

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Interaktion des humanen Cytomegalievirus IE1-Proteins mit zellulären Histonen

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE DES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
DES FACHBEREICHS BIOLOGIE,
DER FAKULTÄT FÜR MATHEMATIK, INFORMATIK UND NATURWISSENSCHAFTEN,
DER UNIVERSITÄT HAMBURG

vorgelegt von
Katrin Mücke aus Regensburg

Hamburg 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. T. DOBNER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv. Doz. Dr. M. NEVELS
Tag der Disputation: 10. Oktober 2014



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Für meine große und kleine Familie.

4.3	Quantitative real-time PCR	38
4.4	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	38
5	Protein-Methoden.....	42
5.1	Allgemeines.....	42
5.2	Luciferase Reporter Assay.....	42
5.3	Gewinnung von Gesamtzellextrakten.....	43
5.4	Chromatinimmunpräzipitation	43
5.5	Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	45
5.6	Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine aus H1299-Zellen	46
5.7	Säureextraktion von Histonen für <i>in vitro</i> -Bindungsstudien.....	46
5.8	<i>In vitro</i> -Bindungsstudien	47
5.9	Coimmunpräzipitation	48
5.10	Proteinauftrennung und -detektion	49
5.11	Immunfluoreszenzfärbung	49
5.12	Molecular Modeling	50
D	Ergebnisse.....	51
1	Charakterisierung der IE1-Histon-Interaktion	51
1.1	Das IE1-Protein besitzt zwei Histon-bindende Bereiche mit unterschiedlichen Spezifitäten für H2A/H2B und H3/H4.....	51
1.2	Drei saure Domänen innerhalb des IE1-Carboxy-Terminus bilden neben der CTD das zweite Histon-Bindemotiv	53
1.3	Die Interaktion von IE1 mit zellulären Nukleosomen erfolgt auch in Interphase-Zellen.....	55
1.4	Die IE1-CTD enthält ein zehn Aminosäuren umfassendes Nukleosom-bindendes Motiv.....	57
1.5	Die Interaktion zwischen der IE1-CTD und zellulären Nukleosomen ist abhängig von sauren Resten innerhalb des H2A-Moleküls.....	62
1.6	Die IE1- und LANA-CTD konkurrieren um die Bindung an zelluläres Chromatin.....	65
1.7	<i>In silico</i> -Modell des IE1-CTD/Nukleosom-Komplexes.....	66
2	Funktionelle Untersuchungen zur IE1-Histon-Interaktion	69
2.1	Charakteristika der verwendeten hCMV-Stämme.....	69
2.2	Histon-bindende Bereiche im IE1-Protein haben keinen Einfluss auf die Nukleosomen-Dichte am viralen Genom.....	70
2.3	Histon-bindende Bereiche im IE1-Protein haben einen Einfluss auf die transaktivierenden Eigenschaften von IE1	73
2.4	Bedeutung der IE1-CTD für die produktive und nicht produktive Infektion mit klinischen hCMV-Isolaten	75
2.4.1	Herstellung CTD-defizienter und revertierter TB40/E-Viren	75

2.4.2 Vergleichende Analyse der IE1- und IE2-Expressionskinetiken sowie der IE1-Lokalisation in produktiv infizierten Zellen	77
2.4.3 Bedeutung des IE1-Proteins und dessen CTD für die Replikation des klinischen TB40/E-Stammes in produktiv infizierten Zellen	79
2.4.4 Die CTD stellt einen selektiv hoch konservierten Bereich innerhalb des IE1-Proteins dar	81
2.4.5 IE1-abhängige intrazelluläre Lokalisation von hCMV-Genomen	83
2.4.6 Physikalische Interaktion zwischen IE1 und dem viralen Genom	85
2.4.7 Bedeutung der IE1-CTD für die nicht produktive hCMV-Infektion in myeloiden Zellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen	88
E Diskussion	94
1 Strukturelle Grundlagen der IE1-Histon-Interaktion.....	94
1.1 Die CTD des IE1-Proteins bindet in die saure Tasche des Nukleosoms	94
1.2 Saure Abschnitte im IE1-Protein binden vermutlich DNA-freie Histone.....	98
2 Funktionelle Konsequenzen der IE1-Histon-Interaktion	100
2.1 Möglicher Einfluss der IE1-Histon-Interaktion auf die virale Chromatin-Struktur.....	100
2.2 Einfluss der IE1-Histon-Interaktion auf die virale Transkription	102
2.3 Bedeutung der IE1-Nukleosom-Interaktion für die hCMV-Infektion	104
3 Die IE1-CTD als potentieller Pathogenese-Faktor	108
F Anhang	110
1 Literaturverzeichnis	110
2 Abkürzungsverzeichnis.....	122
3 Veröffentlichungen	124
4 Danksagung	126

A Zusammenfassung

Das humane Cytomegalievirus (hCMV) ist ein weltweit verbreitetes, medizinisch hoch relevantes Herpesvirus, das nach Primärinfektion lebenslang im menschlichen Wirtsorganismus persistiert. Das Virus ist dafür bekannt zum Teil schwerwiegende Entwicklungsdefekte bei ungeborenen und neugeborenen Kindern zu verursachen. Zudem stellt es besonders für immunsupprimierte Patienten ein großes Risiko dar, da die Primärinfektion oder Virus-Reaktivierung aus dem latenten Infektionszustand bei eingeschränkter Immunkontrolle zu lebensbedrohlichen Krankheiten führen kann. Jedoch sind die molekularen Grundlagen, welche die lebenslange hCMV-Infektion ermöglichen bisher weitgehend ungeklärt. Im Gegensatz zu den α - und γ -Herpesviren ist für hCMV (β -Herpesvirus) beispielsweise nicht bekannt, wie die Persistenz viraler Genome im Wirtsorganismus gewährleistet wird. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass das hCMV-kodierte, 72 kDa schwere immediate-early 1-Protein (IE1) an der Erhaltung viraler Genome in infizierten humanen Zellen beteiligt ist. Bis dato wurde die Funktion dieses nukleär lokalisierten Proteins vor allem in der lytischen Phase der hCMV-Infektion untersucht, bei der IE1 als promiskuitiver Regulator der viralen und zellulären Transkription sowie als Antagonist angeborener Abwehrmechanismen der Wirtszelle gilt. Seit langem ist zudem bekannt, dass das virale Protein während der Mitose mit zellulärem Chromatin assoziiert ist, wobei der Mechanismus dieser Interaktion bisher nicht untersucht wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass IE1 mit zellulären Chromosomen assoziiert indem es, unabhängig von Nukleinsäuren, direkt an core-Histone (H2A, H2B, H3 und H4) bindet. Dabei besitzt das virale Protein zwei unabhängige Histon-bindende Bereiche, mit unterschiedlichen Spezifitäten für H2A/H2B und H3/H4. Der präferentiell H3/H4-bindende Bereich setzt sich aus drei sauren Domänen im carboxy-terminalen Abschnitt des IE1-Proteins zusammen, die zudem für die Transaktivierung viraler Gene von Bedeutung sind. Die spezifische Interaktion mit H2A/H2B-Dimeren erfolgt hingegen über ein konserviertes, zehn Aminosäuren umfassendes Motiv innerhalb der chromatin-tethering domain (CTD), die den äußersten Carboxy-Terminus des viralen Proteins bildet. Ergebnisse aus biochemischen Bindungsstudien und Computer-gestützten Strukturberechnungen ergaben, dass die IE1-CTD eine β -Haarnadelstruktur annimmt, die in eine saure Tasche bindet, welche durch das H2A/H2B-Dimer ausgebildet wird und auf der Nukleosomen-Oberfläche exponiert ist. Daneben stellte sich heraus, dass die Bindung der CTD an H2A/H2B-Dimere für die IE1-Nukleosom-

Interaktion und IE1-Chromatin-Assoziation notwendig und ausreichend ist. IE1 bindet in einer Weise in die nukleosomale saure Tasche, die sehr stark der Interaktion zwischen dem Latenz-assoziierten nukleären Antigen (LANA) des Kaposi-Sarkom assoziierten Herpesvirus (KSHV) mit der sauren Tasche ähnelt, sodass die CTDs dieser beiden viralen Proteine folglich um die Bindung an Nukleosomen und zelluläres Chromatin konkurrieren. Neben den Analogien in der Nukleosom-Interaktion zwischen LANA und IE1, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass diese beiden Proteine ähnliche Funktionen während der persistierenden Infektion der entsprechenden Viren übernehmen. So konnte erstmals gezeigt werden, dass virale Genome in hCMV-infizierten humanen Zellen mit den Chromosomen der Wirtszelle assoziieren, wobei IE1 und dessen CTD zu dieser Assoziation beitragen. Da IE1 nicht nur mit dem zellulären sondern auch mit dem viralen Genom in Wechselwirkung tritt, fungiert IE1 vermutlich – analog zu LANA – als Adaptor-Protein, welches die Anheftung viraler Episome an die Chromosomen sich teilender Zellen gewährleistet. Zudem hat die IE1-CTD positiven Einfluss auf die Erhaltung viraler Genome in latent bzw. latenzähnlich infizierten hämatopoetischen Stammzellen und myeloiden Zellen, während die CTD-vermittelte IE1-Nukleosom-Interaktion für die lytische hCMV-Infektion irrelevant ist. Diese Arbeit beschreibt also erstmals im molekularen Detail, wie das virale IE1-Protein mit zellulärem Chromatin interagiert und deutet zudem auf eine unerwartete Rolle dieses Proteins bei der Sicherstellung der lebenslangen Genompersistenz des hCMV im menschlichen Organismus hin.

B Einleitung

1 Das humane Cytomegalievirus

1.1 Klassifizierung und medizinische Bedeutung

Das humane Cytomegalievirus (hCMV) ist einer von acht humanpathogenen Vertretern der Familie der *Herpesviridae*, die sich anhand ihrer biologischen Eigenschaften in die drei Subfamilien α -, β - und γ -*Herpesvirinae* einteilen lassen. Zu den α -Herpesviren zählen die Herpes Simplex Viren 1 und 2 (HSV 1 bzw. HSV 2) sowie das Varizella-Zoster-Virus (VZV). Das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus (KSHV) bilden die Unterfamilie der humanen γ -Herpesviren. Das hCMV ist, neben den humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV 6 bzw. HHV 7), der klassische Vertreter der β -Herpesviren, die sich unter anderem durch einen strikten Wirtstropismus sowie eine vergleichsweise langsame Replikation in Zellkultur auszeichnen (Roizman und Baines, 1991; Modrow et al., 2010).

Infektionen mit hCMV sind weltweit sehr häufig, sodass die Seroprävalenz je nach Land, Lebensstandard und Alter 40 bis knapp 100% beträgt (Mocarski et al., 2013; Boeckh und Geballe, 2011). In Deutschland sind etwa 40% der Menschen mit hCMV infiziert (Enders et al., 2012). Die Übertragung erfolgt durch Körperflüssigkeiten aller Art, im Rahmen von Bluttransfusionen, bei Transplantationen von soliden Organen oder Knochenmark sowie pränatal durch transplazentare Infektion des Fötus (Kurath et al., 2010; Boeckh und Geballe, 2011). Während eine hCMV-Infektion in immunkompetenten Individuen meist inapparent verläuft, können schwerwiegende und teils tödliche Erkrankungen bei immunsupprimierten Transplantations-, AIDS- sowie manchen Krebs-Patienten auftreten. Durch die Infektion eines breiten Spektrums an Zielzellen und hämatogene Dissemination kann praktisch jedes Organ vom Virus befallen werden (Sinzger und Jahn, 1996), was bei immunsupprimierten Patienten zu lebensbedrohlichen Organmanifestationen, beispielsweise in Form einer Enzephalitis, Hepatitis, Kolitis oder interstitiellen Pneumonie, führen kann (Drew, 1992a, 1992b; Vancíková und Dvorák, 2001; Boeckh und Geballe, 2011). Daneben ist hCMV mit einer Infektionsrate von 0,15 bis 2% aller Lebendgeburten die häufigste kongenitale virale Infektion und stellt gleichzeitig die häufigste infektiöse Ursache für Defekte bei ungeborenen Kindern dar (Malm und Engman, 2007). Die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes gelang bisher nicht und auch zur Therapie apparent

hCMV-Infizierter stehen nur wenige Medikamente zur Verfügung (Paulus und Nevels, 2009; Bernstein, 2011; Boeckh und Geballe, 2011).

1.2 Morphologie und Genomorganisation

Die Morphologie der hCMV-Virionen ist typisch für alle Herpesviren, die zu den komplexesten bekannten Viren zählen (Abbildung B.1 A). Das im Viruspartikel linear vorliegende, doppelsträngige, ca. 235 Kilobasenpaare (Kb) umfassende DNA-Genom gehört zu den größten Virusgenomen überhaupt.

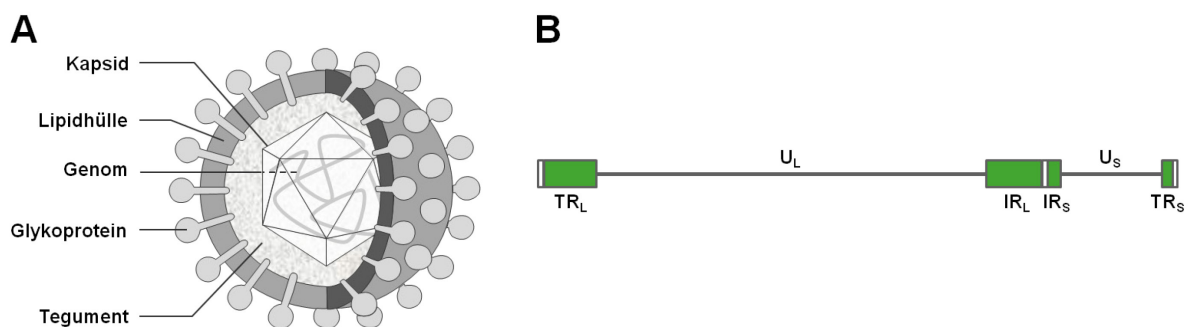


Abbildung B.1: Schematische Darstellung eines hCMV-Partikels und der hCMV-Genomorganisation. (A) Das Virus ist von einer Lipiddoppelschicht mit eingebetteten viralen Glykoproteinen umhüllt. Darunter befindet sich das vom Tegument umgebene ikosaedrische Nukleokapsid, welches das doppelsträngige, lineare DNA-Genom enthält. (B) Dieses besteht aus zwei nicht repetitiven Regionen, dem U_L (unique long)- und dem U_S (unique short)-Segment, die an den Enden von repetitiven Sequenzen, den terminal repeats (TR) und den internal repeats (IR), flankiert werden (jeweils long oder short).

Es wird von internal repeat Sequenzen (IR_L , IR_S) in die beiden Segmente unique long (U_L) und unique short (U_S) geteilt, die wiederum von terminal repeat Bereichen (TR_L , TR_S) flankiert werden (Abbildung B.1 B). Basierend auf dieser Nomenklatur der Genomabschnitte werden die entsprechenden viralen Gene mit den Präfixen UL, US, TRL, TRS, IRL oder IRS bezeichnet (Spaete et al., 1994). In jedem Virion ist ein virales DNA-Molekül in einem ikosaedrischen Protein-Kapsid verpackt, das wiederum vom sogenannten Tegument umgeben ist. Diese Matrix setzt sich aus ca. 40 viralen Proteinen, darunter dem Haupt-Tegument Protein pp65 und dem regulatorischen Protein pp71, sowie aus ca. 70 zellulären Proteinen zusammen. Des Weiteren sind diverse virale und zelluläre mRNAs im Tegument inkorporiert (Terhune et al., 2004; Varnum et al., 2004; Kalejta, 2008). Nach außen wird die Tegumentschicht durch eine Lipid-Doppelmembran zellulären Ursprungs abgegrenzt, in die virale Glykoproteine eingelagert sind (Knipe und Howley, 2013; Mocarski et al., 2013).

1.3 Aspekte der lytischen und persistierenden hCMV-Infektion

Die viralen Glykoproteine formen Membran-ständige Proteinkomplexe, mit denen das Virion an Oberflächenrezeptoren der Zielzelle bindet. Dadurch kommt es, je nach Zelltyp, entweder zur Fusion der viralen Hüllmembran mit der zellulären Plasmamembran oder zur Rezeptor-vermittelten Endocytose, wobei für die zwei genannten Eintrittswege unterschiedliche Glykoproteinkomplexe notwendig sind (Compton et al., 1992; Ryckman et al., 2006, 2008). Nach Penetration der Zielzellmembran werden das virale Kapsid und die Tegumentproteine ins Cytoplasma entlassen. Das Nukleokapsid wird mit Hilfe des zellulären Cytoskeletts zum Kern transportiert und das lineare DNA-Genom durch eine Kernpore in das Nukleoplasma entlassen (Miller und Hertel, 2009). Dort zirkularisiert die virale DNA etwa vier Stunden nach Infektion. Zudem wird das im Viruspartikel frei von Histonen vorliegende virale Genom sofort nach Eintritt in den Zellkern mit zellulären Histonen teilweise in Nukleosomen verpackt (McVoy und Adler, 1994; Nitzsche et al., 2008; Zalckvar et al., 2013).

Das Nukleosom ist die grundlegende, sich wiederholende Einheit des eukaryotischen Chromatins, in dem 146 bis 147 Basenpaare (Bp) doppelsträngige DNA 1,65 mal linksgängig um ein Histon-Oktamer, welches auch als nukleosomaler Kern (core) bezeichnet wird, gewickelt sind (Kornberg, 1974; Luger et al., 1997). Das Histon-Oktamer besteht aus einem zentralen H3/H4-Tetramer, das von zwei H2A/H2B-Dimeren flankiert wird (Abbildung B.2). Zudem bindet das linker-Histon H1 an die Ein- und Austrittsstellen der DNA an der Außenseite des Histon-Oktamers. Die gleichmäßige Aufreihung der einzelnen Nukleosomen entlang der DNA wird als „Perlenkettenstruktur“ bezeichnet. Diese kann zu höher geordneten Chromatinstrukturen kondensieren, wobei der kompakteste Zustand des eukaryotischen Chromatins während der Zellteilung in Form von Metaphase-Chromosomen erreicht wird (Andrews und Luger, 2011; Luger et al., 2012).

Nukleosomen haben eine höhere intrinsische Affinität für bestimmte DNA-Sequenzen, nämlich für solche, die sich aus sterischen Gründen eng um das Histon-Oktamer biegen lassen (Segal und Widom, 2009; Kaplan et al., 2010). Jedoch werden die Nukleosomen-Besetzung und -Positionierung nicht nur durch die DNA-Sequenz vorgegeben, sondern zudem beispielsweise durch chromatin-remodeling-Komplexe kontrolliert, die ATP-abhängig die Positionierung von Nukleosomen entlang des DNA-Doppelstranges verändern oder Histon-Komplexe vollständig von der DNA ablösen (Rippe et al., 2007; Clapier und Cairns, 2009). Auch der Austausch kanonischer core-Histone durch Histon-Varianten (Histon-Isoformen) oder posttranslationale Modifikationen (z.B. Acetylierung, Methylierung, etc.) des flexiblen

Aminoterminus der Histone tragen direkt oder indirekt, durch Rekrutierung Chromatin-modifizierender Proteine, zur Umstrukturierung des Chromatins bei (Talbert und Henikoff, 2010; Bell et al., 2011; Bannister und Kouzarides, 2011). Der Austausch von nukleosomalen Histonen erfolgt über Histon-Chaperone, die außerdem an der Assemblierung und Deassemblierung von Nukleosomen, am Transport sowie der transienten Lagerung von Histonen beteiligt sind (Park und Luger, 2008).

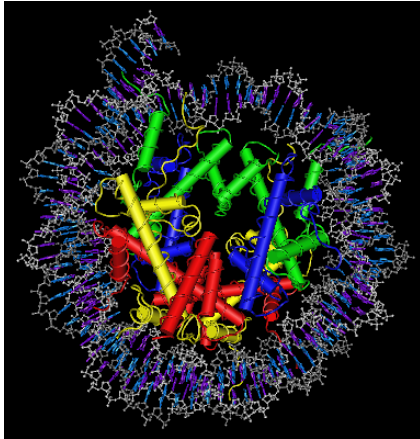


Abbildung B.2: Kristallstruktur eines Nukleosoms. Der nukleosomale Kern, bestehend aus je zwei Kopien der Histone H2A (gelb), H2B (rot), H3 (grün) und H4 (blau), wird von 146 bis 147 Bp doppelsträngiger DNA (grau/blau) umwunden. Ein H3/H4-Tetramer wird dabei von zwei H2A/H2B-Dimeren flankiert. PDB-ID 2CV5

Durch die dynamische Regulation der Nukleosomen-Struktur und folglich der Zugänglichkeit der Nukleotid-Sequenz werden DNA-basierte Prozesse, wie beispielsweise die Transkription von Genen, gesteuert. Die beschriebenen Mechanismen, die zur Änderung der Chromatinstruktur und somit zur möglichen Änderung der Aktivität eines Genlocus führen, ohne dass dabei die zugrundeliegende DNA-Sequenz verändert wird, werden unter dem Begriff „Epigenetik“ zusammengefasst (Goldberg et al., 2007).

