHEN, Yuqiao; ZHU, Hua und SHENK, Thomas. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7):3341–3345 (1997). DOI:10.1073/pnas.94.7.3341.
- SINCLAIR, J. H.; BAILLIE, J.; BRYANT, L. A.; TAYLOR-WIEDEMAN, J. A. und SISSONS, J. G. P. Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression in a monocytic cell line. *J Gen Virol*, 73(2):433–435 (1992). <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/73/2/433>.
- SINCLAIR, John und SISSONS, Patrick. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 87(Pt 7):1763–1779 (2006). DOI:10.1099/vir.0.81891-0.
- SKALETSKAYA, A.; BARTLE, L. M.; CHITTENDEN, T.; MCCORMICK, A. L.; MOCARSKI, E. S. und GOLDMACHER, V. S. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(14):7829–7834 (2001). DOI:10.1073/pnas.141108798.
- SKOLNIK, Jeffrey M und FISHER, David E. Tumour Suppressor Genes. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Chichester (2003). DOI:10.1038/npq.els.0001475.
- SMITH, Janet Duyckinck und DE HARVEN, Etienne. Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus Replication in WI-38 Cells I. Sequence of Viral Replication. *J Virol*, 12(4):919–930 (1973). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/12/4/919>.
- SMITH, Lloyd M.; FUNG, Steven; HUNKAPILLER, Michael W.; HUNKAPILLER, Tim J. und HOOD, Leroy E. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucl. Acids Res.*, 13(7):2399–2412 (1985). DOI:10.1093/nar/13.7.2399.

- SODERBERG-NAUCLER, Cecilia; FISH, Kenneth N. und NELSON, Jay A. Reactivation of Latent Human Cytomegalovirus by Allogeneic Stimulation of Blood Cells from Healthy Donors. *Cell*, 91(1):119–126 (1997). <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-438GMBP-G/2/afb2f9a0be583597243a27f81ecf58b8>.
- SOMMER, M. H.; SCULLY, A. L. und SPECTOR, D. H. Transactivation by the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein requires a domain that binds to both the TATA box-binding protein and the retinoblastoma protein. *J Virol*, 68(10):6223–6231 (1994).
- SONG, Yoon-Jae und STINSKI, Mark F. Effect of the human cytomegalovirus IE86 protein on expression of E2F-responsive genes: a DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5):2836–2841 (2002). DOI:10.1073/pnas.052010099.
- SONG, Yoon-Jae und STINSKI, Mark F. Inhibition of cell division by the human cytomegalovirus IE86 protein: role of the p53 pathway or cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1. *J Virol*, 79(4):2597–2603 (2005). DOI:10.1128/JVI.79.4.2597-2603.2005.
- SPEIR, E.; MODALI, R.; HUANG, E. S.; LEON, M. B.; SHAWL, F.; FINKEL, T. und EPSTEIN, S. E. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*, 265(5170):391–394 (1994).
- STAMMINGER, T.; PUCHTLER, E. und FLECKENSTEIN, B. Discordant expression of the immediate-early 1 and 2 gene regions of human cytomegalovirus at early times after infection involves posttranscriptional processing events. *J Virol*, 65(5):2273–2282 (1991).
- STAPRANS, S I; RABERT, D K und SPECTOR, D H. Identification of sequence requirements and trans-acting functions necessary for regulated expression of a human cytomegalovirus early gene. *J. Virol.*, 62(9):3463–3473 (1988). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/62/9/3463>.
- STASIAK, P. C. und MOCARSKI, E. S. Transactivation of the cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the alpha gene product TRS1 in addition to IE1 and IE2. *J Virol*, 66(2):1050–1058 (1992).
- STENBERG, R. M. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology*, 39(5–6):343–349 (1996).
- STENBERG, R. M.; FORTNEY, J.; BARLOW, S. W.; MAGRANE, B. P.; NELSON, J. A. und GHAZAL, P. Promoter-specific trans activation and repression by human cytomegalovirus immediate-early proteins involves common and unique protein domains. *J Virol*, 64(4):1556–1565 (1990).
- STENBERG, R M; THOMSEN, D R und STINSKI, M F. Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *J. Virol.*, 49(1):190–199 (1984). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/49/1/190>.