Die Chromatinisierung des Genoms des nukleär replizierenden hCMV stellt demnach die Voraussetzung für die epigenetische Regulation der Infektion auf Seiten des Virus dar. So kommt es im Lauf der produktiven hCMV-Infektion zu Veränderungen der Histon-Okkupanz des viralen Genoms sowie der Reprimierungs- und Aktivierungsmarker an den core-Histonen viraler Promotoren und transkribierter Bereiche. Bei der Untersuchung der lokalen und globalen Besetzung des viralen Genoms mit Nukleosomen im zeitlichen Verlauf der lytischen hCMV-Infektion zeigte sich, dass das virale Genom zu frühen Zeitpunkten nach Infektion unregelmäßig mit Nukleosomen besetzt ist und die Besetzungsdichte zudem deutlich unter der des zellulären Genoms bleibt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche Besetzung der viralen DNA mit Nukleosomen durch ein in dieser Phase akkumulierendes virales Protein aktiv niedrig gehalten wird. Zudem folgt die

Assoziation des hCMV-Genoms mit Nukleosomen in der frühen Phase der Infektion intrinsischen DNA-Sequenz-Präferenzen und ist somit vorhersagbar. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die initiale Nukleosomen-Besetzung des viralen Genoms genetisch, also in der viralen DNA-Sequenz, determiniert ist. Zu späteren Zeitpunkten nach Infektion kommt es jedoch zu einem globalen Anstieg der Nukleosomen-Besetzung sowie zu einer dramatischen Reorganisation von Nukleosomen entlang des viralen Genoms, die weitgehend nicht durch die virale DNA-Sequenz vorgegeben ist, sondern unter anderem durch Virus-kodierte Faktoren gesteuert wird (Nitzsche et al., 2008; Zalckvar et al., 2013).

Während der produktiven hCMV-Infektion kommt es zudem zu dynamischen Veränderungen des Histon-Modifikations-Musters am viralen Chromosom. Im lytischen Infektionszyklus wird ein Großteil des viralen Genoms exprimiert, wobei die Transkription der viralen Gene wie bei allen Herpesviren einem dreiphasigen, kaskadenartigen Verlauf folgt: der sehr frühen Phase (immediate early, IE), der frühen Phase (early, E) und der späten Phase (late, L) (Stinski, 1978). Die im zeitlichen Verlauf der Infektion auftretenden Veränderungen der Reprimierungs- und Aktivierungsmarker an den core-Histonen viraler Gene der verschiedenen kinetischen Klassen korrelieren dabei weitgehend mit dem kaskadenartigen Expressionsmuster der entsprechenden Proteine (Murphy et al., 2002; Cuevas-Bennett und Shenk, 2008; Groves et al., 2009; Nitzsche et al., 2012).

Die IE-Proteine werden im lytischen Infektionszyklus sofort nach Eintritt des Genoms in den Wirtszellkern unabhängig von *de novo*-Proteinsynthese exprimiert und wirken unter anderem als Transaktivatoren auf die Expression der E- und L-Gene. Die E-Gene, welche typischerweise für essentielle Faktoren der viralen Replikationsmaschinerie kodieren, werden ab ca. acht Stunden nach Infektion gebildet. Nach dem Einsetzen der DNA-Replikation ca. 24 Stunden nach Infektion beginnt definitionsgemäß die L-Phase, im Rahmen derer die Expression von Strukturproteinen zur Bildung von Tegument und Kapsid sowie für virale Glykoproteine im Vordergrund steht (Mocarski et al., 2013). Der lytische Infektionszyklus beginnt also mit der Adsorption der Viruspartikel an die Oberfläche der Zielzelle und endet zwei bis drei Tage später mit der Freisetzung infektiöser Nachkommenviren.

Wie oben bereits erwähnt, ist ein typisches Charakteristikum des hCMV dessen breiter Zelltropismus, weshalb sich eine lytische hCMV-Infektion in den verschiedensten Geweben und Zelltypen manifestieren kann. Neben Fibroblasten, die als Standardzellkultursystem für die produktive hCMV-Infektion verwendet werden, gelten auch Epithelzellen, Endothelzellen, Hepatozyten, Neuronen sowie glatte

Muskelzellen als permissiv für die lytische Virusreplikation (Rubin, 1990; Sinzger et al., 1995; Sissons und Carmichael, 2002).

Nach der produktiv verlaufenden Erstinfektion mit hCMV, die in immunkompetenten Individuen sowohl von Zellen und Molekülen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems unter Kontrolle gebracht wird, kommt es jedoch, wie bei allen Herpesviren, zur Etablierung einer lebenslangen Persistenz des Virus im Wirt (Boeckh und Geballe, 2011). Zu dieser tragen vermutlich sowohl chronisch aktive als auch latente Infektionen bei (Sinclair, 2008; Goodrum et al., 2012). Über die molekularen Mechanismen der chronischen hCMV-Infektion ist wenig bekannt, jedoch ist diese klinisch durch die kontinuierliche, über einen längeren Zeitraum andauernde Freisetzung von Nachkommenviren in bestimmten Körperregionen definiert. Vor allem Endothel- und Epithelzellen scheinen die chronische hCMV-Infektion zu unterstützen, sodass es beispielsweise bei hCMV-positiven Müttern bzw. Pädiatriepatienten zu einem über Monate bzw. Jahre andauernden Ausscheiden von Viren über die Muttermilch bzw. die Harnwege kommen kann (Stagno et al., 1980; Britt, 2008). Im Gegensatz dazu produzieren latent infizierte Zellen keine infektiösen Nachkommenviren, obwohl diese die vollständigen viralen Genome enthalten. Ein weiteres definierendes Charakteristikum der Latenz ist deren reversible Natur, was bedeutet, dass das Virus aus dem latenten Infektionsstadium reaktivieren und erneut in den produktiven Infektionszyklus übergehen kann. Dieser Punkt ist besonders wichtig, da er eine latente, die auch als reversible nicht-produktive Infektion definiert wird, von einer abortiven Infektion unterscheidet (Goodrum et al., 2012).

Sporadisch auftretende Reaktivierungen aus der Latenz in immunkompetenten Wirten werden durch die T-Zell-vermittelte Immunität effektiv kontrolliert und treten klinisch praktisch nicht in Erscheinung. Dahingegen rühren schwerwiegende Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten häufig nicht etwa aus einer hCMV-Primärinfektion, sondern vielmehr aus der Reaktivierung des Virus aus der Latenz, die durch die mangelnde T-Zell Kontrolle in den Patienten begünstigt wird (Reeves und Sinclair, 2008; Boeckh und Geballe, 2011; Goodrum et al., 2012). Zudem gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass die persistierende hCMV-Infektion eine Rolle bei der altersbedingten T-Zell Immunseneszenz spielt sowie in möglicher kausaler Beziehung zu verschiedenen Tumorerkrankungen (z.B. Glioblastoma multiforme) und Entzündungserkrankungen (z.B. Arteriosklerose) auch bei immunkompetenten Individuen stehen könnte (Mitchell et al., 2008; Scheurer et al., 2008; Pawelec et al., 2010; Caposio et al., 2011).

Um die Biologie und Pathogenese des hCMV vollständig zu erfassen, wäre es daher von großer Bedeutung, die molekularen Mechanismen der hCMV-Latenz und

Reaktivierung aufzuklären. Jedoch gibt es trotz intensiver Forschungsbemühungen der letzten Jahrzehnte wenige gesicherte Erkenntnisse bezüglich der Latenz-etablierung, Reaktivierung und Genomerhaltung des hCMV. Während, wie bereits erwähnt, viele verschiedene Zelltypen für die produktive Infektion permissiv sind, scheint sich eine latente Infektion nur in einigen wenigen Zelltypen zu manifestieren, wenngleich bis heute nicht alle hCMV-Latenzorte im menschlichen Körper identifiziert werden konnten (Sinclair, 2008). Jedoch herrscht großer Konsens darüber, dass hCMV latent in Zellen der myeloiden Linie auftritt. So konnte hCMV-DNA zunächst in mononukleären Zellen des peripheren Blutes hCMV-positiver, asymptomatischer Blutspender nachgewiesen werden (Schrier et al., 1985; Stanier et al., 1989), wobei sich zeigte, dass CD14⁺ Monocyten und nicht etwa B- oder T-Zellen Träger latenter hCMV-Genome sind (Bevan et al., 1991; Taylor-Wiedeman et al., 1991). Aufgrund der Kurzlebigkeit der peripheren Monocyten (Hume et al., 2002) können diese jedoch nicht das primäre Reservoir für latente hCMV-Infektionen darstellen. Stattdessen spielen wohl eher langlebige, unreife myeloische Vorläuferzellen eine Rolle für die lebenslange hCMV-Persistenz. In Übereinstimmung dazu konnte gezeigt werden, dass pluripotente CD34⁺ Knochenmarksstammzellen, welche Vorläufer der Monocyten und anderer hämatopoetischer Zellen darstellen, ebenfalls latente hCMV-Genome *in vivo* tragen (Minton et al., 1994; Mendelson et al., 1996) und diese in latenter Form selektiv an Zellen der myeloiden Linie weitergeben (Khaiboullina et al., 2004). Latent infizierte myeloide Vorläuferzellen scheinen demnach essentiell für die Aufrechterhaltung des Pools an infizierten Monocyten im peripheren Blut zu sein (Sinclair und Sissons, 1996; Reeves und Sinclair, 2008).

Es ist weiterhin bekannt, dass der Differenzierungsstatus der infizierten Zelle einen Einfluss darauf hat, ob die hCMV-Infektion produktiv oder nicht-produktiv verläuft. Dabei wird der Ausgang der Infektion vermutlich durch die Differenzierungs-abhängige Regulation des major immediate early-Promotors (MIEP) bestimmt. Die Differenzierung latent infizierter CD34⁺ oder CD14⁺ Zellen zu Makrophagen oder Dendritischen Zellen führt zur Reaktivierung des Virus und damit zum Eintritt in den lytischen Zyklus, was schließlich die Produktion infektiöser Nachkommenviren zur Folge hat (Abbildung B.3) (Hahn et al., 1998; Ibanez et al., 1991; Söderberg-Nauclér et al., 1997, 2001; Reeves et al., 2005b).

Latent hCMV-infizierte, im Blut zirkulierende Monocyten, die sich zu gewebständigen Makrophagen differenzieren können, tragen demnach scheinbar zur Dissemination des Virus im Körper bei (Smith et al., 2004).

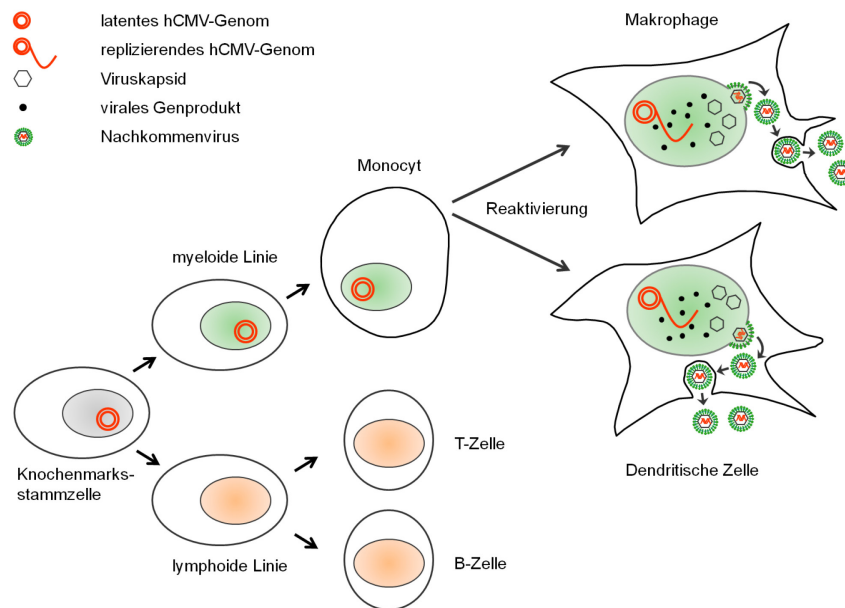


Abbildung B.3: Orte der hCMV-Latenz. Pluripotente $CD34^+$ Knochenmarkstammzellen stellen wahrscheinlich ein Reservoir für latente hCMV-Infektionen dar. Von ihnen ausgehend werden die latenten Virusgenome selektiv an Zellen der myeloiden Linie weitergeben, deren Differenzierung zu Makrophagen oder Dendritischen Zellen jedoch die Reaktivierung des latenten Virus und somit den Übergang in den lytischen Zyklus zur Folge hat (modifiziert nach Reeves und Sinclair, 2008).

Neben der Untersuchung der natürlichen Latenz *in vivo*, wurden diverse experimentelle *in vitro* Zellsysteme zur Erforschung der hCMV-Latenz und -Reaktivierung etabliert. Dafür werden hauptsächlich kultivierte $CD14^+$ Monocyten und $CD34^+$ Knochenmarkstammzellen herangezogen, die sich *in vitro* mit klinischen hCMV-Isolaten latent infizieren lassen (Goodrum et al., 2002; Cheung et al., 2006; Hargett und Shenk, 2010; Rossetto et al., 2013). Auch primäre $CD33^+$ Vorläuferzellen der myeloiden Linie wurden für experimentelle hCMV-Latenzstudien verwendet (Kondo et al., 1994; Hahn et al., 1998). Nachteile dieser primären Zellsysteme sind das aufwendige Isolieren der Zellen aus dem Blut bzw. dem Knochenmark hCMV-negativer Spender, die niedrigen Infektionsraten *ex vivo* sowie deren Heterogenität. Zudem muss die Differenzierung der primären Zellen *ex vivo* aufwendig, mit Hilfe geeigneter Cytokin-Cocktails unterbunden werden, da es sonst zur Virus-Reaktivierung und somit zum Übergang in den lytischen Replikationszyklus kommt (Albright und Kalejta, 2013). Leichter zu handhabende Zellkulturmodelle für eine nicht-produktive, latenzartige hCMV-Infektion stellen die Teratokarzinomzelllinie NT2 sowie myeloide Leukämiezelllinien, wie die THP-1- und die $CD33^+/CD34^+$ KG-1-Zelllinie dar (Murphy et al., 2002; Ioudinkova et al., 2006; Albright und Kalejta, 2013).

Die Anzahl hCMV-Genom positiver mononukleärer Zellen des peripheren Blutes bzw. Knochenmarkstammzellen während der natürlichen Latenz liegt geschätzt bei nur 0,004 bis 0,01%, was bedeutet, dass eine aus 10^4 bis 10^5 Zellen latente Genome

trägt. Dabei variiert die Kopienzahl der hCMV-Genome zwischen 2 und 13 pro infizierter Zelle (Slobedman und Mocarski, 1999). Analog zu anderen Herpesviren, wie dem EBV und KSHV, integrieren die viralen Genome während der latenten Phase der hCMV-Infektion nicht in die zelluläre DNA, sondern liegen in zirkulärer Form als extrachromosomale Episome im Kern der Wirtszelle vor (Gardella et al., 1984; Decker et al., 1996; Bolovan-Fritts et al., 1999). Im Gegensatz zu den α - und γ -Herpesviren, für die die Mechanismen der viralen Genomerhaltung während der Viruslatenz größtenteils aufgeklärt werden konnten, sind die molekularen Mechanismen, welche zur lebenslangen hCMV-Genompersistenz beitragen bislang ungeklärt.

2 Genompersistenz-Mechanismen humanpathogener α - und γ -Herpesviren

Die humanpathogenen Vertreter der α -Herpesviren, HSV 1, HSV 2 und VZV, etablieren in terminal differenzierten, neuronalen Zellen sensorischer Ganglien latente Infektionen, wobei die als Episome vorliegenden Virusgenome im Kern der Wirtszelle nicht mehr repliziert werden (Bloom und Kwiatkowski, 2011; Zerboni und Arvin, 2011). Die humanpathogenen γ -Herpesviren EBV und KSHV hingegen etablieren latente Infektionen in proliferierenden peripheren B-Gedächtniszellen (Thorley-Lawson, 2005) bzw. in durch die Infektion transformierten Tumor-Zellen (z.B. primary effusion lymphoma-Zellen und Kaposi-Sarkom-Zellen) (Decker et al., 1996; Ballestas et al., 1999). Die γ -Herpesviren liegen in latent infizierten Zellen, genau wie das hCMV, als extrachromosomale Multikopien-Episome vor. Da EBV und KSHV in teilungsfähigen Zellen latent persistieren und virale Genome generell nicht über Zentromere verfügen, haben diese Viren molekulare Mechanismen entwickelt, welche die gezielte Übertragung der viralen Genome von der Wirtszelle auf deren Tochterzellen sowie die nukleäre Lokalisation des viralen Erbguts nach erfolgter Zellteilung gewährleisten (Thorley-Lawson, 2005; Feeney und Parish, 2009; Ohsaki und Ueda, 2012). So kodieren beide Viren für Latenz-assoziierte Proteine, denen herausragende Funktionen bei der Aufrechterhaltung der lebenslangen viralen Genompersistenz zukommen (Abbildung B.4).

Im Fall des KSHV übernimmt diese Aufgabe das Latenz-assoziierte nukleäre Antigen oder kurz LANA. Das LANA-Protein sorgt zum einen für die Replikation der viralen DNA parallel zu der des zellulären Genoms in der S-Phase des Zellzyklus (Garber et al., 2002; Hu et al., 2002; Stedman et al., 2004; Verma et al., 2006), zum anderen bindet es über eine amino-terminale Domäne an zelluläre Chromosomen und über eine carboxy-terminale Domäne an spezifische, repetitive Sequenzen des viralen

Genoms, wodurch die einmal replizierten viralen Episome während der Mitose an die Chromosomen der Wirtszelle angeheftet werden (Ballestas et al., 1999; Ballestas und Kaye, 2001; Cotter et al., 2001; Barbera et al., 2004, 2006). Der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen dem viralen Protein und zellulärem Chromatin, der für die Anheftung der viralen Episome an die Chromosomen der Wirtszelle verantwortlich ist, konnte 2006 von Barbera und Kollegen unter anderem anhand von Röntgenkristallstruktur-Analysen detailliert und überzeugend aufgeklärt werden. Dabei zeigte sich, dass der Amino-Terminus des LANA-Proteins (Aminosäuren 1-23) eine β -Haarnadelstruktur ausbildet, die in eine saure Tasche bindet, welche durch negativ geladene Reste der Histone H2A und H2B ausgebildet wird und auf der Nukleosomen-Oberfläche exponiert ist (Barbera et al., 2006).

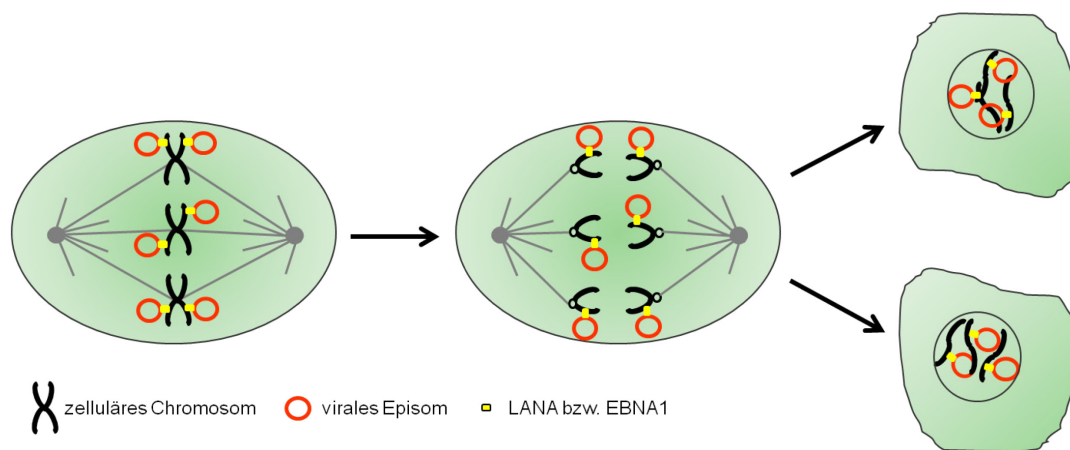


Abbildung B.4: Segregations-Mechanismus latenter γ -Herpesvirus-Genome. Durch die Assoziation der viralen extrachromosomalen Episome mit den Chromosomen der Wirtszelle wird die gleichmäßige Verteilung der viralen Genome auf die Tochterzellen sowie deren nukleäre Retention nach erfolgter Zellteilung gewährleistet. Diese Assoziation wird über virale Adaptor-Proteine vermittelt, die über eine carboxy-terminale Domäne an spezifische, repetitive Sequenzen des viralen Genoms und über eine amino-terminale Domäne an das zelluläre Chromatin binden. Für KSHV übernimmt diese Aufgabe das LANA-Protein, für EBV das EBNA1-Protein (modifiziert nach Feeny und Parish, 2009).

Während der latenten Infektion peripherer B-Gedächtniszellen mit EBV wird das EBV nukleäre Antigen 1 (EBNA1) exprimiert, das bezüglich der viralen Genomerhaltung analoge Funktionen zum KSHV LANA erfüllt (Lindner und Sugden, 2007; Nanbo et al., 2007). Im Gegensatz zu LANA interagiert EBNA1 jedoch nicht über nukleosomale Histone mit den Chromosomen der Wirtszelle. Stattdessen wurde lange Zeit postuliert, dass die amino-terminale Chromatin-bindende Domäne des EBNA1 die replizierten viralen Episome über Interaktion mit dem Chromatin-assoziierten Nicht-Histon-Protein EBNA1 binding protein 2 (EBP2) ans zelluläre Chromatin heftet (Wu et al., 2000; Kapoor et al., 2001; Kapoor und Frappier, 2003). Neuere Arbeiten weisen jedoch darauf hin, dass eine amino-terminal lokalisierte DNA-bindende Domäne (AT-hook) im EBNA1-Protein direkt an A/T-reiche Sequenzen der zellulären DNA bindet

und so die Verteilung der latenten EBV-Episome an die Tochterzellen gewährleistet (Sears et al., 2004; Altmann et al., 2006).

Bisher war nicht bekannt, ob es einen derartigen Segregation-Mechanismus latenter viraler Episome bei β -Herpesviren gibt oder welche Genprodukte möglicherweise daran beteiligt sein könnten.

3 Latenz-assoziierte hCMV-Genprodukte

Das hCMV-Genom gehört, wie bereits erwähnt, zu den größten bekannten viralen Genomen und besitzt nach jüngsten Erkenntnissen eine Kodierungskapazität von über 700 Genprodukten, unter denen nicht nur Proteine sondern auch zahlreiche nicht-kodierende RNAs zu finden sind (Stern-Ginossar et al., 2012). Anders als bei den α -Herpesviren HSV 1 und HSV 2 und den γ -Herpesviren EBV und KSHV, die während der Latenz ein definiertes, limitiertes Set an spezifisch Latenz-assoziierten Transkripten exprimieren, konnte für hCMV bis heute kein derartiges Set an viralen Genprodukten identifiziert werden. Zwar ist das virale Transkriptionsprofil in latent hCMV-infizierten Zellen gegenüber lytisch infizierten Zellen deutlich eingeschränkt, jedoch werden fast alle Transkripte, die während der natürlichen und experimentellen Latenz detektiert werden konnten, auch im lytischen Stadium der hCMV-Infektion exprimiert (Sinclair, 2008). Die drei viralen Gene, deren Expression in latent hCMV-infizierten Zellen von mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen übereinstimmend bestätigt wurde sind UL138, ein Modulator der Tumornekrosefaktor (TNF)-abhängigen Signaltransduktion, UL111A, ein CMV Homolog des humanen Interleukin-10 (cmvIL-10) und das UL81-82 antisense-Transkript latent undefined nuclear antigen (LUNA) (Bego et al., 2005; Goodrum et al., 2007; Jenkins et al., 2008). Während UL138 und cmvIL10 wahrscheinlich immunmodulatorische Funktionen erfüllen, ist die Funktion von LUNA für die latente Infektion weitgehend ungeklärt (Petrucelli et al., 2009; Cheung et al., 2009; Umashankar et al., 2011; Bego et al., 2011). Diesen viralen Genprodukten scheint jedoch keine Rolle für die Erhaltung latenter hCMV-Genome zuzukommen.

Die Expression von MIE-Genen während einer latenten Infektion mit hCMV hingegen ist umstritten. Einige Arbeiten zeigen, dass diese nicht exprimiert werden, da der MIEP durch epigenetische Reprimierung stillgelegt ist (Reeves et al., 2005a, 2005b). Jedoch wurden sowohl in experimentell infizierten myeloiden Vorläuferzellen als auch in gesunden hCMV seropositiven Trägern Transkripte nachgewiesen, die von beiden Strängen der MIE-Region kodiert sind (Kondo et al., 1994, 1996; White et al., 2000). Auch in experimentell latent infizierten hämatopoetischen Vorläuferzellen konnte UL123 mRNA zumindest transient detektiert werden (Goodrum et al., 2002, 2004;

Cheung et al., 2006; Petrucelli et al., 2009). Eine kürzlich durchgeführte detaillierte Genom-weite Expressionsanalyse bestätigte die Anwesenheit von UL123 mRNA sowohl in experimentell als auch in natürlich latent infizierten CD34⁺ Zellen (Rossetto et al., 2013).

4 Das hCMV-kodierte IE1-Protein

PUL123, besser bekannt als das 72 kDa schwere IE1-Protein, ist eines der ersten Genprodukte, das während der lytischen hCMV-Infektion exprimiert wird. IE1 ist ein regulatorisches Phosphoprotein, das zusammen mit dem 86 kDa IE2-Protein (pUL122) zu den bedeutendsten MIE-Genprodukten zählt. Die beiden Proteine entstehen ausgehend von einem differentiell gespleißten Primärtranskript, das unter der Kontrolle des MIEP steht. IE1 und IE2 teilen sich 85 Aminosäuren im aminoterminalen Bereich, kodiert durch Exon 2 und 3, unterscheiden sich jedoch in den carboxy-terminalen Abschnitten, kodiert durch Exon 4 (IE1) bzw. Exon 5 (IE2). Beiden Proteinen werden kritische Funktionen für die Virus-Wirt-Interaktion im produktiven Infektionszyklus zugeschrieben (Mocarski et al., 2013; Meier und Stinski, 2013). Das 491 Aminosäuren umfassende IE1 ist das erste nach Infektion nachweisbare, neusynthetisierte virale Protein und akkumuliert in großen Mengen im Kern der Wirtszelle, wo es vielfältige Funktionen ausübt.

Die zwei bisher aufgeklärten Schlüsselfunktionen von IE1 sind die Blockierung innater und intrinsischer Abwehrmechanismen der Wirtszelle sowie die transkriptionelle Aktivierung viraler E-Gene. So gilt IE1, neben IE2, im Allgemeinen als promiskuitiver transkriptioneller Regulator und ist von Bedeutung für eine effiziente Virusvermehrung. Virusmutanten des laboradaptierten Towne-Stammes mit spezifischen Deletionen in der IE1-Sequenz weisen, zumindest unter niedrigen Infektionsmultiplizitäten, eine partielle Expressionsblockade viraler E-Gene auf, was eine starke Attenuierung der viralen Replikation zur Folge hat (Mocarski et al., 1996; Greaves und Mocarski, 1998). Zudem reguliert IE1 die Aktivität verschiedener zellulärer Gene. Die IE1-abhängige transkriptionelle Regulation von Genen wird zum einen durch die Interaktion von IE1 mit zellulären Transkriptionsfaktoren gewährleistet. Zu den bedeutendsten zählen wohl Proteine der signal transducer and activator of transcription (STAT)-Familie, da beispielsweise die Interaktion zwischen IE1 und STAT2 zur Blockierung der antiviralen zellulären Typ I Interferon-Antwort führt (Paulus et al., 2006; Huh et al., 2008; Krauss et al., 2009). Auch die Interaktion von IE1 mit STAT3 hat einen proviralen Einfluss auf die infizierte Zelle (Reitsma et al., 2013). Zudem kommt es nach ektopischer Expression von IE1 zu einer von aktiviertem STAT1 abhängigen Induktion einer pro-inflammatorischen Typ

II-ähnlichen Interferon-Antwort (Knoblach et al., 2011). Neben den STAT-Proteinen wurden außerdem die zellulären Transkriptions-Faktoren E2F1, CTF1 und Sp1 als IE1-Interaktionspartner beschrieben, was neben der Aktivierung viraler Gene auch die Aktivierung zahlreicher zellulärer Gene nach sich zieht (Margolis et al., 1995; Hayhurst et al., 1995; Yurochko et al., 1997).

Die IE1-abhängige Regulierung der Transkription viraler Gene erfolgt jedoch nicht nur über Wechselwirkungen zwischen IE1 und zellulären Transkriptionsfaktoren, sondern findet auch auf epigenetischer Ebene des viralen Chromosoms statt. So konnte gezeigt werden, dass IE1 physikalisch mit der Histondeacetylase (HDAC) 3 interagiert, wobei die Wechselwirkung mit diesem Histon-modifizierenden Enzym zur Hyperacetylierung von H3 und H4 an viralen Promotoren und damit zur Aktivierung der E- und L-Gen-Transkription führt (Nevels et al., 2004a). Daneben scheint das IE1-Protein eine entscheidende Rolle bei der Chromatinisierung des hCMV-Genoms zu spielen. Wie bereits erwähnt, liegt die virale DNA im Nukleokapsid frei von Histonen vor, wird jedoch unmittelbar nach Eintritt in den Wirtszellkern mit zellulären Histonen zumindest teilweise in Nukleosomen verpackt (Nitzsche et al., 2008; Zalckvar et al., 2013), was eine intrinsische, antivirale Strategie der Zelle darstellen könnte (Kutluay und Triezenberg, 2009). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Genome IE1-defizienter Viren im Vergleich zu Wildtyp Viren während der produktiven hCMV-Infektion eine global erhöhte Nukleosomen-Dichte aufweisen, was auf eine antagonistische Wirkung von IE1 auf die Nukleosomen-Besetzung des hCMV-Genoms schließen lässt. Zudem weisen die Genome der IE1-Deletionsmutante im Vergleich zu Wildtyp Genomen eine reduzierte dynamische Nukleosomen-Reorganisation im Verlauf der Infektion auf. Die Unterschiede in der Nukleosomen-Organisation zwischen Wildtyp und IE1-defizienten Viren korrelieren dabei interessanterweise mit der verzögerten Transkription viraler Gene im Lauf der lytischen Infektion mit IE1-defizienten Viren (Zalckvar et al., 2013).

Des Weiteren kolokalisiert IE1 zu Beginn der lytischen hCMV-Infektion mit intranukleären, antiviralen Strukturen, den sogenannten promyelocytic leukemia (PML)-Körpern, auch bekannt als nuclear domain 10 (ND10). Diese Multiproteinkomplexe beinhalten, neben dem namensgebendem Promyelozytischen Leukämie (PML)-Protein, einige an epigenetischen Regulationsmechanismen beteiligten Proteine, wie etwa das Histon-Chaperon hDaxx, den chromatin-remodeling-Faktor ATRX sowie HDACs und DNA-Methyltransferasen und gelten daher als Orte transkriptioneller Reprimierung (Drané et al., 2010; Everett und Chelbi-Alix, 2007; Tavalai und Stamminger, 2008; Saffert und Kalejta, 2008). PML-Körper assoziieren mit in den Wirtszellkern eintretenden viralen Genomen, wodurch es zu

Beginn der hCMV-Infektion zur hDaxx-vermittelten Assoziation des MIEP mit modifizierten Histonen kommt, die einen Transkriptions-reprimierenden Chromatin-Status erzeugen (Woodhall et al., 2006). Zu Beginn der lytischen Infektion induziert das Tegumentprotein pp71 den proteasomalen Abbau von hDaxx und hebt so die Inhibierung des MIEP auf (Saffert und Kalejta, 2006; Cantrell und Bresnahan, 2006; Hwang und Kalejta, 2007). Das infolgedessen exprimierte IE1 interagiert vermutlich über PML mit den ND10-Strukturen und führt nach De-SUMOylierung einzelner Komponenten schließlich zu deren Auflösung (Paulus und Nevels, 2009; Tavalai und Stamminger, 2011), wodurch IE1 vermutlich die Etablierung eines antiviralen Zustands in der Zelle verhindert (Lieberman, 2006; Kutluay und Triezenberg, 2009). Während IE1 im Verlauf der produktiven Infektion also verschiedenste Funktionen erfüllt, wurde bisher nicht untersucht, ob diesem viralen Protein möglicherweise auch eine Rolle bei der Persistenz des hCMV zukommt.

Bereits vor 25 Jahren jedoch wurde eine Assoziation von IE1 mit kondensiertem zellulärem Chromatin beschrieben (Lafemina et al., 1989), wobei diese sowohl nach ektopischer Expression von IE1 (Abbildung B.5), als auch während der produktiven hCMV-Infektion zu beobachten ist (Reinhardt et al., 2005; Shin et al., 2012).

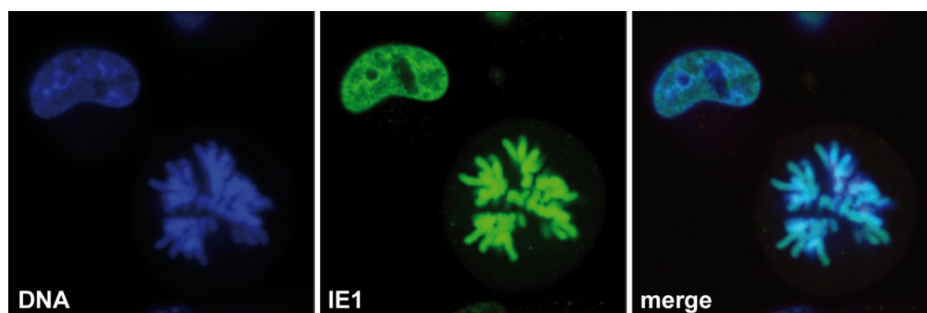


Abbildung B.5: Globale Colokalisation von IE1 mit zellulärem mitotischem Chromatin. Die Fluoreszenz-Bilder zeigen, dass ein EGFP-IE1-Fusionsprotein (grün, Mitte) in Plasmid-transfizierten, lebenden humanen Zellen mit zellulärem mitotischem Chromatin (blau, links) assoziiert (Überlagerung, rechts).

Zunächst wurde die Chromosomen-Assoziation des IE1-Proteins grob auf IE1-spezifische Exon 4-Sequenzen eingeschränkt (Lafemina et al., 1989), später auf die Aminosäuren 421 bis 486 (Wilkinson et al., 1998). Erst 16 Jahre nach der erstmaligen Entdeckung der Colokalisation von IE1 mit zellulären Metaphase-Chromosomen wurde der Proteinbereich identifiziert, der für diese Assoziation essentiell und zugleich ausreichend ist. Bei der Region handelt es sich um die äußersten 16 carboxy-terminalen Aminosäuren (As 476-491) des IE1-Proteins, die daraufhin die Bezeichnung chromatin-tethering domain (CTD) erhielt (Reinhardt et al., 2005).

Bisher war jedoch nicht bekannt, über welche Komponente des Chromatins IE1 mit zellulären Chromosomen interagiert. Prinzipiell sind drei Möglichkeiten denkbar: Das virale Protein könnte direkt an DNA binden, wobei IE1 bis heute nicht als DNA-bindendes Protein beschrieben wurde (Lafemina et al., 1989; Münch et al., 1992; Reinhardt et al., 2005). Außerdem könnte die Assoziation auf Wechselwirkungen mit Protein-Komponenten des Chromatins beruhen, also entweder auf der Interaktion mit Chromatin-assoziierten Nicht-Histon-Proteinen oder, wie im Fall des KSHV LANA-Proteins, über Interaktion mit Histonen. Tatsächlich konnte unsere Forschungsgruppe im Vorfeld dieser Arbeit zeigen, dass IE1 sowohl in Plasmid-transfizierten Zellen als auch in hCMV-infizierten Fibroblasten physisch mit den core-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 in Wechselwirkung tritt (Mücke, 2010; Mücke et al., 2014). Anhand von Bindungsstudien mit gereinigtem IE1 und säureextrahierten Histonen, die in Ab- bzw. Anwesenheit von Nukleasen durchgeführt wurden, konnte zudem nachgewiesen werden, dass IE1 Nukleinsäure-unabhängig und höchstwahrscheinlich über direkte Proteininteraktion an die vier core-Histone bindet (Mücke, 2010; Bernhardt, 2010; Mücke et al., 2014). Die Assoziation des IE1-Proteins mit zellulärem Chromatin könnte also über die Bindung von IE1 an nukleosomale Histon-Oktamere vermittelt werden.

5 Zielsetzung

Das hCMV-kodierte IE1 ist ein nukleär akkumulierendes Protein, dem bisher zwei Schlüsselfunktionen im Rahmen der lytischen Virusinfektion zugeschrieben wurden. So fungiert es zum einen als promiskuitiver Regulator der viralen und zellulären Transkription, zum anderen als Antagonist innater und intrinsischer Abwehrmechanismen der Wirtszelle. Seit langem ist zudem bekannt, dass das IE1-Protein über seine carboxy-terminal lokalisierte CTD mit zellulären Metaphase-Chromosomen assoziiert. Bislang gab es jedoch keine Untersuchungen zum molekularen Mechanismus, über den sich die CTD an das zelluläre mitotische Chromatin heftet und auch die funktionellen Konsequenzen dieser Interaktion waren völlig ungeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst der detaillierte molekulare Mechanismus, welcher der physischen Interaktion der IE1-CTD mit zellulären Chromosomen zugrunde liegt, aufgeklärt werden. Im Anschluss sollte die Funktion der CTD-vermittelten IE1-Chromatin-Interaktion hinsichtlich ihrer bisher unbekannt Rolle für die produktive hCMV-Infektion untersucht werden. Dies sollte insbesondere im Hinblick auf die IE1-abhängige Transkriptionsaktivierung, die antagonistische Wirkung von IE1 auf die Chromatinisierung des viralen Episoms und das Replikationsverhalten des klinischen hCMV-Stammes TB40/E erfolgen. Ein

weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, mögliche funktionelle Konsequenzen der IE1-Chromatin-Interaktion für die persistierende hCMV-Infektion zu beleuchten. Zu diesem Zweck sollte zum einen die mögliche IE1- bzw. IE1-CTD-abhängige Assoziation viraler Genome mit zellulären Chromosomen, zum anderen der Einfluss der IE1-CTD auf die Persistenz viraler Episome in latent bzw. latenzähnlich infizierten Zellen untersucht werden.

C Material und Methoden

1 Materialien

1.1 Puffer und Lösungen

In Tabelle C.1 sind Puffer und Lösungen aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle C.1: Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Phosphate buffered saline (PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4)
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05% [w/v] Trypsin, 0,02% [w/v] EDTA in PBS
10x Nick Translations Puffer	500 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM MgCl ₂ , 0.5 mg/ml BSA
20 x SSC	3 M NaCl, 300 mM Natriumzitat (pH 7,0)
Dextransulfat-Lösung	20% [w/v] Dextransulfat in 4 x SSC
Zitratpuffer	10 mM KCl, 135 mM NaCl, 40 mM Zitronensäure/Natriumzitat (pH 3.0)
Denaturierungslösung	70% entionisiertes Formamid in 2 x SSC
Formamid-Waschlösung	50% [v/v] entionisiertes Formamid in 2 x SSC
Fixativ-Lösung	Methanol-Eisessig-Mischung (3:1)
Pepsin-Lösung	0.005% [w/v] Pepsin in 0.01 M HCl
Tween 20-Waschlösung	0,1% [v/v] Tween 20 in 4 x SSC
DAPI-Lösung	0,33 µg/ml DAPI in PBS
MIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl, 0,1% [w/v] SDS, 1% [v/v] Igepal CA-630, 0,5% [w/v] Natriumdeoxycholat
ChIP-SDS-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,1), 10 mM EDTA, 1% [w/v] SDS
ChIP-Verdünnungspuffer	16,7 mM Tris-HCl (pH 8,1), 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA, 1,1% [v/v] Triton X-100, 0,01% [w/v] SDS
ChIP-Niedrigsalzpuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,1), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% [v/v] Triton X-100, 0,1% [w/v] SDS
ChIP-Hochsalzpuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,1), 0,5 M NaCl, 2 mM EDTA, 1% [v/v] Triton X-100, 0,1% [w/v] SDS
ChIP-LiCl-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,1), 0,25 M LiCl, 1 mM EDTA, 1% [v/v] Igepal CA-630, 1% [w/v] Natriumdesoxycholat
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,1), 1 mM EDTA
FastChIP-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 333 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% [v/v] Triton X-100, 0,5% [v/v] Igepal CA-630
GST-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 1 mM PMSF
GST-Equilibrierungs-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂
GST-Niedrigsalzpuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1% [v/v] Triton X-100
GST-Hochsalzpuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1% [v/v] Triton X-100
CoIP-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 10% [v/v] Glycerin, 0,5% [v/v] Triton X-100
CoIP-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,1% [v/v] Igepal CA-630

Bezeichnung	Zusammensetzung
hypotoner Lysepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 3 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, 0,5% [v/v] Igepal CA-630, 1 mM DTT
2 x Proteinauftragspuffer	60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% [w/v] SDS, 10% [v/v] Glycerin, 0,001% [w/v] Bromphenolblau, 200 mM β-Mercaptoethanol
PBS-T	0,05% [v/v] Tween 20 in PBS
IF-Blockierungslösung	2% [w/v] BSA, 0,05% [v/v] Tween 20 in PBS

1.2 Agarose- und Sepharose-Matrizes

Die folgenden Matrizes wurden zur Affinitätsreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen bzw. für die Präzipitation von Antigen/Antikörper-Komplexen verwendet (Tabelle C.2).

Tabelle C.2: Verwendete Matrizes

Bezeichnung	Quelle
Glutathion-Sepharose™ 4B	GE Healthcare Life Sciences
Protein A-Agarose/Lachs Sperma DNA	Millipore
Maus-IgG-Agarose	Sigma-Aldrich
Anti-HA-Agarose (HA-7)	Sigma Aldrich
Anti-Flag-Agarose (M2)	Sigma Aldrich

1.3 Bakterienstämme

Die in Tabelle C.3 aufgeführten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme wurden für Klonierungen, die Herstellung rekombinanter TB40/E-Bacmide, Plasmid-DNA-Präparationen und zur Produktion von GST-Fusionsproteinen herangezogen.

Tabelle C.3: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Quelle/Referenz
DH10B	<i>E. coli</i> K12 Δ(mrr-hsd RMS-mcrBC) mcrA recA1	Bethesda Research Laboratories (Washington, USA) Grant et al., 1990
GM169	<i>E. coli</i> K12 dam-	Wagner (Universität Regensburg) McGraw und Marinus, 1980
GS1783	<i>E. coli</i> DH10B λ cI867 Δ(cro-bioA) <> araC-P _{BAD} I-sceI	Tischer (Freie Universität Berlin) Tischer et al., 2010
Rosetta	<i>E. coli</i> BL21 Δ(lacYZ) Ion ompT pRARE	Novagen Novy et al., 2001

1.4 Humane Zellen

In Tabelle C.4 sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen Zellen aufgelistet. MRC-5- und KG-1-Zellen wurden für Infektionsstudien herangezogen. MRC-5-abgeleitete Zellen, die induzierbar verschiedene IE1-Varianten exprimieren und IE1-negative TetR-Kontrollzellen wurden für Chromatinimmunpräzipitations-Experimente verwendet. Mit Expressionsplasmiden transfizierte H1299-Zellen

dienten für *in vitro*- und *in vivo*-Bindungsstudien, sowie für Immunfluoreszenz-Analysen. Mit Expressionsplasmiden transfizierte MRC-5-Zellen wurden für Luciferase Reporter Assays herangezogen.