- STINSKI, Mark F und MEIER, Jeffrey L. Immediate-early viral gene regulation and function. In: Arvin *et al.* (2007), Kap. 17, S. 241–263.
- TANAKA, Koichi; ZOU, Jian-Ping; TAKEDA, Kazuyo; FERRANS, Victor J.; SANDFORD, Gordon R.; JOHNSON, Thomas M.; FINKEL, Toren und EPSTEIN, Stephen E. Effects of Human Cytomegalovirus Immediate-Early Proteins on p53-mediated Apoptosis in Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation*, 99(13):1656–1659 (1999). <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/99/13/1656>.
- TANG, Qiyi und MAUL, Gerd G. Mouse cytomegalovirus immediate-early protein 1 binds with host cell repressors to relieve suppressive effects on viral transcription and replication during lytic infection. *J Virol*, 77(2):1357–1367 (2003).
- TAYLOR, R. Travis und BRESNAHAN, Wade A. Human cytomegalovirus IE86 attenuates virus- and tumor necrosis factor alpha-induced NFkappaB-dependent gene expression. *J Virol*, 80(21):10763–10771 (2006a). DOI:10.1128/JVI.01195-06.
- TAYLOR, R. Travis und BRESNAHAN, Wade A. Human cytomegalovirus immediate-early 2 protein IE86 blocks virus-induced chemokine expression. *J Virol*, 80(2):920–928 (2006b). DOI:10.1128/JVI.80.2.920-928.2006.
- TAYLOR-WIEDEMAN, J.; SISSONS, J. G.; BORYSIEWICZ, L. K. und SINCLAIR, J. H. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol*, 72 ( Pt 9):2059–2064 (1991).
- TAYLOR-WIEDEMAN, J.; SISSONS, P. und SINCLAIR, J. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J Virol*, 68(3):1597–1604 (1994).
- TERHUNE, Scott S; SCHRÖER, Jörg und SHENK, Thomas. RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J Virol*, 78(19):10390–10398 (2004). DOI:10.1128/JVI.78.19.10390-10398.2004.
- TESSEMA, Mathewos; LEHMANN, Ulrich und KREIPE, Hans. Cell cycle and no end. *Virchows Archiv*, 444(4):313–323 (2004). DOI:10.1007/s00428-003-0971-3.
- TEVETHIA, M. J.; SPECTOR, D. J.; LEISURE, K. M. und STINSKI, M. F. Participation of two human cytomegalovirus immediate early gene regions in transcriptional activation of adenovirus promoters. *Virology*, 161(2):276–285 (1987). <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WXR-4BNJ9V3-4B/2/eba161227402bb4c5cd2cc2b4cb2080c>.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T. und GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350–4354 (1979).