Tabelle C.4: Verwendete humane Zellen

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle/Referenz
MRC-5	Primäre humane embryonale Lungenfibroblasten	European Collection of Cell Cultures Jacobs et al., 1970
TetR-IE1	MRC-5-abgeleitete Zellen; exprimieren induzierbar Wildtyp IE1	Knoblach et al., 2011
TetR-IE1 ₁₋₄₇₅	MRC-5-abgeleitete Zellen; exprimieren induzierbar ein um die CTD verkürztes IE1	Zenger (unveröffentlicht)
TetR-IE1d1373-386	MRC-5-abgeleitete Zellen; exprimieren induzierbar IE1 Δ AD1	Zenger (unveröffentlicht)
TetR-IE1d1395-409	MRC-5-abgeleitete Zellen; exprimieren induzierbar IE1 Δ S/P	Zenger (unveröffentlicht)
TetR-IE1d1421-445	MRC-5-abgeleitete Zellen; exprimieren induzierbar IE1 Δ AD2	Zenger (unveröffentlicht)
TetR-IE1d1451-475	MRC-5-abgeleitete Zellen; exprimieren induzierbar IE1 Δ AD3	Zenger (unveröffentlicht)
TetR-IE1d1373-420	MRC-5-abgeleitete Zellen; exprimieren induzierbar IE1 Δ AD1-S/P	Zenger (unveröffentlicht)
TetR-IE1d1421-475	MRC-5-abgeleitete Zellen; exprimieren induzierbar IE1 Δ AD2-AD3	Zenger (unveröffentlicht)
TetR-HA-IE1	MRC-5-abgeleitete Zellen; exprimieren induzierbar ein N-terminal HA-markiertes IE1	Marxreiter (unveröffentlicht)
TetR-HA-IE1CBM	MRC-5-abgeleitete Zellen; exprimieren induzierbar ein N-terminal HA-markiertes IE1K478A/H481A	Paulus (unveröffentlicht)
TetR	MRC-5-abgeleitete, IE1-negative Kontrollzellen	Knoblach et al., 2011
H1299	Humane Lungenkarzinomzelllinie	American Type Culture Collection Mitsudomi et al., 1992
KG-1	Humane CD34 ⁺ myeloide Leukämiezelllinie	Sinclair (University of Cambridge, UK) Koeffler und Golde, 1978

1.5 Viren

Die im Rahmen dieser Arbeit für Infektionen verwendeten Virus-Stämme sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet. Für diese Arbeit kam hauptsächlich das klinische hCMV-Isolat TB40/E mit endothelotropem Phänotyp (Sinzger et al., 2008) und davon abgeleitete rekombinante Virusmutanten und -revertanten zum Einsatz. Die verwendeten FIX-Viren kodieren für das enhanced green fluorescent protein (EGFP) unter der Kontrolle des Simian Virus (SV) 40-Promotors.

Tabelle C.5: Verwendete hCMV-Stämme

Bezeichnung	Beschreibung
TBwt	Klinisches Isolat TB40/E, Wildtyp
TBdIE1-1	IE1-Deletionsmutante des TB40/E-Stammes, Klon 1
TBdIE1-2	IE1-Deletionsmutante des TB40/E-Stammes, Klon 2
TBIE1 ₁₋₄₇₅ -1	CTD-Deletionsmutante des TB40/E-Stammes, Klon 1

Bezeichnung	Beschreibung
TBIE1 ₁₋₄₇₅₋₂	CTD-Deletionsmutante des TB40/E-Stammes, Klon 2
TBrvIE1	Revertante der TB40/E IE1-Deletionsmutante (Klon 1)
TBrvIE1 ₁₋₄₇₅	Revertante der TB40/E CTD-Deletionsmutante (Klon 1)
FXwt	Klinisches Isolat FIX, Wildtyp
FXdIE1	IE1-Deletionsmutante des FIX-Stammes
FXIE1 ₁₋₄₇₅	CTD-Deletionsmutante des FIX-Stammes
TNdIE1	IE1-Deletionsmutante des laboradaptierten Towne-Stammes

1.6 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zum immunologischen Nachweis von Proteinen durch Western Blot- (WB) und Immunfluoreszenz-Verfahren (IF), sowie zur Immunpräzipitation (IP) bzw. Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) eingesetzt.

Tabelle C.6: Verwendete Antikörper

Nr.*	Bezeichnung	Quelle	Eingesetzte Verdünnung/Menge
178	rt-anti-HA (3F10)	Roche, 1867423	1:1000 (WB)
180	m-anti-Flag (M2)	Sigma-Aldrich, F3165	1:500 (WB)
127	m-anti IE1/IE2	Millipore, MAB810R	1:1000 (WB), 10 µg (IP)
215	m-anti-IE1 (IE1 G10)	Abcam, ab30924	1:500 (IF)
216	m-anti-IE1 (6E1)	Santa Cruz, sc-69834	1:500 (IF)
77	rb-anti-GAPDH	Abcam, ab9485	1:1000 - 1:4000 (WB)
124	rb-anti-GFP	Abcam, ab290	1:2500 (IF)
40	rb-anti-H3	Abcam, ab1791	5 µg (ChIP)
42	rb-antiH2B	Abcam, ab1790	1:1000 - 1:5000 (WB)
128	rb-anti-H2A	Abcam, ab13923	1:250 (WB)
222	IgG aus m-Serum	Sigma-Aldrich, I-5381	10 µg (IP)
199	IgG aus rb-Serum	Sigma-Aldrich I-5006	5 µg (ChIP)
202	gt-anti-mIgG + HRP	Dianova, 115-036-003	1:10000 - 1:50000 (WB)
203	gt-anti-rbIgG + HRP	Millipore, AP156P	1:10000 - 1:50000 (WB)
223	gt-anti-rtIgG + HRP	Dianova 112-035-003	1:5000 - 1:25000 (WB)
204	gt-anti-mIgG + Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11001	1:1000 (IF)
205	gt-anti-mIgG + Alexa Fluor 594	Invitrogen, A11032	1:1000 (IF)
206	gt-anti-rbIgG + Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11008	1:1000 (IF)

Grüngraue Schattierung: monoklonale Antikörper, hellgrüne Schattierung: polyklonale Antikörper, dunkelgrüne Schattierung: Sekundärantikörper, Speziesbezeichnungen: gt = Ziege, m = Maus, rb = Kaninchen, rt = Ratte, IgG = Immunglobulin G, * Nummer in der Antikörper-Datenbank der Arbeitsgruppe

1.7 Nukleinsäuren

1.7.1 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden in der Regel in Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-gereinigter Form bezogen. Alle Oligonukleotidsequenzen sind in 5'→3'-Orientierung angegeben.

Tabelle C.7: Verwendete Oligonukleotide für die Herstellung prokaryotischer und eukaryotischer Expressionsplasmide

Nr.*	Sequenz	Verwendung
635	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCACCCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP-IE1 ₄₇₆₋₄₉₁
636	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGTGCTCTTGCCTCCG	
639	pGATCCGGAATGCGCCTGAGGTCGGGACGGAGCACCCGGCGGCCCTTAACGAGAGGAAGT TAAG	pEGFP-LANA ₅₋₂₂
640	pAATTCTTAACTTCTCTCGTTAAGGGCGCGCCGGTGCTCCGTCGGACCTCAGGCGCATT CG	
703	pGATCCGCCGGCAAGAGCACCCACCCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ G476A
704	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGTGCTCTTGCCGGCG	
705	pGATCCGGAGCCAAGAGCACCCACCCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ G477A
706	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGTGCTCTTGCTCCG	
707	pGATCCGGAGGCGCCAGCACCCACCCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ K478A
708	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGTGCTGGCGCCTCCG	
709	pGATCCGGAGGCAAGGCCACCCACCCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ S479A
710	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGTGGCCTTGCCTCCG	
711	pGATCCGGAGGCAAGAGCGCCACCCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ T480A
712	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGCGCTCTTGCCTCCG	
713	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCGCCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ H481A
714	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGGCGGTGCTCTTGCCTCCG	
715	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCACGCCATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ P482A
716	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATGGCGTGGGTGCTCTTGCCTCCG	
717	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCACCCCTGCCGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTA G	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ M483A
718	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACGGCAGGGTGGGTGCTCTTGCCTCCG	
719	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCACCCCTATGGCCACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ V484A
720	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTGGCCATAGGGTGGGTGCTCTTGCCTCCG	
721	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCACCCCTATGGTGGCCAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ T485A
722	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTGGCCACCATAGGGTGGGTGCTCTTGCCTCCG	
723	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCACCCCTATGGTGACTGCCAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ R486A
724	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTGGCAGTCACCATAGGGTGGGTGCTCTTGCCTCCG	
725	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCACCCCTATGGTGACTAGAGCCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ S487A
726	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGTGCTCTTGCCTCCG	
727	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCACCCCTATGGTGACTAGAAGCGCCGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ K488A
728	pAATTCTTACTGGTCAGCGGCGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGTGCTCTTGCCTCCG	
729	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCACCCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGGCGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ A489G
730	pAATTCTTACTGGTCGCCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGTGCTCTTGCCTCCG	
731	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCACCCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGCCAGTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ D490A
732	pAATTCTTACTGGGCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGTGCTCTTGCCTCCG	
733	pGATCCGGAGGCAAGAGCACCCACCCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACGCCTAAG	pEGFP/pGEX- IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ Q491A
734	pAATTCTTAGGCGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGTGCTCTTGCCTCCG	
737	pGATCCTAATGAAAGAGCACCCACCCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAG	pEGFP/pGEX- Stopp
738	pAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCATAGGGTGGGTGCTCTTTCATTAG	
145	CGCGGCAAGCTTGGATCCACCATGGAGTCCTCTGCC	pcDNA-HA- Konstrukte
146	GCGCGAAGCTTGAATTCTTACTGGTCAGCCTTG	
695	GATACTGAATTCTTAAGAGGCGGTGGGTTCTCAGCACC	pcDNA-HA- IE1 ₁₋₄₇₅

Nr.*	Sequenz	Verwendung
743	TCTCCTAGTGTGGATGACCTACGGGGAGGCAAGAGCACCCACCCTATGGTGACTA	pcDNA-HA-IE1dI373-475
744	AGAGCACCCACCCTATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTAAGAATTCGACTG	
747	TCCTAGTGTGGATGACCTACGG/ACTGTGTCTGTCAAGTCTGAGC	pcDNA-HA-IE1dI373-445
748	GCTCAGACTTGACAGACACAGT/CCGTAGGTCATCCACACTAGGA	
787	GGCAACTACTCCGCACGAGTCGGGGCC	pME-Flag-H2AE41A
788	GGCCCCGACTCGTGCGGAGTAGTTGCC	
789	GCAGCGGTGCTGGCATATCTGACGGCC	pME-Flag-H2AE56A
790	GGCCGTCAGATATGCCAGCACCGCTGC	
791	GAATATCTGACGGCCGCGATCTTAGAGCTAGCTG	pME-Flag-H2AE61A
792	CAGCTAGCTCTAAGATCGCGCCGTCAGATATTC	
793	GGCCGAGATCTTAGCGCTAGCTGGCAACG	pME-Flag-H2AE64A
794	CGTTGCCAGCTAGCGCTAAGATCTCGGCC	
795	CAACGCGGCTCGCGCCAATAAGAAGACCCG	pME-Flag-H2AD72A
796	CGGGTCTTCTTATTGGCGGAGCCGCGTTG	
797	CTAGCCATCCGCAACGCCGAGGAGCTAAATAAG	pME-Flag-H2AD90A; pME-Flag-H2AE61A/E64A/D90A
798	CTATTTAGCTCCTCGGCGTTGCGGATGGCTAG	
799	GCCATCCGCAACGACGCGGAGCTAAATAAGCTT	pME-Flag-H2AE91A
800	AAGCTTATTTAGCTCCGCGTCGTTGCGGATGGC	
801	ATCCGCAACGACGAGGCGCTAAATAAGCTTCTAG	pME-Flag-H2AE92A
802	CTAGAAGCTTATTTAGCGCCTCGTCGTTGCGGAT	
803	TGCCTAAGAAGACGGCGAGCCACCATAAGGC	pME-Flag-H2AE121A
804	GCCTTATGGTGGCTCGCCGCTTCTTAGGCA	
805	ATATCTGACGGCCGCGATCTTAGCGCTAGCTGGCAACG	pME-Flag-H2AE61A/E64A/D90A
806	CGTTGCCAGCTAGCGCTAAGATCGCGCCGTCAGATAT	
807	GCTAGCCATCCGCAACGCCGCGGCTAAATAAGCTTCTAGG	pME-Flag-H2AD90A/E91A/E92A
808	CCTAGAAGCTTATTTAGCGCCGCGGCTTGCAGGATGGCTAGC	
483	TTGCAAAGCTTATGGAGTCCTCTGCCAAGAGAAAG	pCMV-TetO.-Konstrukte
1085	GATACTGAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCACCCGAGGGTGGGTGCTCTTGCC	pCMV.TetO.IE1.M483A
1086	GATACTGAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTGCAGCCACCCGAGGGCGGTGCTCTGCCT CCAGAGG	pCMV.TetO.IE1NBM

p = Phosphatgruppe am C5 der Desoxyribose, * Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

Tabelle C.8: Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung neu generierter Expressionsplasmide

Nr.*	Sequenz	Verwendung
143	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	Sequenzierung von pGEX-Konstrukten
144	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	
194	CATGGTCTGCTGGAGTTCGTG	Sequenzierung von pEGFP-Konstrukten
202	GTGAAATTTGTGATGCTATTGC	
149	GGTGCGGCATAGAATCAAGG	Sequenzierung von pcDNA-HA-Konstrukten
164	CAATACACTTCATCTCCTCGAAAGG	
-	TAGAAGGCACAGTCGAGG [#]	
-	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG ⁺	

Nr.*	Sequenz	Verwendung
701	CAGAGCTCTCCCTATCAGT	Sequenzierung von pCMV.TetO-Konstrukten
1046	GTGGTATGGCTGATTATGATC	
784	CTCCTCAGTGGATGTTGC	Sequenzierung von pME-Flag-H2A-Konstrukten

Oligonukleotid BGHrev bzw † CMVfw von GeneArt, * Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

Tabelle C.9: Verwendete Oligonukleotide für die Herstellung neuer TB40/E-Bacmide

Nr.*	Sequenz	Verwendung
870	AGAGGAAGAGGAGGATGGTGCTGAGGAACCCACCCTCTTAAACATTGTGTGTAT ATATAGGATGACGACGATAAGTAGGG	pTBIE1 ₁₋₄₇₅
871	GGGATCCATAACAGTAACTGATATATACACACAATGTTTAAAGAGGTGGTGGGTTCCCT CAGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG	
876	AACGTGAATTCGTCCTGGCAGAACTCGGTAAGTCT	pUC-MIE
877	AACGTAAGCTTTTGTAGTAGGATTACAGAGTATAAC	
878	AAGTCCATGGCCTGACTGCAGCCATTGGTGGTCTTAGGGAAGGCTGAGTTCTTGG TAAAGAGGATGACGACGATAAGTAGGG	pUC-MIE-I-SceI-Kan
879	AAGTCCATGGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG	
880	AAACCTTTGAACAAGTGACCGAGGATTGCAACGAGAACCCCGAAAAAGATGTCCTG GCAGAACTCGGTAAGT	pTBrvIE1 ₁₋₄₇₅ , pTBrvIE1
881	ATAAGAAGACACGGGAGACTTAGTACGGTTTCACAGGCGTGACACGTTTATTGAGT AGGATTACAGAGTATA	

* Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

Tabelle C.10: Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung neu hergestellter TB40/E-Bacmide

Nr.*	Sequenz	Verwendung
927	GGCCGGTGCTACTGGAATCGATAC	Sequenzierung von pTBrvIE1 und pTBrvIE1 ₁₋₄₇₅
928	GGCCACGACGTTCTGCAGACTAT	
149	GGTGCGGCATAGAATCAAGG	
150	CTAAGACCACCAATGGCTGC	

* Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

Tabelle C.11: Verwendete Oligonukleotide für quantitative real-time PCR-Analysen

Nr.*	Bezeichnung	Sequenz	Temp. (°C)†	Zeit (s)‡	Produkt- länge (Bp)	PCR- Effizienz
363	TUBB-T	TATCAGCAGTACCAGGATGC	66-56	8	102	1,92
364		TGAGAAGCCTGAGGTGATG				
409	HBG-P	GCCTTGACCAATAGCCTTGACA	68	10	187	1,85
410		GAAATGACCCATGGCGTCTG				
494	RPL30-T	CAAGGCAAAGCGAAATTGGT	66-56	8	73	1,95
495		GCCCGTTCAGTCTCTTCGATT				
498	Sat2	ATCGAATGAAAATGAAAGGAGTCA	66-56	10	160	1,82
499		GACCATTGGATGATTGCAGTCA				
539	CXCL10-P	AGGGAAATTCGTAACCTGGA	66-56	10	180	1,9 [#]
540		TCAGAAAACGTGGGGCTAGT				
612	TAP1-P	GCAGGCCACTTTTGGAAAGTA	66-56	10	119	1,9 [#]
613		GGAAAGTCCCAGGAACAGG				
759	RPPH1-T	CAGCGAAGTGAGTTCAATGG	66-56	8	83	1,99
765		AATGGGCGGAGGAGAGTAGT				

Nr.*	Bezeichnung	Sequenz	Temp. (°C)†	Zeit (s)‡	Produktlänge (Bp)	PCR-Effizienz
84	MIE-P	CTTACGGGACTTTCCTACTTG	58	15	284	1,87
85		CGATCTGACGGTTCACTAA				
294	UL54-P	CACCAAAGACACGTCGTT	66-56	8	71	1,95
295		GTCCTTTGCGACCAGAAT				
471	UL123-T	TCCCTAAGACCACCAATG	66-56	8	64	1,9 [#]
472		GAGCACTGAGGCAAGTTC				
475	UL122-T	CCAGTATGCACCAGGTGTTAG	60	8	74	1,9 [#]
476		CTGGATGCCCTTGTTGTTTC				
523	UL32-P	AGTGTTGTTGCGGGTCTG	66-56	8	116	1,9 [#]
524		TCATCCACAACCTCGGTGA				
753	LUNA-T	GATGCGGGTTCGACTGCGTG	66-56	8	110	1,94
754		TGCGTACCGCGGCAGACATC				
1035	TR	ACACCTCCGACGTCCACTAT	66-56	8	62	1,9 [#]
1036		ATGTGTAAACGGCGTGGTC				
1073	UL138-T	ATGCGCACCAAGTTGAAG	68-56	8	63	1,9 [#]
1074		GATCGTGGCCATTCTCTG				

Hellgrüne Schattierung: Primer für zelluläre Gene, dunkelgrüne Schattierung: Primer für virale Gene, P = Promotor, T = transkribierter Bereich, † Hybridisierungstemperatur, ‡ Polymerisationszeit, # PCR-Effizienz wurde nicht bestimmt, sondern ein Faktor von 1,9 angenommen, * Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

Tabelle C.12: Verwendete Oligonukleotide für Gen- und Strang-spezifische cDNA-Synthesen

Nr.*	Sequenz	Verwendung
364	TGAGAAGCCTGAGGTGATG	β-Tubulin-spezifische cDNA-Synthese
472	GAGCACTGAGGCAAGTTC	IE1-spezifische cDNA-Synthese

* Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

1.7.2 Plasmide und Bacmide

1.7.2.1 Gebrauchsfertige Plasmide und Bacmide

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgelisteten Plasmide lagen bereits gebrauchsfertig in der Arbeitsgruppe vor und wurden für die Expression von Proteinen in Bakterien und humanen Zellen, für Luciferase Reporter Assays sowie für Klonierungszwecke eingesetzt. Die angegebenen Bacmide kamen bei der Herstellung von Viruspräparationen und als Ausgangskonstrukte für die Generierung neuer Bacmide zum Einsatz.

Tabelle C.13: Verwendete, gebrauchsfertige Plasmide und Bacmide

Nr.*	Bezeichnung	Verwendung	Quelle/Referenz
29	pGEX-KG	Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine in <i>E. coli</i>	Guan und Dixon, 1991
764	pGEX-IE1	Expression von GST-IE1 in <i>E. coli</i>	Paulus et al., 2006
773	pGEX-IE1 ₁₋₄₇₅	Expression von GST-IE1 ₁₋₄₇₅ in <i>E. coli</i>	Mücke, 2010

Nr.*	Bezeichnung	Verwendung	Quelle/Referenz
774	pGEX-IE1 ₄₇₆₋₄₉₁	Expression von GST-IE1 ₄₇₆₋₄₉₁ in <i>E. coli</i>	Mücke, 2010
775	pGEX-LANA ₅₋₂₂	Expression von GST-LANA ₅₋₂₂ in <i>E. coli</i>	Mücke, 2010
533	pcDNA-HA-N	Expressionsvektor für HA-Fusionsproteine in Säugerzellen	Krauss et al., 2009
628	pcDNA-HA-IE1dI373-386	Expression von HA-IE1ΔAD1 in Säugerzellen	Krauss et al., 2009
629	pcDNA-HA-IE1dI395-409	Expression von HA-IE1ΔS/P in Säugerzellen	Krauss et al., 2009
630	pcDNA-HA-IE1dI421-445	Expression von HA-IE1ΔAD2 in Säugerzellen	Krauss et al., 2009
631	pcDNA-HA-IE1dI451-475	Expression von HA-IE1ΔAD3 in Säugerzellen	Krauss et al., 2009
632	pcDNA-HA-IE1dI373-420	Expression von HA-IE1ΔAD1-S/P in Säugerzellen	Krauss et al., 2009
633	pcDNA-HA-IE1	Expression von HA-IE1 in Säugerzellen	Krauss et al., 2009
344	pSG5-HA-IE1 ₁₋₄₇₅	Expression von HA-IE1 ₁₋₄₇₅ in Säugerzellen	Huh et al., 2008
470	pSG5-HA-IE1dI421-475	Expression von HA-IE1ΔAD2/AD3 in Säugerzellen	Huh et al., 2008
35	pEGFP-C1	Expressionsvektor für EGFP-Fusionsproteine in Säugerzellen	Clontech
80	pEGFP-IE1	Expression von EGFP-IE1 in Säugerzellen	Nevels et al., 2004
419	pME-Flag-H2A	Expression von Flag-H2A in Säugerzellen	Shiio und Eisenman, 2003
976	pME18S	Leerer Kontrollvektor	Shiio und Eisenman, 2003
695	pCMV.TetO.IE1	Expression von IE1 in Säugerzellen	Knoblach et al., 2011
817	pCMV-TetO.IE1 ₁₋₄₇₅	Expression von IE1 ₁₋₄₇₅ in Säugerzellen	Zenger (unveröffentlicht)
226	pcDNA-HA-SUMO1-GG #2	Zielvektor für die Herstellung neuer pcDNA-HA-Konstrukte	Tatham et al., 2001
473	pEGFP-TNIE1	Matrize für die Amplifizierung der DNA-Fragmente IE1M483A und IE1NBM	Krauss et al., 2009
688	pCMV.TetO.cICPO	Zielvektor für die Herstellung neuer pCMV.TetO-Konstrukte	Everett (University of Glasgow, UK)
830	pLKO.DCMV.Tet.cIE1dI421-475	Matrize für die Amplifizierung des IE1ΔAD2-AD3 DNA-Fragments	Zenger (unveröffentlicht)
105	pGL3-UL112plusATF	Firefly Luciferase Reporterplasmid mit hCMV UL112-Promotor	Shenk (University of Princeton, USA)
354	pGL3-Control	Firefly Luciferase Reporterplasmid mit SV40-Promotor	Promega
20	pUC18	Zielvektor für die Herstellung des Transfer-Konstrukts pUC-MIE-I-SceI-Kan	Fermentas
726	pLAY2	Matrize für die Amplifizierung der I-SceI-Kan-Kassette	Tischer et al., 2006
241	pTBdIE1-1	Herstellung von TBdIE1-1 Viruspräparationen und des Bacmids TBvIE1	Zalckvar et al., 2013
242	pTBdIE1-2	Herstellung von TBdIE1-2 Viruspräparationen	Zalckvar et al., 2013
285	TB40/E BAC4 (pTBwt)	Herstellung von TBwt Viruspräparationen und der Bacmide pTBIE1 ₁₋₄₇₅₋₁ und pTBIE1 ₁₋₄₇₅₋₂	Sinzger et al., 2008

* Nummer in der Plasmid-Datenbank der Arbeitsgruppe

1.7.2.2 Herstellung neuer Plasmide und Bacmide

1.7.2.2.1 Allgemeines

Soweit nicht anders angegeben wurden für Klonierungszwecke Standardmethoden (Ausubel et al., 1988; Green und Sambrook, 2012) angewendet. Phusion Polymerase, Nukleotide, Restriktionsenzyme, Bovines Serum Albumin (BSA), Calf

Intestinal Alkaline Phosphatase und Quick T4 DNA Ligase wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen und mit den empfohlenen Puffern nach Herstellerangaben verwendet. RNase (DNase frei, aus Rinder Pankreas) wurde von der Firma Roche bezogen. Zur Reinigung von Restriktionsenzym-verdauten PCR-Produkten und Zielvektoren aus Agarosegelen wurde das QIAEX II Gel Extraktion Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben herangezogen. Zur Säulen-Reinigung von PCR-Produkten hingegen diente das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Für Plasmid-Präparationen im kleinen Maßstab wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Bacmid-Präparationen im kleinen Maßstab erfolgten mittels alkalischer Schnelllyse und Phenol-Chloroformextraktion nach Standardprotokollen (Ausubel et al., 1988; Green und Sambrook, 2012). Plasmid- bzw. Bacmid-Präparationen im großen Maßstab wurden mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) bzw. NucleoBond Xtra BAC Kit (Macherey & Nagel) durchgeführt.

Tabelle C.7 beinhaltet alle Oligonukleotide, die für die Generierung von Expressionsplasmiden, Tabelle C.9 diejenigen, die für die Herstellung neuer Bacmide verwendet wurden. Die Sequenzierungen neuer Konstrukte im Bereich des Fremdgens wurden von der Firma GeneArt, mit den in Tabelle C.8 und Tabelle C.10 angegebenen Primern vorgenommen.

1.7.2.2.2 Herstellung neuer eukaryotischer Expressionsplasmide

Zur Generierung der Plasmide pCMV.TetO.IE1M483A und pCMV.TetO.IE1NBM wurden die jeweiligen mutierten IE1-Fragmente über PCR mit dem Plasmid pEGFP-TNIE1 (80) als Matrize und den Oligonukleotiden 483 und 1085 bzw. 483 und 1086 amplifiziert und über HindIII- und EcoRI-Schnittstellen in das pCMV.TetO.cICP0-Plasmid eingefügt. Auf diese Weise wurde das cICP0-Insert durch die jeweils mutierte IE1-Sequenz ersetzt.

Für die Herstellung neuer pcDNA-HA-Konstrukte wurde zunächst das Insert aus dem Plasmid pcDNA-HA-SUMO1-GG #2 (226) mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI ausgeschnitten. Das im Anschluss gereinigte Plasmid-Rückgrat diente als Zielvektor für verschiedene mutierte IE1-Sequenzen.

Um das Plasmid pcDNA-HA-IE1dl421-475 zu generieren wurde die verkürzte IE1-Sequenz über PCR mit dem Plasmid pLKO.DCMV.Tet.cIE1dl421-475 (830) als Matrize und dem Primerpaar 145/146 amplifiziert und über EcoRI- und BamHI-Restriktionsschnittstellen in den oben genannten Zielvektor eingefügt. Der Expressionsvektor pcDNA-HA-IE1₁₋₄₇₅ wurde auf ähnliche Weise erzeugt. Das um die CTD verkürzte IE1-Fragment wurde über PCR mit dem Plasmid pcDNA-HA-IE1 (633) und dem Primerpaar 145/695 hergestellt und mit dem EcoRI- und BamHI-verdauten Zielvektor ligiert. Für die Generierung von pcDNA-HA-IE1dl373-475 wurde zunächst

mit dem Plasmid pcDNA-HA-IE1 (633) und den Oligonukleotiden 145 und 743 ein PCR-Produkt amplifiziert, das wiederum als Matrize für eine zweite PCR mit den Oligonukleotiden 145 und 744 diente. Das so entstandene mutierte IE1-Fragment wurde schließlich ebenfalls über EcoRI- und BamHI-Restriktionsschnittstellen in den Zielvektor pcDNA-HA eingefügt.

Das IE1-Fragment mit interner Deletion für das Plasmid pcDNA-HA-IE1dI373-445 wurde mittels „Fusions-PCR“-Mutagenese (Ho et al., 1989) generiert. Als äußere Primer dienten die Oligonukleotide 145 und 146. Die Einführung der Mutation erfolgte durch die Mutagenese-Oligonukleotide 747 und 748. Zunächst wurden ein langes PCR-Produkt mit dem Primerpaar 145/748 und pcDNA-HA-IE1 (633) als Matrize sowie ein kurzes PCR-Produkt mit demselben Plasmid als Matrize und dem Primerpaar 747/146 amplifiziert. Da die Mutagenese-Oligonukleotide kurze komplementäre Bereiche aufweisen, erhielten die beiden Teilfragmente (langes und kurzes PCR-Produkt) überlappende Enden, über die sie in einer finalen PCR mit den äußeren Primern 145 und 146 fusioniert werden konnten. Das so hergestellte Fusionsprodukt wurde wiederum via EcoRI- und BamHI-Schnittstellen mit dem Zielvektor ligiert.

Die Herstellung der Plasmide, die für Flag-markierte H2A Varianten mit einer Aminosäure-Substitution (E41A, E56A, E61A, E64A, D72A, D90A, E91A, E92A und E121A) bzw. mit drei Aminosäure-Substitutionen (E61A/E64A/D90A und D90A/E91A/E92A) kodieren, erfolgte mittels ortsgerichteter QuickChange[®]-Mutagenese (Stratagene) nach Herstellerangaben. Als Ausgangskonstrukt hierfür diente pME-Flag-H2A (419). Die gewünschte Mutation wurde durch komplementäre Primer mit integrierter Mutation eingefügt. Hierzu wurden die Oligonukleotidpaare 787/788 bis 807/808 herangezogen.

Für die Herstellung von pEGFP-IE1₁₋₄₇₅ wurden zunächst die Oligonukleotide 635 und 636 zu Doppelsträngen zusammengelagert, wobei Einzelstrangüberhänge entstanden. Diese zusammengelagerten Oligonukleotide wurden anschließend über BglII- und EcoRI-Schnittstellen mit dem pEGFP-C1-Plasmid (35) ligiert. Analog dazu wurden pEGFP-Konstrukte erzeugt, die für EGFP-CTD-Varianten kodieren, bei denen je ein Aminosäure-Austausch in der CTD vorgenommen wurde (G476A, G477A, K478A, S479A, T480A, M481A, P482A, M483A, V484A, T485A, R486A, S487A, K488A, A489G, D490A und Q491A). Hierfür wurden jeweils paarweise die Oligonukleotide 703/704 bis 733/734 verwendet. Als Kontrollplasmid wurde das Konstrukt pEGFP-Stopp, bei dem die ersten beiden Basen-Triplets der CTD durch Stopp-Codons ausgetauscht wurden, mit Hilfe der Oligonukleotide 737 und 738 hergestellt. Gleichmaßen wurde pEGFP-LANA₅₋₂₂ generiert, wobei die

Oligonukleotide 639 und 640 zu Doppelsträngen zusammengelagert und mit dem BglII- und EcoRI-verdauten pEGFP-C1-Plasmid ligiert wurden.

1.7.2.2.3 Herstellung neuer prokaryotischer Expressionsplasmide

Für die Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden ausschließlich der bakterielle Expressionsvektor pGEX-KG (29) und davon abgeleitete Expressionsvektoren verwendet. Neue pGEX-Plasmide, die für GST-CTD-Varianten mit einer Aminosäure-Substitution innerhalb der CTD kodieren, wurden analog zu den entsprechenden pEGFP-Konstrukten, unter Verwendung derselben Oligonukleotide hergestellt (siehe oben). Dies gilt auch für das Kontrollplasmid pGEX-Stopp. Jedoch erfolgte die Ligation der zu Doppelsträngen zusammengelagerten Oligonukleotide mit dem pGEX-Vektor über BamHI- und EcoRI-Restriktionsschnittstellen.

1.7.2.2.4 Herstellung neuer TB40/E-Bacmide mittels *en passant*-Mutagenese

Für die Herstellung neuer rekombinanter hCM-Viren wurden zunächst neue pTB-Bacmide mittels BAC-Mutagenese erzeugt. Da in ein Bacmid bis zu 300 Kb DNA kloniert werden können ist es möglich, das gesamte hCMV-Genom als Bacmid in *E. coli* einzubringen. Verschiedenste Mutationen können nun durch homologe Rekombination eingeführt werden. Ein besonders elegantes System zur genetischen Manipulation von Bacmiden ist die sogenannte *en passant*-Mutagenese, die von Karsten Tischer und Kollegen vorgestellt wurde (Tischer et al., 2006, 2010). Die Besonderheit hierbei ist, dass nach erfolgter Mutagenese keine ungewollten Fremd-DNA-Sequenzen im mutierten Bacmid zurückbleiben, wie es beispielsweise bei *frt*- oder *loxP*-basierten Techniken der Fall ist. Die *en passant*-Mutagenese erfolgt im *E. coli*-Stamm GS1783 (siehe Tabelle C.3), der vom EL250-Stamm abgeleitet ist und, genau wie dieser, für die Temperatur-induzierbaren λ -Phagen-Gene Exo, Beta und Gam kodiert, welche für die homologe Rekombination (Red Rekombination) benötigt werden. Das Protein Gam inhibiert dabei den *E. coli*-eigenen RecBCD-Helikase-Nuklease Komplex, der sonst elektroporierte lineare DNA abbauen würde, die zur homologen Rekombination benötigt wird. Die Proteine Exo und Beta wiederum stellen die Rekombinationsfunktion. Exo lagert sich zu Homotrimeren zusammen, durch deren 5'-3' Exonuklease-Aktivität 3' Einzelstrangüberhänge in der elektroporierten linearen DNA erzeugt werden. Diese Einzelstrangüberhänge werden wiederum von dem Protein Beta gebunden, dadurch vor Abbau geschützt und schließlich mit der komplementären Zielsequenz gepaart. Im Gegensatz zur früheren BAC-Mutagenese Strategie (allelic exchange), bei der noch lange (ca. 1 Kb) homologe Sequenzabschnitte für die Rekombination benötigt wurden, sind für die Red Rekombination kurze (30 bis 50 Bp) homologe Sequenzbereiche ausreichend.

Das im EL250-Stamm enthaltene Arabinose-induzierbare *flp*-Gen, wurde im GS1783-Stamm durch ein Gen ersetzt, welches für die Homing-Endonuklease I-SceI aus *Saccharomyces cerevisiae* kodiert. Das Enzym I-SceI hat eine 18 Bp lange Erkennungssequenz, die in Genom-Sequenzen nur sehr selten vorkommt (TAGGGATAACAGGGTAAT).

Die *en passant*-Mutagenese besteht im Prinzip aus zwei nacheinander ablaufenden Red Rekombinationen (Tischer et al., 2010). Abbildung C.1 zeigt das Prinzip der Herstellung des pTBIE₁₋₄₇₅ mittels *en passant*-Mutagenese im Detail.

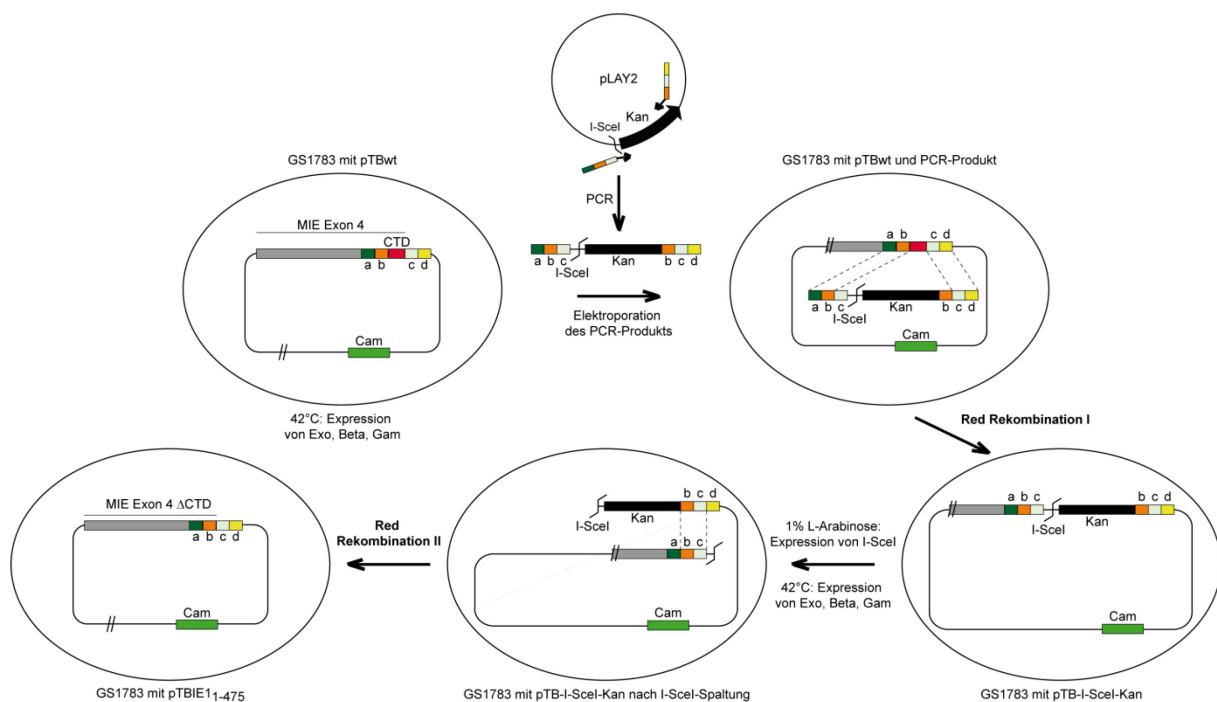


Abbildung C.1: Schematische Darstellung der Herstellung des pTBIE₁₋₄₇₅-Bacmids. Zur Amplifizierung der I-SceI-Schnittstelle und der Kan-Resistenzkassette wurden Primer verwendet, deren 5'-Enden ca. 40 Bp Homologien zur viralen Zielsequenz (a+b bzw. c+d) aufweisen. Zusätzlich beinhalten die Primer 20 Bp lange Sequenz-Verdoppelungen (c bzw. b), durch die das PCR-Produkt intramolekulare homologe Bereiche erhält (b+c). Der *E. coli*-Stamm GS1783, welcher das pTBwt-Bacmid sowie alle nötigen Rekombinationsenzyme enthält, wurde mit dem amplifizierten PCR-Produkt elektroporiert. Durch die erste homologe Rekombination (Red Rekombination I) wurde die IE1-CTD-Sequenz durch das PCR-Produkt ersetzt und das Bacmid pTB-I-SceI-Kan erzeugt. Durch Expression des I-SceI-Enzyms entstehen doppelsträngige DNA-Enden. Die durch das PCR-Produkt eingefügte Sequenzhomologie „stromauf“ und „-abwärts“ der I-SceI-Kan-Kassette (b + c) ermöglicht die intramolekulare Rekombination (Red Rekombination II) zwischen den beiden DNA-Enden. Dadurch wird die I-SceI-Kan-Kassette vollständig eliminiert und das fertige pTBIE₁₋₄₇₅ erzeugt.

Zunächst wurden elektrokompente GS1783-Bakterien hergestellt, die das pTBwt-Bacmid (285) tragen (Green und Sambrook, 2012), wobei die Expression von Exo, Beta und Gam bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,65 durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C für 15 min induziert wurde. Zur Herstellung des linearen PCR-Produkts für die erste homologe Rekombination wurden das Plasmid pLAY2 (726) als Matrize und das Primerpaar 870/871 verwendet. Die Primer enthalten ca. 40 Bp homologe Sequenzen „stromauf-“, bzw. „stromabwärts“ der zu deletierenden IE1-CTD-Sequenz (a+b bzw.

c+d). Die Besonderheit der Primer besteht darin, dass sie zusätzlich ca. 20 Bp lange Sequenz-Verdoppelungen (c bzw. b) aufweisen. Dadurch werden im PCR-Produkt intramolekulare homologe Bereiche (a+b+c und b+c+d) erzeugt, welche die I-SceI-Schnittstelle und die Kan-Resistenzkassette einklammern.

Die elektrokompetenten GS1783-pTBwt-Zellen wurden mit 100 ng des DpnI-verdauten, Säulen-gereinigten und Kan-Resistenz-vermittelnden PCR-Produkts transformiert (Ausubel et al., 1988; Green und Sambrook, 2012) und für 36-48 h bei 30°C auf LB-Cam-Kan-Platten (LB-Medium (Green und Sambrook, 2012) mit 1,5% [w/v] Bacto-Agar, 25 µg/ml Kanamycin, 20 µg/ml Chloramphenicol) inkubiert. Durch die erste Red Rekombination entstand ein hCMV-Bacmid, das anstelle der IE1-CTD-Sequenz die I-SceI-Schnittstelle gefolgt von der Kan-Resistenzkassette und die flankierenden Sequenz-Wiederholungen (b bzw. c) trägt. Zur Überprüfung des neu erzeugten rekombinanten pTBIE₁₋₄₇₅-I-SceI-Kan-Bacmids wurde ein EcoRI-Restriktionsverdau durchgeführt und mit dem ebenfalls EcoRI-verdauten pTBwt-Bacmid verglichen (Daten nicht gezeigt).

Als Voraussetzung für die zweite Red Rekombination wurde durch Zugabe von Arabinose die Expression der Endonuklease I-SceI induziert, wodurch die Spaltung der I-SceI-Schnittstelle im Bacmid erfolgte und zwei doppelsträngige DNA Enden mit homologen Sequenzbereichen (b+c) entstanden. Diese wiederum stellen das Substrat für die zweite, intramolekulare Red Rekombination dar. Dazu wurden 100 µl einer LB-Cam-Übernachtskultur (LB-Medium mit 20 µg/ml Chloramphenicol) in 4 ml frischem LB-Cam-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 bei 30°C kultiviert. Nach Zugabe von einem Volumen LB-Cam-Medium mit 2% [w/v] L-Arabinose wurden die Kulturen 1 h bei 30°C weiter geschüttelt (220 rpm). Für die anschließende Red Rekombination wurde wiederum die Expression von Exo, Beta und Gam durch eine Temperaturerhöhung auf 42°C für 30 min induziert. Schließlich wurde die Bakteriensuspension für 2 h bei 30°C weiter kultiviert. Durch diese zweite homologe Rekombination wurde sowohl die I-SceI-Schnittstelle, als auch die Kan-Resistenzkassette vollständig eliminiert, wodurch das Bacmid pTBIE₁₋₄₇₅ ohne jegliche Fremd-DNA-Sequenzen entstand. Schlussendlich wurden 100, 10 und 1 µl der Bakteriensuspension auf LB-Cam-Platten mit 1% [w/v] L-Arabinose ausplattiert und bei 30°C bebrütet. Die Bakterienkolonien wurden neben ihrer Cam-Resistenz auch hinsichtlich ihrer Kan-Sensitivität getestet. Das neu generierte rekombinante pTBIE₁₋₄₇₅-Bacmid wurde ebenfalls mittels EcoRI-Restriktionsanalyse überprüft (siehe Abbildung D.14).