- TSAI, H. L.; KOU, G. H.; CHEN, S. C.; WU, C. W. und LIN, Y. S. Human cytomegalovirus immediate-early protein IE2 tethers a transcriptional repression domain to p53. *J Biol Chem*, 271(7):3534–3540 (1996).
- VALANTINE, Hannah A.; GAO, Shao-Zhou; MENON, Santosh G.; RENLUND, Dale G.; HUNT, Sharon A.; OYER, Philip; STINSON, Edward B.; BROWN, Jr, Byron W.; MERIGAN, Thomas C. und SCHROEDER, John S. Impact of Prophylactic Immediate Posttransplant Ganciclovir on Development of Transplant Atherosclerosis : A Post Hoc Analysis of a Randomized, Placebo-Controlled Study. *Circulation*, 100(1):61–66 (1999). <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/100/1/61>.
- WADE, M; KOWALIK, T F; MUDRYJ, M; HUANG, E S und AZIZKHAN, J C. E2F mediates dihydrofolate reductase promoter activation and multiprotein complex formation in human cytomegalovirus infection. *Mol. Cell. Biol.*, 12(10):4364–4374 (1992). <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/12/10/4364>.
- WAHEED, I.; CHIOU, C. J.; AHN, J. H. und HAYWARD, G. S. Binding of the human cytomegalovirus 80-kDa immediate-early protein (IE2) to minor groove A/T-rich sequences bounded by CG dinucleotides is regulated by protein oligomerization and phosphorylation. *Virology*, 252(1):235–257 (1998). DOI:10.1006/viro.1998.9448.
- WELLS, James A. Systematic Mutational Analyses of Protein-Protein Interfaces. In: LANGONE, John J. (Hg.), *Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications Part A Proteins, Peptides, and Enzymes, Methods in Enzymology*, Bd. 202, Kap. 18, S. 390–411. Academic Press, San Diego (1992).
- WHITE, Elizabeth A; CLARK, Charles L; SANCHEZ, Veronica und SPECTOR, Deborah H. Small internal deletions in the human cytomegalovirus IE2 gene result in nonviable recombinant viruses with differential defects in viral gene expression. *J Virol*, 78(4):1817–1830 (2004). DOI:10.1128/JVI.78.4.1817-1830.2004.
- WHITE, Elizabeth A; ROSARIO, Christia J Del; SANDERS, Rebecca L und SPECTOR, Deborah H. The IE2 60-kilodalton and 40-kilodalton proteins are dispensable for human cytomegalovirus replication but are required for efficient delayed early and late gene expression and production of infectious virus. *J Virol*, 81(6):2573–2583 (2007). DOI:10.1128/JVI.02454-06.
- WHITE, Elizabeth A und SPECTOR, Deborah H. Early viral gene expression and function. In: Arvin *et al.* (2007), Kap. 18, S. 264–294.
- WICKNER, Sue; MAURIZI, Michael R. und GOTTESMAN, Susan. Posttranslational Quality Control: Folding, Refolding, and Degrading Proteins. *Science*, 286(5446):1888–1893 (1999). DOI:10.1126/science.286.5446.1888.
- WIEBUSCH, Lüder. *Entdeckung und Charakterisierung eines ungewöhnlichen Zellzyklusarrests hervorgerufen durch das IE2-Protein des humanen Zytomegalievirus (HCMV)*. Dissertation Dr. rer. nat., Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin (2001).

- WIEBUSCH, Lüder und HAGEMEIERS, Christian. Human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein blocks cell cycle progression in G(1). *J Virol*, 73(11):9274–9283 (1999).
- WIEBUSCH, Lüder und HAGEMEIERS, Christian. The human cytomegalovirus immediate early 2 protein dissociates cellular DNA synthesis from cyclin-dependent kinase activation. *EMBO J*, 20(5):1086–1098 (2001). DOI:10.1093/emboj/20.5.1086.
- WIEBUSCH, Lüder; TRUSS, Matthias und HAGEMEIERS, Christian. Inhibition of human cytomegalovirus replication by small interfering RNAs. *J Gen Virol*, 85(Pt 1):179–184 (2004). DOI:10.1099/vir.0.19453-0.
- WIEBUSCH, Lüder; UECKER, Ralf und HAGEMEIERS, Christian. Human cytomegalovirus prevents replication licensing by inhibiting MCM loading onto chromatin. *EMBO Rep*, 4(1):42–46 (2003). DOI:10.1038/sj.embor.embor707.
- WINKLER, M.; RICE, S. A. und STAMMINGER, T. UL69 of human cytomegalovirus, an open reading frame with homology to ICP27 of herpes simplex virus, encodes a transactivator of gene expression. *J Virol*, 68(6):3943–3954 (1994).
- WU, J; JUPP, R; STENBERG, R M; NELSON, J A und GHAZAL, P. Site-specific inhibition of RNA polymerase II preinitiation complex assembly by human cytomegalovirus IE86 protein. *J. Virol.*, 67(12):7547–7555 (1993). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/67/12/7547>.
- XU, Yiyang; CEI, Sylvia A; HUETE, Alicia Rodriguez; COLLETTI, Kelly S und PARI, Gregory S. Human cytomegalovirus DNA replication requires transcriptional activation via an IE2- and UL84-responsive bidirectional promoter element within oriLyt. *J Virol*, 78(21):11664–11677 (2004). DOI:10.1128/JVI.78.21.11664-11677.2004.
- YEUNG, K. C.; STOLTZFUS, C. M. und STINSKI, M. F. Mutations of the human cytomegalovirus immediate-early 2 protein defines regions and amino acid motifs important in transactivation of transcription from the HIV-1 LTR promoter. *Virology*, 195(2):786–792 (1993). DOI:10.1006/viro.1993.1431.
- YOO, Y. D.; CHIOU, C. J.; CHOI, K. S.; YI, Y.; MICHELSON, S.; KIM, S.; HAYWARD, G. S. und KIM, S. J. The IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus induces expression of the human transforming growth factor beta1 gene through an Egr-1 binding site. *J Virol*, 70(10):7062–7070 (1996). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/70/10/7062>.
- YU, Yongjun und ALWINE, James C. Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins and Simian Virus 40 Large T Antigen Can Inhibit Apoptosis through Activation of the Phosphatidylinositide 3'-OH Kinase Pathway and the Cellular Kinase Akt. *J. Virol.*, 76(8):3731–3738 (2002). DOI:10.1128/JVI.76.8.3731-3738.2002.
- YUO, C. Y.; WU, G. J.; HUANG, E. S.; WU, F. Y. und WU, C. W. Stable expression of functional human cytomegalovirus immediate-early proteins IE1 and IE2 in HeLa cells. *Intervirology*, 34(2):94–104 (1992).