Um ungewollte genetische Veränderungen im neu hergestellten pTBIE₁₋₄₇₅ und im bereits in der Arbeitsgruppe vorhandenen pTBdIIIE1 (241) auszuschließen, wurden

Bacmide generiert, bei denen die deletierten Bereiche der MIE-Region wieder eingefügt wurden. Für die Insertion dieser größeren Sequenzbereiche musste zunächst ein Transfer-Konstrukt hergestellt werden (Abbildung C.2). Dazu wurde der zu insertierende Bereich der MIE-Region in einer PCR mit dem pTBwt-Bacmid (285) als Matrize und dem Primerpaar 876/877 amplifiziert, welches mittels HindIII- und EcoRI-Schnittstellen in das pUC18-Plasmid insertiert wurde, wodurch das Plasmid pUC-MIE entstand. Als nächstes wurde eine Restriktionsschnittstelle gewählt, die genau einmal im pUC-MIE-Plasmid ca. in der Mitte des MIE-Inserts schneidet. Über diese Schnittstelle wurde ein zweites PCR-Produkt in den pUC-MIE-Vektor eingebracht, das die für die *en passant*-Mutagenese essentiellen Bestandteile aufweist: Die kurze Sequenz-Wiederholung (a) gefolgt von der I-SceI-Schnittstelle und der Kan-Resistenzkassette. Die Sequenz-Verdoppelung (a) entspricht einem 50 Bp langem Sequenzabschnitt „stromabwärts“ der NcoI-Schnittstelle in der MIE-Sequenz. Dieses zweite PCR-Produkt wurde mit pLAY2 (726) als Matrize und dem Primerpaar 878/879 amplifiziert und schließlich über die NcoI-Schnittstelle mit dem pUC18-MIE-Plasmid ligiert, um das fertige Transfer-Konstrukt pUC-MIE-I-SceI-Kan zu erzeugen. In diesem Konstrukt sind also die I-SceI-Schnittstelle und die Kan-Resistenzkassette wiederum von homologen Bereichen (a) eingeklammert, was später die Eliminierung aus dem mutierten Bacmid ermöglicht (Red Rekombination II). Zur Herstellung des linearen PCR-Produkts für die erste Red Rekombination, wurden schließlich das fertige Transfer-Konstrukt und das Primerpaar 880/881 verwendet. Die Primer enthalten homologe Sequenzen „stromaufwärts“ bzw. „stromabwärts“ des deletierten Bereiches im pTBdIE1-Bacmid.

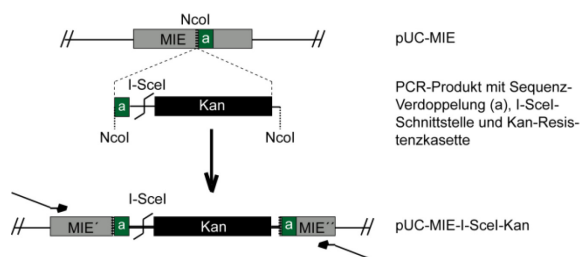


Abbildung C.2: Generierung des Transfer-Konstrukts pUC-MIE-I-SceI-Kan. Der zu insertierende Bereich der MIE-Region wurde mittels PCR amplifiziert und in das pUC18-Plasmid eingebracht (pUC-MIE). Ein zweites PCR-Produkt, das die Sequenz-Verdoppelung (a), die I-SceI-Schnittstelle und die Kan-Resistenzkassette aufweist, wurde über die einzige NcoI-Schnittstelle im MIE-Insert mit dem pUC-MIE-Plasmid ligiert. Für die erste Red Rekombination wurde das MIE-I-SceI-Kan-Fragment über PCR amplifiziert, wobei die verwendeten Primer 40 Bp Homologien zur viralen Zielsequenz aufwiesen.

GS1783-Bakterien, die das pTBdIE1- bzw. das pTBIE1₁₋₄₇₅-Bacmid enthielten, wurden mit dem DpnI-verdauten, Säulen-gereinigten PCR-Produkt elektroporiert. Alle weiteren Schritte entsprachen denen der Herstellung des pTBIE1₁₋₄₇₅ (siehe oben). Die generierten Bacmide pTBvIE1 und pTBvIE1₁₋₄₇₅ wurden nicht nur mittels EcoRI-Restriktionsverdau analysiert (siehe Abbildung D.14), sondern zusätzlich im Bereich der Insertion sequenziert.

2 Standard Zellkultur-Methoden

2.1 Kultivierung humaner Zellen

Alle humanen Zellen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% [v/v] CO₂ kultiviert.

Die Säugerzelllinien H1299 und MRC-5 wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; 4 mM L-Glutamin, 4,5 mg/ml D-Glucose, 110 mg/l Natriumpyruvat) mit 10% [v/v] fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) gezogen.

MRC-5-Zellen mit integriertem Tetracyclin-Repressor (TetR) und Tetracyclin-Operon wurden bis zum Beginn eines Experiments in DMEM-Vollmedium mit 300 µg/ml G418 Sulfat und 1 µg/ml Puromycin selektioniert. Die Induktion der IE1-Expression durch Doxycyclin erfolgte entweder 24 h vor Beginn eines Experiments durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin zum Kulturmedium oder 72 h vor Beginn eines Experiments, wobei in diesem Fall alle 24 h je 0,33 µg/ml Doxycyclin zum Kulturmedium gegeben wurden.

Um MRC-5- oder MRC-5-abgeleitete Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus zu arretieren, wurden diese im konfluenten Zustand entweder für sieben Tage ohne Erneuern des Mediums oder für zwei Tage in Serum-reduziertem (0,5% [v/v] FKS) Medium kultiviert.

Adhärente Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturschale abgelöst und im Verhältnis 1:2 bis 1:3 (MRC-5- und MRC-5-abgeleitete Zellen) bzw. 1:10 bis 1:20 (H1299) subkultiviert (Ausubel et al., 1988).

KG-1-Suspensionszellen wurden in RPMI-Medium (4,5 g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 2 g/l Natriumhydrogencarbonat) mit 10% [v/v] FKS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) in einer Dichte von 4×10^5 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Zellkulturflaschen gezogen.

Gegebenenfalls wurden KG-1-Zellen vor der Infektion mit hCMV für 24 h in RPMI-Medium ohne FKS-Zusatz in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml kultiviert.

Die Selektion TB40/E-infizierter KG-1-Zellen erfolgte ab 24 h nach Infektion. Dazu wurden die Zellen sedimentiert und in einem Kulturvolumen Selektionsmedium (RPMI-Medium mit 10% [v/v] dialysiertem, Nukleotid-freiem FKS [Life Technologies], 25 µM Mycophenolsäure und 100 µM Xanthin) resuspendiert (Falkner und Moss, 1988; Mulligan und Berg, 1981). Das Selektionsmedium wurde alle zwei Tage erneuert.

2.2 Transfektion humaner Zellen

Für Coimmunpräzipitationen bzw. *in vitro*-Bindungsstudien wurden $1,5 \times 10^6$ H1299-Zellen in 10 cm-Kulturschalen ausgesät. Die Transfektion erfolgte 24 h später durch Kalzium-Phosphat-Präzipitation (Graham und van der Eb, 1973) mit insgesamt 10 µg Plasmid. Für Immunfluoreszenzanalysen wurden 2×10^5 H1299-Zellen in 6-well-Platten ausgesät und 24 h später mit 5 µg Plasmid (entspricht einem halben Transfektions-Ansatz) transfiziert.

Für Luciferase Reporter Assays wurden MRC-5-Zellen im Verhältnis 1:1,6 in 12-well-Platten ausgesät. Nach 23 h wurde der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und das Kulturmedium durch Opti-MEM[®]-Medium (Life Technologies) ersetzt. Die Transfektion der MRC-5-Zellen erfolgte 1 h nach Mediumwechsel durch Lipofektion mit dem Lipofectamin[™] 2000-Reagenz (Life Technologies) nach Herstellerangaben. Pro Ansatz wurden 1,2 µg Reporterplasmid und 400 ng Effektorplasmid transfiziert. Gegebenenfalls wurden parallel MRC-5-Zellen in 6-well-Platten transfiziert, um die Expression der verschiedenen Effektorproteine zu überprüfen.

3 Infektionsexperimente in MRC-5- und KG-1-Zellen

3.1 Virusrekonstitution

Zur Herstellung von TB40/E-Virusstocks wurden MRC-5- bzw. induzierte TetR-IE1-Zellen (IE1-Deletionsmutanten) mit den verschiedenen pTB-Bacmiden transfiziert. Dies geschah mittels Elektroporation wie bereits beschrieben (Knoblach, 2010). Die Zellen wurden mehrfach subkultiviert, bis sie einen deutlichen zytopathischen Effekt zeigten. Dann wurden die infizierten Zellen in Kulturgefäße verteilt, die konfluent mit MRC-5 bzw. induzierten TetR-IE1-Zellen bewachsen waren. Nach frühestens 96 h wurde der virushaltige Kulturüberstand abgenommen, zur Abtrennung abgestorbener Zellen zentrifugiert (6000 x g, 15 min, 4°C) und in geeigneten Aliquots bei -80°C gelagert. Die Anzahl infektiöser Partikel in den Präparationen wurde mittels Plaque-Test (TBwt-Präparation) auf MRC-5-Zellen wie beschrieben (Knoblach, 2010) ermittelt, sowie durch die Quantifizierung zellassoziierter Virusgenome (siehe C 4.1).

3.2 Infektion humaner Zellen

Für die Infektion von humanen Zellen mit hCMV wurde zunächst die benötigte Menge an Virusstock bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zur Vereinzelnung der Virionen im Becherresonator des Branson-Sonifier 450 beschallt (duty cycle: 80%, output

control: 8, 10 Pulse). Anschließend wurde die Virussuspension zentrifugiert (3300 x g, 5 min) und der virushaltige Überstand für die Infektion verwendet.

Adhärente MRC-5-Zellen wurden für 2 h mit der Virussuspension inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum von den Zellen abgesaugt und durch frisches Vollmedium ersetzt.

KG-1-Suspensionszellen wurden bei Erreichen einer Dichte von 8×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml sedimentiert (300 x g, 10 min) und in der Virussuspension resuspendiert, sodass eine Zelldichte von $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml vorlag. Die Virusverdünnung wurde zuvor mit 30 µg/ml Polybrene versetzt. Das Gemisch aus Zellen und Virussuspension wurde in 6-well-Platten überführt (4 ml/well) und für 2 h bei RT oder 37°C zentrifugiert (1200 x g). Schließlich wurde der Überstand von den sedimentierten Zellen entfernt und durch 5 ml RPMI-Vollmedium ersetzt. Um die Infektionsrate bei Bedarf zu verbessern, wurde 24 h nach Infektion mit der Selektion auf Zellen mit transkriptionell aktiven viralen Genomen begonnen (siehe C 2.1). Diese Zellen wurden schließlich nach 24-stündiger Kultivierung in Selektionsmedium reinfiziert.

3.3 HCMV-Wachstumskurven und -Endpunkttiter

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden konfluente MRC-5-Zellen in 12-well-Platten mit den zu untersuchenden Viruspräparationen in Duplikaten infiziert (siehe C 3.2). Bei Infektion mit hoher Multiplizität (hohe moi, ~ 3 PFU/Zelle) wurde das Kulturmedium jeden Tag erneuert, bei Infektion mit niedriger Multiplizität (niedrige moi, $\sim 0,003$ PFU/Zelle) alle zwei Tage. Der abgenommene Überstand wurde im Branson-Sonifier 450 beschallt (duty cycle: 80%, output control: 8, 10 Pulse) und zentrifugiert (3300 x g, 5 min, 4°C). Aus 200 µl des Kulturüberstandes wurde virale DNA mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) isoliert und mittels qPCR (siehe C 4.3) quantifiziert. Der restliche Überstand wurde bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Endpunkttiter wurden die geernteten Überstände von Tag 7 (hohe moi) bzw. Tag 16 (niedrige moi) nach Infektion herangezogen. Die Ermittlung der Titer erfolgte mittels Plaque-Assay wie bereits beschrieben (Knoblach, 2010) in 12-well-Platten. Dazu wurden die virushaltigen Überstände mit Kulturmedium von 10^{-3} bis 10^{-8} bzw. 10^0 bis 10^{-5} (IE1-Deletionsmutanten) logarithmisch verdünnt und auf MRC-5-Zellen bzw. komplementierenden TetR-IE1-Zellen (IE1-Deletionsmutanten) titriert. Die IE1-Expression in den TetR-IE1-Zellen wurde 24 h vor Infektion mit Doxycyclin induziert.

4 Nukleinsäure-Methoden

4.1 Quantifizierung zellassoziierter viraler DNA

Für die Quantifizierung infektiöser Partikel in den verschiedenen TB40/E-Viruspräparationen wurden MRC-5-Zellen in 12-well-Platten in Triplikaten für 2 h infiziert (siehe C 3.2). Nach zweimaligem Waschen des Zellrasens mit PBS wurden die Zellen über Nacht in Anwesenheit von 1,4 mM Phosphonoessigsäure weiter kultiviert. Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese in Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37°C inkubiert, um extrazellulär assoziierte Viruspartikel zu entfernen und gleichzeitig die Zellen von der Kulturschale abzulösen. Durch Zugabe von DMEM-Vollmedium wurde die Reaktion abgestoppt, die Zellen sedimentiert (2500 x g, 1 min, 4°C), der Überstand komplett verworfen und die Gesamt-DNA in den Proben mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert.

Zur Quantifizierung intrazellulärer viraler DNA in infizierten KG-1-Suspensionszellen wurden diese sedimentiert (300 x g, 8 min) und wie oben beschrieben zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nach Zugabe von RPMI-Vollmedium wurden die Zellen erneut sedimentiert und nochmals mit PBS gewaschen. Die Aufreinigung der Gesamt-DNA erfolgte anhand des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben.

Die Quantifizierung der viralen und zellulären DNA in den Proben erfolgte mittels qPCR (siehe C 4.3).

4.2 Isolierung von RNA und reverse Transkription in Einzelstrang-DNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus infizierten Suspensions-Zellen wurden diese zunächst sedimentiert und das Zellpellet in 350 µl RLT-Puffer resuspendiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen), einschließlich eines on column DNase-Verdaus (Qiagen), nach Herstellerangaben. Um DNA-Kontaminationen in den RNA-Proben möglichst vollständig zu eliminieren, wurde das TURBO DNA-free™ Kit (Ambion) nach Angaben des Herstellers herangezogen. Im Anschluss wurden die Proben mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit (Quiagen) konzentriert, sodass schließlich pro Probe 12 µl RNA-Lösung für die cDNA-Synthese zur Verfügung standen.

Die Generierung der cDNA erfolgte mit Hilfe des AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Agilent) nach Herstellerangaben. Für die IE1-spezifische cDNA-Synthese wurden 5 µl RNA und 100 ng Primer 472 (Tabelle C.12) eingesetzt, ebenso

für Kontrollen ohne das Enzym Reverse Transkriptase (Minus-RT). Für die β -Tubulin (TUBB)-spezifische cDNA-Synthese wurden 2 μ l RNA und 100 ng Primer 364 (Tabelle C.12) eingesetzt. Falls Gesamt-mRNA in cDNA umgeschrieben werden sollte, wurden 2 μ l RNA und im Kit enthaltene Oligo(dT)-Primer verwendet. Für die Synthese der Erststrang-cDNA wurden die Proben zunächst 5 min bei 42°C und anschließend 1 h bei 50°C inkubiert.

4.3 Quantitative real-time PCR

Die Quantifizierung verschiedener DNA und cDNA Proben erfolgte mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) mit dem Light Cycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit (Roche) in einem LightCycler-Gerät (Roche LightCycler 1.5 Instrument) wie bereits vielfach beschrieben (Krauss, 2007; Knoblach, 2010; Nitzsche, 2010). Die für qPCR-Analysen verwendeten Primer-Paare sind in Tabelle C.11, zusammen mit der jeweiligen Hybridisierungstemperatur, Elongationszeit, PCR-Effizienz und Amplikonlänge angegeben.

Für die absolute Quantifizierung intrazellulärer hCMV-Genome wurde folgende Formel verwendet:

$$2 \times [(36,575 - CP_v) / 3,4833] / [(37,214 - CP_z) / 3,5249]$$

CP = crossing point value, Zykluszahl bei Einsetzen der linearen Produktzunahme

v = virales Zielgen

z = zelluläres Zielgen

Die Formel wurde aus einer Standardkurve ermittelt, für deren Erstellung qPCR-Analysen mit definierten Kopien des Plasmids pCR-RPPH1-UL54P als Matrize und dem viralen Primerpaar UL54P (294/295) bzw. dem zellulären Primerpaar RPPH1 (759/765) durchgeführt wurden. Der RPPH1-Lokus wurde ausgewählt, da es sich hierbei um ein zelluläres Einzelkopiegen handelt. Die Standardkurve ergibt sich aus der Auftragung aufsteigender Plasmid-DNA-Mengen gegen den daraus resultierenden CP-Wert. Aufgrund des diploiden Chromosomensatzes eukaryotischer Zellen wird der Faktor 2 in die Formel mit einbezogen.

4.4 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung

Sondenherstellung: Für die Herstellung der, mit Alexa Fluor 488-markierten Bacmid-Sonde wurden zunächst 10 μ g pTBwt-DNA in Anwesenheit von 0,5 μ g/ml RNase (DNase frei, aus Rinder Pankreas; Roche) und 100 μ g/ml BSA (NEB) mit dem Restriktionsenzym PacI (NEB) linearisiert. Zur Aufreinigung der linearisierten Bacmid-DNA wurde diese zunächst zweimal mit je einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; AppliChem) und einmal mit einem

Volumen Chloroform (Merck), unter Verwendung von 1,5 ml Phase Lock Gel Heavy-Gefäßen (Eppendorf) extrahiert. Die Fällung der DNA erfolgte mit 2,5 Volumen Ethanol $\geq 99,8\%$ (Merck), 20 μg Glykogen sowie 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) bei -20°C über Nacht. Die präzipitierte DNA wurde sedimentiert (20000 x g, 30 min, 4°C), zweimal mit je 1 ml 70% [v/v] Ethanol gewaschen (16000 x g, 15 min, RT), das Pellet in der Sterilbank getrocknet und schließlich in 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ gelöst.

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten, soweit möglich, lichtgeschützt. Zur Markierung der linearisierten Bacmid-DNA mit Alexa Fluor 488-5-dUTPs (Life Technologies) wurde ein 50 μl Reaktionsansatz bestehend aus 1 μg Bacmid-DNA, 5 μl 40 U/ml DNase I (NEB), 1,5 μl 10000 U/ml DNA Polymerase I (aus *E. coli*; NEB), 1,5 μl 1 mM ChromaTide Alexa Fluor 488-5-dUTP, 4 μl 0,5 mM dATP/dCTP/dGTP (NEB), 5 μl 0,1 mM dTTP (NEB), 5 μl 0,1 M DTT, und 5 μl 10 x Nick Translations Puffer hergestellt, der bei 15°C für 2 h inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA und durch Erhitzen des Ansatzes für 10 min auf 65°C abgestoppt. Anschließend wurden unverbrauchte dNTPs von den nunmehr Fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten mit Hilfe von Quick Spin DNA Columns (Roche) nach Herstellerangaben abgetrennt. Der Markierungsansatz wurde nun zum Fällern der DNA mit 10 μg Cot-1 DNA (Life Technologies), 20 μg Lachs-Sperma DNA (Roche) und 2,5 Volumen Ethanol $\geq 99,8\%$ gemischt, über Nacht bei -20°C inkubiert und die präzipitierte DNA anschließend sedimentiert (20000 x g, 30 min, 4°C). Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml 70% Ethanol wurde das Pellet in der Sterilbank vollständig getrocknet und in 12,5 μl $>99\%$ entionisiertem Formamid (Ambion) bei 37°C unter schütteln für 2 h gelöst. Schließlich wurde ein Volumen einer Dextransulfat-Lösung zugegeben, der Ansatz für weitere 10 min bei 37°C geschüttelt und mehrfach auf- und abpipettiert. Direkt vor der Verwendung wurde SDS in einer Endkonzentration von 0,1% [w/v] zugefügt und der fertige Hybridisierungsansatz zentrifugiert (16000 x g, 10 min, RT).

Chromosomenpräparation: Für die Präparation von Metaphase-Chromosomen wurden hCMV- und mock-infizierte MRC-5-Zellen in 10 cm-Kulturschalen 2 h nach Infektion kurz mit PBS, anschließend für genau 1 min mit einem Kulturvolumen Zitratpuffer und daraufhin erneut kurz mit PBS gewaschen, um extrazelluläre Viruspartikel zu entfernen. Um die Anzahl an mitotischen Zellen in der Kultur zu erhöhen, wurden die Zellen vor der Ernte über Nacht mit frischem Medium kultiviert, das mit 0,025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ N-Desacetyl-N-Methylcolchicine (KaryoMAX[®] Colcemid[™] Lösung in PBS; Life Technologies) versetzt war. Für die Ernte der Zellen wurde ein paar Mal mit der Hand gegen den Rand der Kulturschale geklopft, das Kulturmedium

anschließend fünfmal vorsichtig über den Zellrasen pipettiert und schließlich in einem 15 ml-Reaktionsgefäß gesammelt, bevor die Zellen erst zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mit 5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturschale abgelöst wurden. Die resuspendierten Zellen wurden mit dem gesammelten Kulturmedium vereint und sedimentiert (250 x g, 10 min, RT). Zur möglichst quantitativen Zellernte wurde die Kulturschale mit 10 ml PBS nachgewaschen, die Waschlösung zum Zellpellet gegeben und die Zentrifugation wiederholt. KG-1-Suspensionszellen hingegen wurden sedimentiert (181 x g, 10 min, RT), erst einmal mit PBS und anschließend für genau 1 min mit 4 ml Zitratpuffer gewaschen, um extrazelluläre Viruspartikel zu entfernen. Nach Neutralisation mit 11 ml einer 0,1 M Natriumzitat-Lösung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde der Überstand abgegossen und das Pellet durch vorsichtiges Schnippen an die Gefäßwand vollständig resuspendiert. Zum Schwellen der Zellen wurden diese tropfenweise mit 1 ml einer auf 37°C vorgewärmten, hypotonen KCl-Lösung (0,075 M) unter ständigem leichtem Schütteln versetzt, anschließend zügiger mit weiteren 4 ml. Die Zellen wurden nun für genau 17 min bei 37°C inkubiert, erneut sedimentiert (250 x g, 10 min, 4°C), das Pellet durch vorsichtiges Schnippen resuspendiert und die Zellen mit einer frisch hergestellten, eiskalten Fixativ-Lösung fixiert. Dafür wurde erst 1 ml der Fixativ-Lösung tropfenweise unter stetem Schütteln zu den Zellen gegeben, danach zügiger weitere 4 ml und die Suspension für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Zum Waschen der Zellen wurden diese sedimentiert (300 x g, 10 min, 4°C), das Pellet wie oben beschrieben vorsichtig resuspendiert und 7,5 ml Fixativ-Lösung zugegeben. Insgesamt wurden die Zellen viermal gewaschen, bevor sie in Fixativ-Lösung im Kühlschrank auf Eis aufbewahrt wurden.

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen wie oben beschrieben viermal mit frischer, eiskalter Fixativ-Lösung gewaschen und auf saubere, staubfreie SuperFrost Plus-Objektträger aufgebracht. Dafür wurde der Überstand nach dem letzten Waschschrift abgegossen und die Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit durch Schnippen vorsichtig resuspendiert. Durch Zugabe eines geeigneten Volumens (50 bis 400 µl) Fixativ-Lösung wurde eine leicht trübe Suspension hergestellt. Im Anschluss wurden ca. 100 µl dieser Zellsuspension mit einer Pasteurpipette aufgesaugt und auf einen Objektträger gespritzt, welcher kurz zuvor durch Anhauchen mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm überzogen worden war. Im Anschluss wurden die Präparate bei RT getrocknet. Durch das Verdunsten des Methanols zerplatzt die Zytoplasmamembran und die Metaphase-Chromosomen breiten sich auf dem Objektträger aus. Die Präparate wurden nun mit 400 µl einer RNase-

Verdünnung (DNase frei, aus Rinder Pankreas; Roche; 10 µg/ml in 2 x SSC) unter einem großen Deckgläschen (24 x 60 mm; Carl Roth) für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert, nachfolgend dreimal für 5 min mit 2 x SSC und einmal für 2 min in 0,01 M HCl (Fulka) gewaschen. Zum Verdau von Proteinen wurden die Präparate für 15 min bei 37°C in einer Pepsin-Lösung inkubiert. Es folgten ein kurzer Waschschrift mit H₂O_{bid}, sowie zwei Waschschrift mit 2 x SSC für je 5 min. Zum Dehydratisieren der Zellkerne wurden die Präparate anschließend für je 10 min nacheinander in 70% [v/v], 80% [v/v], 90% [v/v] und ≥99,8% Ethanol (Ethanolreihe) getaucht und schließlich für 10 min bei 55°C auf einem Heizblock getrocknet.

Denaturierung der DNA und Hybridisierung: Alle weiteren Arbeitsschritte wurden soweit möglich lichtgeschützt durchgeführt. Die Denaturierung der Sonden-DNA und der DNA auf den Objektträgern erfolgte entweder gleichzeitig oder getrennt voneinander. Bei gleichzeitiger Denaturierung wurden zunächst 22 µl der zentrifugierten Hybridisierungs-Lösung vorsichtig auf die getrockneten Präparate getropft, ein großes Deckgläschen luftblasenfrei aufgebracht und die Präparate mit Fixogum verschlossen. Nach dem Trocknen des Fixogums wurden diese, zum Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge, in einer GeneAmp In Situ PCR Maschine (Perkin Elmer) für exakt 3 min bei 75°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte direkt im Anschluss in einer Metallbox im 37°C Wasserbad für ca. 16 h. Alternativ wurde die DNA auf den Objektträgern in geeigneten Glasgefäßen, gefüllt mit 75 ml einer frisch hergestellten Denaturierungs-Lösung (pH-Wert auf 7,0 einstellen) für genau 2 min bei 72°C im Wasserbad denaturiert. Es wurden maximal vier Objektträger gleichzeitig inkubiert. Sofort danach wurden die Präparate erneut einer Ethanolreihe (siehe oben) unterzogen, wobei die verschiedenen Ethanolverdünnungen auf -20°C vorgekühlt waren. Schließlich wurden die Präparate in der Sterilbank getrocknet. Parallel wurde die Sonden-DNA für 4 min bei 99°C im Heizblock denaturiert, direkt danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zentrifugation wurden, wie oben beschrieben, je 22 µl des Hybridisierungsansatzes auf den getrockneten Objektträgern verteilt und die Präparate mit einem Deckgläschen und Fixogum verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte wie oben beschrieben.

Stringenz-Waschungen, DAPI-Färbung und Konservierung der Präparate: Nach der Hybridisierung wurde der Fixogum entfernt und die Präparate in 2 x SSC geschüttelt, bis sich die Deckgläschen lösten. Im Anschluss folgten drei Waschschrift für je 5 min in einer frisch hergestellten Formamid-Waschlösung (pH-Wert auf 7,0 einstellen) bei 42°C, fünf Waschschrift für je 2 min in 2 x SSC bei 60°C und ein

Waschschritt für 2 min in einer Tween 20-Waschlösung bei 42°C. Nach einer kurzen Equilibrierung in PBS, wurde die DNA auf den Präparaten mit einer 4,6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)-Lösung für 15 min gefärbt, die Präparate erneut kurz in PBS gewaschen und einer Ethanolreihe (RT) unterzogen. Das Trocknen der Präparate erfolgte wiederum für 10 min bei 55°C. Schlussendlich wurden 60 µl SlowFade Gold Reagenz (Life Technologies) vorsichtig auf die Kerne gegeben, Präzisions-Deckgläser (24 x 50 mm, Dicke: 0,17 mm +/- 0,005 mm; Carl Roth) luftblasenfrei aufgebracht und die fertigen Präparate mit Nagellack verschlossen.

Dokumentation: Die Übersichtsaufnahmen der FISH-Präparate wurden an dem Epifluoreszenz-Mikroskop Keyence BZ 9000 (Generation II) mit dazugehörigem Software Programm BZ II Analyzer generiert. Die Detailaufnahmen hingegen entstanden an einem Leica TCS SP8 Konfokal-Mikroskop, das mit einem 405 Dioden-Laser/Photomultiplier Tube (PMT)-Dektector (DAPI), einem Argon-Laser/Hybrid-Detektor (Alexa 488) und der Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) 3.1.0 Software ausgestattet ist. Zur weiteren Bearbeitung der aufgenommenen Bilder diente die Adobe Photoshop CS4 Software.

5 Protein-Methoden

5.1 Allgemeines

Bei allen Protein-Methoden wurde, wenn nicht explizit anders angegeben, mit eiskalten Puffern und Lösungen, sowie auf Eis oder bei 4°C gearbeitet. Zur Inhibition prokaryotischer Proteasen wurde der cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-frei) der Firma Roche herangezogen; zur Inhibition eukaryotischer Proteasen der Protease Inhibitor Cocktail (Set III) der Firma Calbiochem. Als Phosphatase Inhibitor diente der ebenfalls von Calbiochem bezogene Phosphatase Inhibitor Cocktail (Set V). Die Dosierung der Inhibitoren erfolgte entsprechend der Angaben der Hersteller.

5.2 Luciferase Reporter Assay

Nach Transfektion von MRC-5-Zellen in Duplikaten (siehe C 2.2) und 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen in den Vertiefungen der 12-well-Platte mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 250 µl 1 x Passive Lysis Buffer (Promega) und 15-minütigem Schütteln des Kulturgefäßes bei RT. Anschließend wurde das Zelllysats quantitativ in ein 1,5-ml Reaktionsgefäß überführt und die Zelltrümmer sedimentiert (16100 x g, 1 min, RT). Je 20 µl des Zelllysats wurden in

ein durchsichtiges 5 ml Polystyrol Rundbodenröhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 100 µl Luciferase-Assay-Reagenz (Promega) erfolgte die Messung der Lichtemission im Luminometer (Lumat LB 9507; Berthold Technologies).

5.3 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Für die Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurde der Zellrasen zunächst zweimal mit DMEM gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber (Costar) in DMEM mit Protease Inhibitoren abgekratzt und das Kulturgefäß dreimal mit DMEM nachgespült. Anschließend wurden die vereinten Zellsuspensionen zentrifugiert (2500 x g, 10 min) und das Medium komplett entfernt. Die sedimentierten Zellen wurden in dem, für den jeweiligen Versuch geeigneten Puffer lysiert.

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakten aus 6×10^5 infizierten oder transfizierten MRC-5-Zellen wurde jedes Zellpellet in 30 µl MIPA-Puffer mit Protease und Phosphatase Inhibitoren gründlich resuspendiert und für 30 min inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden sedimentiert (20000 x g, 30 min) und der Überstand mit einem Volumen 2 x Proteinauftragspuffer versetzt.

Für Chromatinimmunpräzipitationen wurden die Zellen vor der Ernte durch Zugabe von 1% Formaldehyd (Thermo Scientific) zum Kulturüberstand für 10 min bei 37°C fixiert. Für Coimmunpräzipitationen erfolgte die Fixierung für 10 min bei RT, wobei die Kulturen zuvor für 10 min auf RT gebracht wurden. Zum Abstoppen der Quervernetzungs-Reaktionen wurden 125 mM Glycin zugegeben und die Kulturen für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

5.4 Chromatinimmunpräzipitation

Für die Bestimmung der Nukleosomen-Okkupanz am viralen Genom in Abhängigkeit verschiedener IE1-Varianten, wurden wachstumsarretierte Kontrollzellen (TetR-Zellen) und Zellen, die Doxycyclin-induzierbar das Wildtyp-IE1 Protein (TetR-IE1-Zellen) bzw. verschiedene IE1-Varianten exprimieren (siehe Tabelle C.4) verwendet. Diese wurden mit einem IE1-defizienten hCMV-Stamm (TNdIE1) mit einer moi von ca. 0,5 PFU/Zelle infiziert. Pro Ansatz wurden die Zellen einer 15 cm-Kulturschale 72 h nach Doxycyclin-Behandlung und 8 h nach Infektion eingesetzt. Die ChIP wurde im Wesentlichen wie in Nitzsche et al., 2008 beschrieben durchgeführt. Die Zellen eines Ansatzes wurden wie unter C 5.3 beschrieben fixiert, geerntet und anschließend in 500 µl ChIP-SDS-Lysepuffer mit Protease Inhibitoren resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation erfolgte das Fragmentieren des Chromatins durch Beschallung im Bioruptor (Diagenode; Energieeinstellung: H (hoch), 30 s an/30 s

aus) für dreimal 5 min. Unlösliche Bestandteile wurden daraufhin sedimentiert (20000 x g, 10 min). Jeder Ansatz wurde in drei IP-Proben geteilt und 1:10 mit ChIP-Verdünnungspuffer versetzt. Außerdem wurde ein Aliquot des Lysats als input-Probe abgenommen, ein weiteres wurde für Western Blot-Analysen (siehe C 5.10) entnommen und mit 2 x Proteinauftragungspuffer versetzt. Die IP-Ansätze wurden zur Reduzierung des unspezifischen Hintergrundes mit 75 µl Protein A-Agarose/Lachs Sperma DNA für 30 min drehend inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (100 x g, 1 min) wurde der Überstand abgenommen und mit polyklonalem H3 Antikörper oder rbIgG (siehe Tabelle C.6) versetzt und über Nacht unter Drehen inkubiert. Nach Zugabe von 60 µl Protein A-Agarose/Lachs Sperma DNA wurden die Proben erneut 1 h drehend inkubiert. Anschließend wurde die Agarose-Matrix sedimentiert und fünfmal mit vier verschiedenen Waschpuffern in der Reihenfolge ChIP-Niedrigsalzpuffer, ChIP-Hochsalzpuffer, ChIP-LiCl-Puffer und TE-Puffer (2 x) gewaschen. Zur Reinigung der DNA wurden sowohl die IP-Proben (output-Proben) als auch die gefällten input-Proben mit 100 µl einer 10%-igen [w/v] Chelex 100 (Bio-Rad) Suspension versetzt und wie in Knoblach, 2010 beschrieben weiter prozessiert. Der Anteil coimmunpräzipitierter DNA an eingesetzter Gesamt-DNA wurde mittels qPCR (siehe C 4.3) ermittelt.

Um eine mögliche CTD-abhängige Wechselwirkung zwischen IE1 und dem viralen Genom mittels ChIP zu untersuchen, wurden wachstumsarretierte TetR-Zellen sowie TetR-HA-IE1- bzw. TetR-HA-IE1CBM-Zellen (siehe Tabelle C.4) verwendet. Diese wurden mit einem IE1-defizienten hCMV-Stamm (TBdlIE1) mit einer moi von ca. 2 PFU/Zelle infiziert. Pro Ansatz wurden die Zellen einer 15 cm-Kulturschale 72 h nach Doxycyclin-Behandlung und 8 h nach Infektion eingesetzt. Das oben beschriebene ChIP-Protokoll wurde wie folgt modifiziert: Die fixierten Zellen wurden in 1 ml FastChIP-Puffer mit Protease Inhibitoren lysiert, das sedimentierte Chromatin (12000 x g, 1 min) im selben Puffer einmal gewaschen und anschließend wie oben beschrieben fragmentiert. Zur Entfernung von unspezifisch an Agarose bindendem Material wurden pro Ansatz 75 µl Maus IgG-Agarose verwendet, die zuvor über Nacht mit 0,2 µg/µl Lachs-Sperma DNA (Roche) inkubiert worden war. Nach Sedimentation der Agarose-Matrix (100 x g, 1 min) wurde der Überstand in zwei IP-Proben aufgeteilt und zwei Aliquots als input-Proben abgenommen. Zum immunologischen Nachweis (siehe C 5.10) der IE1-Proteine wurde ein weiteres Aliquot abgenommen und mit 2 x Proteinauftragungspuffer versetzt. Da die exprimierten IE1-Proteine eine amino-terminale HA-Fusion besitzen, wurden für die spezifische IP pro Ansatz 60 µl Anti-HA-Agarose verwendet, die zuvor ebenfalls über Nacht mit Lachs-Sperma DNA inkubiert worden war (siehe oben). Als Negativkontrolle diente wiederum Maus IgG-

Agarose/Lachs-Sperma DNA. Alle fünf Waschschritte wurden mit FastChIP-Puffer durchgeführt. Die Reinigung der DNA erfolgte mit Chelex 100 (siehe oben).

5.5 Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Die Produktion von GST-Fusionsproteinen für *in vitro*-Bindungsstudien erfolgte im *E. coli*-Stamm Rosetta (siehe Tabelle C.3). Ein Einzelklon, transformiert mit pGEX-KG oder mit einem pGEX-abgeleiteten Expressionsvektor, wurde in LB-Medium in Gegenwart von 50 µg/ml Ampicillin, 20 µg/ml Chloramphenicol und 2% [w/v] Glukose über Nacht bei 28°C und 220 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension mit frischem Medium ohne Glukose auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und für 2 bis 3 h bei 28°C und 220 rpm weiterkultiviert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression des Fremdgens durch Zugabe von 200 µM Isopropyl β-D-Thiogalactosid induziert und die Bakterien für 3 h (GST, GST-LANA₅₋₂₂ und GST-IE1₄₇₆₋₄₉₁-Varianten) bzw. 6 h (GST-IE1 und GST-IE1₁₋₄₇₅) bei 28°C weiter geschüttelt, bevor diese schließlich geerntet wurden (2558 x g, 15 min). Die sedimentierten Bakterien wurden in 1/5 Kulturvolumen GST-Waschpuffer mit Protease Inhibitoren resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 1/6 Kulturvolumen (bei Produktion im 125 ml-Maßstab) bzw. in einem Kulturvolumen (bei Produktion im 1 ml-Maßstab) desselben Puffers aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Nach dem Auftauen wurde die Bakteriensuspension zunächst mit 150 µg/ml Lysozym und 25 U/ml Benzonase (Novagen) versetzt und 30 min inkubiert. Die anschließende Bakterienlyse erfolgte durch Ultraschallbehandlung in Rosettgläßchen mit der Makro-Sonde eines Branson Sonifier 450 (duty cycle: 80%, output control: 2,5; 1 min an/1 min aus) für 10 min (bei Produktion im 125 ml-Maßstab) oder in 15 ml-Reaktionsgefäßen im Eiswasserbad eines Bioruptors (Diagenode; Energieeinstellung: H (hoch), 30 s an/30 s aus) für 15 min (bei Produktion im 1 ml-Maßstab). Nach dem Aufschluss wurden unlösliche Bakterienbestandteile sedimentiert (20000 bis 30600 x g, 30 min) und die Überstände mit einem geeigneten Volumen 20% [v/v] Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 1% [v/v] Triton X-100 eingestellt. Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde die Affinitätsmatrix Glutathion-Sepharose[™] 4B verwendet. Diese wurde vor Gebrauch zunächst zweimal in 10 Bettvolumen GST-Equilibrierungs-Puffer gewaschen, für 1 h in 10 Bettvolumen GST-Equilibrierungs-Puffer mit 2% [w/v] BSA blockiert, erneut in 10 Bettvolumen Equilibrierungs-Puffer gewaschen und in einem Bettvolumen desselben Puffers aufgenommen. Anschließend wurden die Bakterienlysate mit je 50 µl der vorbereiteten Matrix pro 1 ml Lysat für 2 h über Kopf gedreht. Die Affinitätsmatrix

mit den gebundenen Fusionsproteinen wurde sedimentiert (500 xg, 5 min) und viermal mit mindestens 10 Bettvolumen Waschpuffer in der Reihenfolge GST-Niedrigsalzpuffer (2 x), GST-Hochsalzpuffer (1 x) und erneut einmal mit GST-Niedrigsalzpuffer gewaschen. Alle Waschpuffer waren mit Protease Inhibitoren versetzt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die mit rekombinatem Protein beladene Glutathion-Sepharose mit einem Bettvolumen GST-Niedrigsalzpuffer überschichtet und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank auf Eis gelagert.

5.6 Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine aus H1299-Zellen

Die Produktion von HA-Fusionsproteinen für *in vitro*-Bindungsstudien erfolgte in H1299-Zellen. Etwa 48 h nach Transfektion (siehe C 2.2) mit den gewünschten Expressionsplasmiden wurden die H1299-Zellen geerntet (siehe C 5.3) und die Zellpellets in 1 ml CoIP-Lysepuffer mit Protease Inhibitoren resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation wurden unlösliche Bestandteile sedimentiert (20000 x g, 30 min) und der Überstand mit Maus IgG-Agarose für 1 h drehend inkubiert. Nach Zentrifugation (20000 x g, 10 min) wurde der Überstand mit Anti-HA-Agarose oder, für Negativkontrollen, mit Anti-Flag-Agarose (je 20 µl Bettvolumen) für 1 h unter Drehen inkubiert. Die Protein-beladene Matrix wurde sedimentiert (1000 x g, 1 min), dreimal mit 1 ml CoIP-Lysepuffer mit Protease Inhibitoren gewaschen und im selben Puffer bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank auf Eis gelagert.

5.7 Säureextraktion von Histonen für *in vitro*-Bindungsstudien

Histone wurden in der Regel aus unbehandelten H1299-Lungenkarzinomzellen mittels Säureextraktion gereinigt. Das Zellpellet einer konfluent bewachsenen 15 cm-Kulturschale wurde vollständig in 1 ml hypotonem Lysepuffer mit Protease Inhibitoren resuspendiert. Unter Mischen (Vortexer, Stufe 6,5) wurden weitere 4 ml des hypotonen Lysepuffers zugegeben und das Lysat für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die isolierten Zellkerne sedimentiert (500 x g, 5 min) und zweimal, wie oben beschrieben, mit demselben Puffer gewaschen (ohne die fünfminütige Inkubation dazwischen). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellkerne in 1 ml 0,2 M H₂SO₄ resuspendiert und für 16 h drehend inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden sedimentiert (20000 x g, 30 min), 900 µl Säureextrakt zur Fällung der Histone mit 300 µl 100%-iger Trichloressigsäure (Sigma-Aldrich) versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden sedimentiert (20000 x g, 15 min), zunächst mit 1 ml Aceton mit

0,05 M HCl, anschließend mit 1 ml reinem Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Histonpellet wurde in einem geeigneten Volumen (675 bzw. 1000 µl) CoIP-Lysepuffer mit Protease Inhibitoren aufgenommen, im Becherresonator eines Branson Sonifier 450 beschallt (duty cycle: 80%, output control: 8, 10 Pulse) und anschließend mehrmals auf- und abpipettiert.

Für die Extraktion von Histonen aus mit pME-FLAG-H2A und davon abgeleiteten Expressionvektoren transfizierten H1299-Zellen, wurde das oben beschriebene Protokoll leicht modifiziert. Das Zellpellet einer 10 cm-Kulturschale wurde in 1 ml FastChIP-Puffer mit Protease Inhibitoren lysiert, 5 min inkubiert und das sedimentierte Chromatin (12000 x g, 1 min) im selben Puffer einmal gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 300 µl 0,2 M H₂SO₄ resuspendiert und auf Grund der schlechten Löslichkeit im Becherresonator eines Branson Sonifier 450 beschallt (duty cycle: 80%, output control: 8, 10 Pulse). Alle weiteren Schritte wurden, wie oben beschrieben, mit angepassten Volumina durchgeführt. Jedes Histonpellet wurde schließlich in 250 µl CoIP-Lysepuffer mit Protease Inhibitoren gelöst.