E. Literaturverzeichnis

- YUROCHKO, AD; KOWALIK, TF; HUONG, SM und HUANG, ES. Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *J Virol*, 69(9):5391–5400 (1995). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/69/9/5391>.
- YUROCHKO, AD; MAYO, MW; POMA, EE; BALDWIN, Jr, AS und HUANG, ES. Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. *J Virol*, 71(6):4638–4648 (1997). <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/71/6/4638>.
- ZHANG, Zhigang; EVERS, David L; MCCARVILLE, Joseph F; DANTONEL, Jean-Christophe; HUONG, Shu-Mei und HUANG, Eng-Shang. Evidence that the human cytomegalovirus IE2-86 protein binds mdm2 and facilitates mdm2 degradation. *J Virol*, 80(8):3833–3843 (2006). DOI:10.1128/JVI.80.8.3833-3843.2006.
- ZHU, H.; SHEN, Y. und SHENK, T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol*, 69(12):7960–7970 (1995).
- ZWEIDLER-MCKAY, PA; GRIMES, HL; FLUBACHER, MM und TSICHLIS, PN. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.*, 16(8):4024–4034 (1996). <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/16/8/4024>.

## Erklärung

„Ich, David Koch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Alanine-Scanning der Coredomäne des Immediate-Early-2-Proteins des humanen Zytomegalievirus* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

06.08.2012

Unterschrift



## Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christian Hagemeyer für die freundliche Aufnahme in sein Labor, die Überlassung des Themas und die stete Unterstützung auf dem Weg zur Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Dr. Lüder Wiebusch danke ich für die gute Betreuung und tatkräftige Unterstützung.

Frau Dr. Miriam Bach und Herrn Robert Krauß gebührt Dank für die viele Hilfe, insbesondere bei der Einarbeitung in molekularbiologische Techniken und das allgemeine Laborleben.

Herrn Ralf Uecker danke ich für seine tatkräftige Unterstützung und die immer freundliche und humorvolle Zusammenarbeit.

Frau Inmaculada Barrasa (Ph.D.) danke ich für die freundliche Überlassung des IE2-Strukturmodells.

Frau Elke Michalsky und Frau Ines Jäger aus der *Structural Bioinformatics Group* der Charité danke ich für ihre Beratung in der Auswahl und Interpretation der *in silico*-Strukturvorhersagen.





# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.