5.8 *In vitro*-Bindungsstudien

Für *in vitro*-Bindungsstudien wurden die an Glutathion-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteine (siehe C 5.5) oder die mit Anti-HA-Agarose immobilisierten HA-Fusionsproteine (siehe C 5.6) mit säureextrahierten Histonen (siehe C 5.7) inkubiert. Die Histonextrakte wurden vor Verwendung nochmals zentrifugiert (20000 x g, 30 min) um unlösliche Bestandteile zu sedimentieren. Je 20 µl Bettvolumen der Protein-beladenen Glutathion-Sepharose wurden zur Equilibrierung zweimal mit 1 ml CoIP-Lysepuffer mit Protease Inhibitoren gewaschen. Die immobilisierten GST- bzw. HA-Fusionsproteinen wurden je nach Experiment mit 200 bis 900 µl Histonextrakt versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde ein Aliquot als input-Probe abgenommen und mit 2 x Proteinauftragspuffer versetzt. Der restliche Bindungsansatz wurde für 90 min drehend inkubiert. Nach der Bindungsreaktion wurden die Proben viermal im größtmöglichen Volumen CoIP-Waschpuffer mit Protease Inhibitoren gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand komplett entfernt und ein geeignetes Volumen 1 x Proteinauftragspuffer zur Matrix gegeben (output-Proben). Sowohl die input- als auch die output-Proben wurden für 8 min bei 95°C erhitzt. Schließlich wurden die Proben zentrifugiert (16162 x g, 5 min), der Überstand mit den freigesetzten Proteinen abgenommen und in die SDS-PAGE (siehe C 5.10) eingesetzt.

5.9 Coimmunpräzipitation

Für Coimmunpräzipitationen (CoIPs) wurden transfizierte H1299-Zellen einer 10 cm-Kulturschale (siehe C 2.2) oder wachstumsarretierte TetR-, TetR-IE1- und TetR-IE1₁₋₄₇₅-Zellen (siehe Tabelle C.4) einer 15 cm-Kulturschale eingesetzt. Circa 48 h nach Transfektion bzw. 78 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet (siehe C 5.3). Das fixierte Zellpellet wurde in 1 ml FastChIP-Puffer mit Protease Inhibitoren resuspendiert und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (12000 x g, 1 min), das Pellet in 1 ml FastChIP-Puffer gewaschen und schließlich in 1 ml desselben Puffers resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurde das Lysat dreimal 5 min im Bioruptor (Diagenode; Energieeinstellung: H (hoch), 30 s an/30 s aus) beschallt, um Nukleosomen zu solubilisieren. Im Anschluss wurden unlösliche Bestandteile sedimentiert (20000 x g, 30 min) und der Überstand mit 100 µl equilibrierter Maus IgG-Agarose (entspricht 20 µl Bettvolumen, transfizierte H1299-Zellen) oder mit 75 µl Protein A-Agarose/Lachs Sperma DNA (MRC-5-abgeleitete Zellen) 1 h drehend inkubiert. Anschließend wurde die Matrix sedimentiert (20000 x g, 10 min), ein Aliquot als input-Probe abgenommen und der restliche Überstand wie folgt weiter prozessiert: Die Überstände, die aus induzierten TetR, TetR-IE1 und TetR-IE1₁₋₄₇₅-Zellen gewonnen wurden, wurden über Nacht mit α -IE1/IE2 Antikörper bzw. mIgG (siehe Tabelle C.6) für 16 h und anschließend für 1 h mit 60 µl Protein A-Agarose/Lachs Sperma DNA drehend inkubiert. Dahingegen wurden die Überstände, welche aus transfizierten H1299-Zellen gewonnen wurden, mit 100 µl equilibrierter Anti-HA- oder Anti-Flag-Agarose (entspricht 20 µl Bettvolumen) inkubiert. Nach dem Sedimentieren der Protein-beladenen Agarose (100 x g, 1 min) wurde der Überstand abgesaugt und die Proben einmal mit 1 ml FastChIP-Puffer mit Protease Inhibitoren gewaschen, welcher anstatt EDTA 2 mM MgCl₂ enthielt. Zum Abbau von DNA in den Proben wurde die Matrix erneut sedimentiert (100 x g, 1 min), trocken-gesaugt und mit 100 µl 1 x DNase Puffer (Ambion) mit 2 µl (4U) DNase I (Ambion) für 15 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde 1 ml FastChIP-Puffer mit Protease Inhibitoren zu den Proben gegeben und die Matrix weitere fünfmal mit 1 ml desselben Puffers gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und 45 µl 1 x Proteinauftragspuffer zu den Protein/Matrix-Komplexen gegeben. Schlussendlich wurden die output-Proben für 10 min, die input-Proben für 5 min bei 95°C inkubiert, alle Proben zentrifugiert (16162 x g, 5 min) und die Überstände mittels Western Blot (siehe C 5.10) analysiert.

5.10 Proteinauftrennung und –detektion

Soweit nicht anders angegeben, wurden Protein-Proben in 1 x Proteinauftragspuffer für 5 min bei 95°C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970. Zum Nachweis der aufgetrennten Proteine wurden diese entweder direkt im Gel mit Coomassie Brilliant Blue (PlusOne Coomassie Blue PhastGel R-350, GE Healthcare) nach Herstellerangaben angefärbt oder mittels Western Blot analysiert. Dazu wurden die Proteine, wie beschrieben (Krauss, 2007), auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und immunologisch, detektiert. Für die Chemilumineszenzreaktion wurde das SuperSignal West Pico bzw. SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrat (Thermo Scientific) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die für den immunologischen Nachweis verwendeten Primär- und HRP-gekoppelten Sekundärantikörper können der Tabelle C.6 entnommen werden.

Um die Intensität von Protein-Banden quantifizieren zu können, wurden Coomassiegefärbte Gele bzw. Röntgenfilme mit 72 dpi gescannt. Die Banden wurden anschließend mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes Scion-Image 4.0 (Scion Corporation) und der Programmerweiterung GelPlot2 densitometrisch quantifiziert.

5.11 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfärbung von Proteinen wurden H1299- oder MRC-5-Zellen in 6-well-Platten auf Präzisions-Deckgläser (1,5 H, 24 mm Durchmesser, Carl Roth) ausgesät. Die H1299-Zellen wurden wie unter C 2.2 beschrieben transfiziert. MRC-5-Zellen hingegen wurden bei Erreichen der Konfluenz mit hCM-Viren oder mock infiziert (siehe C 3.2). Ungefähr 48 h nach Transfektion bzw. Infektion wurden die Zellen zunächst dreimal kurz mit PBS-T gewaschen und anschließend für 20 min bei -20°C mit Methanol (Merck) fixiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt. Nach zweimaligem kurzem Waschen mit PBS-T wurden die Zellen zunächst für 1 h in IF-Blockierungslösung inkubiert, danach für eine weitere Stunde in der jeweiligen Primärantikörperverdünnung. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS-T gewaschen, mit entsprechender Sekundärantikörperverdünnung für 1 h inkubiert und nochmals dreimal für 5 min gewaschen, bevor die Präparate schließlich mit ProLong Gold Reagenz mit DAPI (Life Technologies) eingedeckt wurden. Die verwendeten Primär- und Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper sind in Tabelle C.6 aufgelistet und wurden im angegebenen Verhältnis mit PBS verdünnt.

Die IF-Präparate wurden mit Epifluoreszenz-Mikroskopen betrachtet und fotografiert. Dazu wurde entweder ein Keyence BZ 9000 (Generation II) oder ein Leica DMRX mit eingebauter Digitalkamera (Retiga-SRV, Q-Imaging) und die dazugehörigen Software Programme BZ II Analyzer bzw. Image-Pro Plus 2.6 (Q-Imaging) verwendet. Zur weiteren Bearbeitung aller aufgenommenen Bilder diente die Adobe Photoshop CS4 Software. Von einigen IF-Bildern wurde der Grad der Übereinstimmung zwischen Pixeln im grünen und blauen Kanal mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes Image J (National Institutes of Health) und der Programmiererweiterung Colocalization_Finder (Version 1.2) quantifiziert. Dazu wurde die Pearson Korrelation von autokontrastierten Bildern mit acht Bit Farbtiefe berechnet.

5.12 Molecular Modeling

Das *in silico*-Modell des IE1-CTD/Nukleosom-Komplexes wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer (Universität Regensburg) generiert. Es basiert auf einem Alignment der LANA-CTD (Aminosäuren 4-17) mit der IE1-CTD (Aminosäuren 476-491) und der publizierten Röntgenkristallstruktur des LANA₄₋₁₇/Nukleosom-Komplexes (Barbera et al., 2006; PDB: 1zla). Das zugrunde liegende Alignment wurde mit dem PERMOL Modul (Möglich et al., 2005) der Software AUREMOL (Gronwald et al., 2004) generiert und durch die Programme ClustalW2 und EMBOSS Stretcher bestätigt. Für die Berechnung des Modells wurden die beiden Programme PERMOL und Crystallography & NMR System (Brünger et al., 1998; Brünger, 2007) verwendet. Die detaillierte Vorgehensweise ist in Mücke et al., 2014 beschrieben.

D Ergebnisse

1 Charakterisierung der IE1-Histon-Interaktion

1.1 Das IE1-Protein besitzt zwei Histon-bindende Bereiche mit unterschiedlichen Spezifitäten für H2A/H2B und H3/H4

Wie in der Einleitung beschrieben, konnte in früheren Interaktionsstudien der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das hCMV IE1-Protein Nukleinsäure-unabhängig an die vier core-Histone H2A, H2B, H3 und H4 bindet (Mücke, 2010; Bernhardt, 2010; siehe auch Mücke et al., 2014). Des Weiteren ist seit langem bekannt, dass IE1 über die carboxy-terminale CTD mit zellulärem mitotischem Chromatin colokalisiert (Reinhardt et al., 2005). Es schien daher interessant zu untersuchen, ob der Bereich im IE1-Protein, der die Interaktion mit mitotischem Chromatin vermittelt auch für die Bindung von IE1 an die vier core-Histone benötigt wird.

Dazu wurde ein um die CTD verkürztes IE1-Protein (IE1₁₋₄₇₅) sowie ein amino-terminal verkürztes IE1-Protein, welches nur die CTD (IE1₄₇₆₋₄₉₁) umfasst, zusammen mit dem Volllänge IE1 in einer *in vitro*-Bindungsstudie auf Interaktion mit zellulären Histonen getestet (Abbildung D.1). Als Kontrolle diente die amino-terminale KSHV LANA-CTD (LANA₅₋₂₂), da bekannt ist, dass diese an H2A/H2B-Dimere auf der Nukleosomen-Oberfläche bindet (Barbera et al., 2006). Die genannten Proteine wurden, neben unfusionierter Glutathion-S-Transferase (GST), als GST-Fusionsproteine im *E. coli*-Stamm Rosetta produziert und mit Glutathion-Sepharose affinitätsgereinigt (siehe C 5.5). Im Anschluss wurden die gereinigten, an Glutathion-Sepharose gebundenen Proteine GST, GST-IE1, GST-IE1₁₋₄₇₅, GST-IE1₄₇₆₋₄₉₁ und GST-LANA₅₋₂₂ sowie proteinfreie Glutathion-Sepharose als weitere Spezifitätskontrolle, mit säureextrahierten Histonen aus H1299-Zellen inkubiert (siehe C 5.7 und C 5.8). Um Wechselwirkungen zwischen den genannten Proteinen und Histonen zu analysieren, wurden die Proben in 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Zum Größenvergleich wurden außerdem je 1,5 µg rekombinante Histone H2A, H2B, H3.1 und H4 der Firma NEB auf das Gel aufgetragen.

In Abbildung D.1 B ist zu erkennen, dass das Volllänge GST-IE1 mit allen vier core-Histone in äquimolaren Mengen interagiert, während das um die CTD verkürzte GST-IE1₁₋₄₇₅ im Vergleich eine schwächere Bindung an die Histone H2A und H2B zeigte. Die Interaktion mit H3 und H4 jedoch war zwischen GST-IE1 und GST-IE1₁₋₄₇₅

vergleichbar. Im Gegensatz dazu konnte sowohl für GST-IE1₄₇₆₋₄₉₁ als auch GST-LANA₅₋₂₂ keine spezifische Interaktion mit H3 und H4 beobachtet werden, stattdessen zeigten die beiden CTDs eine selektive Affinität für H2A und H2B. Die Wechselwirkung zwischen GST-IE1₄₇₆₋₄₉₁ und H2A/H2B war weniger ausgeprägt als die zwischen GST-IE1 und den beiden Histonen, aber vergleichbar mit der Wechselwirkung zwischen GST-IE1₁₋₄₇₅ bzw. GST-LANA₅₋₂₂ und H2A/H2B. Keines der getesteten GST-Fusionsproteine zeigte eine spezifische Interaktion mit dem linker-Histon H1.

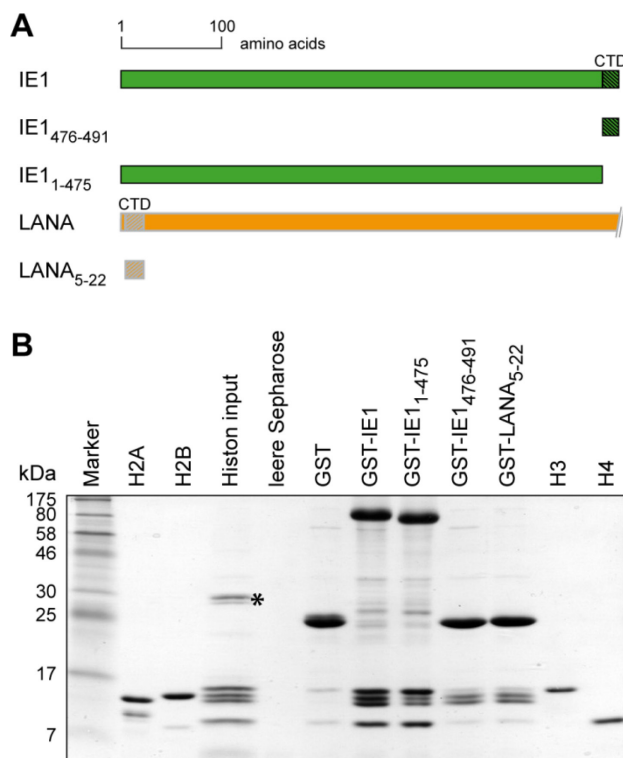


Abbildung D.1: *In vitro*-Bindungsstudie zur Identifizierung Histon-bindender Bereiche im IE1-Protein. (A) Schematische Übersicht der Volllänge sowie der verkürzten hCMV IE1- und KSHV LANA-Proteine, mit relativer Lokalisation der jeweiligen CTD. (B) Unfusionierte GST und die angegebenen GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* produziert und mittels Glutathion-Sepharose affinitätsgereingt. Proteinfreie Glutathion-Sepharose-Matrix und die mit GST bzw. den verschiedenen GST-Fusionsproteinen beladene Glutathion-Sepharose, wurde mit säureextrahierten Histonen aus H1299-Zellen inkubiert. Gleiche Proteinmengen der jeweiligen Köderproteine sowie der Histon-input und, als Histon-Größenstandard, je 1,5 µg rekombinante Histone H2A, H2B, H3.1 und H4 der Firma NEB wurden in einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Der Stern (*) kennzeichnet Histon H1-Varianten.

Bei der Wiederholung dieses Experiments mit denselben Köderproteinen und Histonfraktionen, die hauptsächlich H2A/H2B-Dimere oder H3/H4-Dimere bzw. -Tetramere enthielten, konnten die oben beschriebenen Bindungsspezifitäten reproduziert werden (Bernhardt, 2010; siehe auch Mücke et al., 2014).

Aus den Beobachtungen der *in vitro*-Bindungsstudien können mehrere Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum einen interagiert das IE1-Protein mit den core-Histonen über mindestens zwei verschiedene Proteinbereiche mit unterschiedlichen Präferenzen für H2A/H2B und H3/H4. Während die IE1-CTD selektiv nur an H2A und H2B bindet, interagiert die zweite, weiter amino-terminal gelegene Histon-bindende Region mit allen vier core-Histonen, wobei eine Präferenz für H3/H4 erkennbar ist. Zum anderen gibt es eine auffallende Ähnlichkeit zwischen der Histon-Bindung der LANA- und der IE1-CTD.

1.2 Drei saure Domänen innerhalb des IE1-Carboxy-Terminus bilden neben der CTD das zweite Histon-Bindemotiv

Nachdem aus den vorangegangenen Bindungsstudien zweifelsfrei hervorging, dass das IE1-Protein neben der CTD mindestens eine weitere Histon-bindende Domäne besitzt, wurde im Weiteren versucht diese(n) Proteinbereich(e) zu kartieren. Bei den folgenden Analysen wurde ein besonderes Augenmerk auf den carboxy-terminalen Abschnitt des IE1-Proteins gelegt, da sich hier mehrere saure Domänen (acidic domains, AD) befinden und der Schluss nahe lag, dass die basischen, positiv geladenen Histon-Moleküle mit sauren, negativ geladenen Bereichen im IE1-Molekül wechselwirken. Die verwendeten internen IE1-Deletionsmutanten sind in Abbildung D.2 dargestellt. Die Proteine waren alle amino-terminal mit dem neun Aminosäuren umfassenden Hämagglutinin (HA)-Epitop fusioniert.

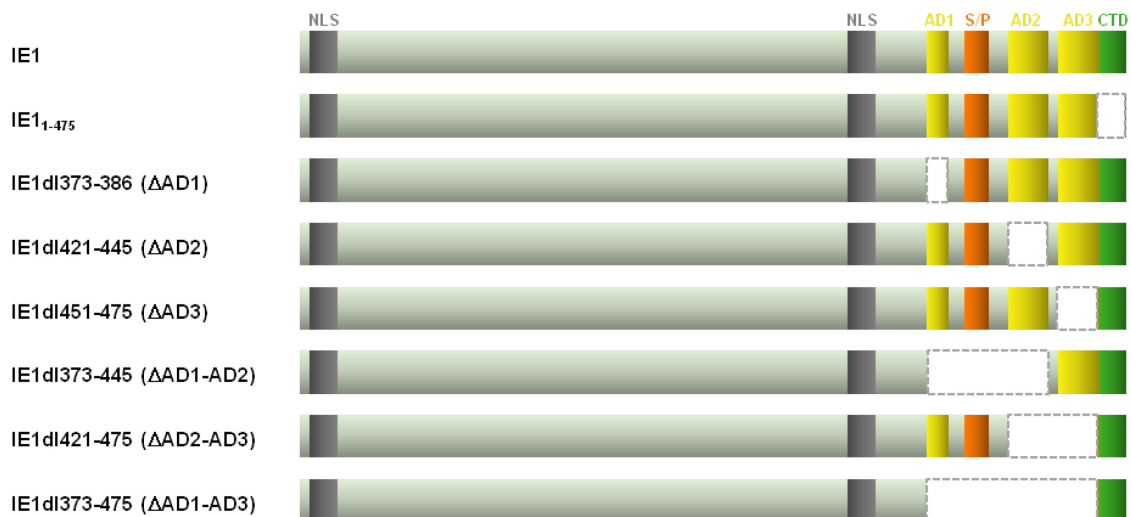


Abbildung D.2: Schematische Übersicht des Wildtyp hCMV IE1-Proteins mit wichtigen regulatorischen Domänen und der verwendeten IE1-Deletionsmutanten. Neben dem Wildtyp IE1-Protein (hCMV TN-Stamm) mit einer Gesamtlänge von 491 Aminosäuren (As) sind die verwendeten verkürzten IE1-Proteinmutanten dargestellt. Der gestrichelt umrandete weiße Bereich entspricht der jeweils deletierten Region. NLS, nukleäres Lokalisationssignal; AD1, acidic domain 1: As 373-386; S/P, Serin/Prolin-reiche Domäne: As 395-409; AD2, acidic domain 2: As 421-445; AD3, acidic domain 3: As 451-475; CTD, chromatin-tethering domain: As 476-491.

Neben den bereits in der Arbeitsgruppe vorliegenden Plasmiden, die für HA-IE1 Δ AD1, HA-IE1 Δ AD2, HA-IE1 Δ AD3 und HA-IE1 Δ AD2-AD3 kodieren, wurden Konstrukte hergestellt, die für HA-IE1-Fusionsproteine mit internen Deletionen der AD1-AD2- (pcDNA-HA-IE1dl373-445), sowie der AD1-AD2-AD3-Domänen (pcDNA-HA-IE1dl373-475) kodieren (siehe C 1.7.2.2.2). Die genannten HA-IE1-Fusionsproteine wurden, zusammen mit dem Volllänge IE1 und einem um die CTD verkürzten IE1 als Kontrollen, in H1299-Zellen exprimiert, anschließend mit Anti-HA-Agarose immunpräzipitiert und mit säureextrahierten Histonen aus H1299-Zellen inkubiert

(siehe C 5.6 bis C 5.8). Um Interaktionen zwischen den getesteten IE1-Proteinen und Histonen zu analysieren, wurden die Proben in 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Da sich die getesteten IE1-Proteine unterschiedlich gut mit Coomassie Brilliant Blue anfärben ließen und das HA-IE1 Δ AD1-AD2-Protein im Gel zudem auf gleicher Höhe mit der schweren Antikörperkette läuft, wurden die Köderproteine zusätzlich mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung D.3).

Alle eingesetzten HA-IE1-Proteine konnten erfolgreich exprimiert und immunpräzipitiert werden. Aufgrund unterschiedlicher Transfektions-Effizienzen, Proteinstabilitäten und/oder Immunpräzipitations-Effizienzen konnten jedoch, selbst bei mehrmaliger Wiederholung des Experiments, keine ganz gleichmäßigen IE1-Protein-Mengen erreicht werden. Dennoch ist gut zu erkennen, dass die eingesetzte IE1-Menge nicht mit der Fähigkeit Histone zu binden korreliert.

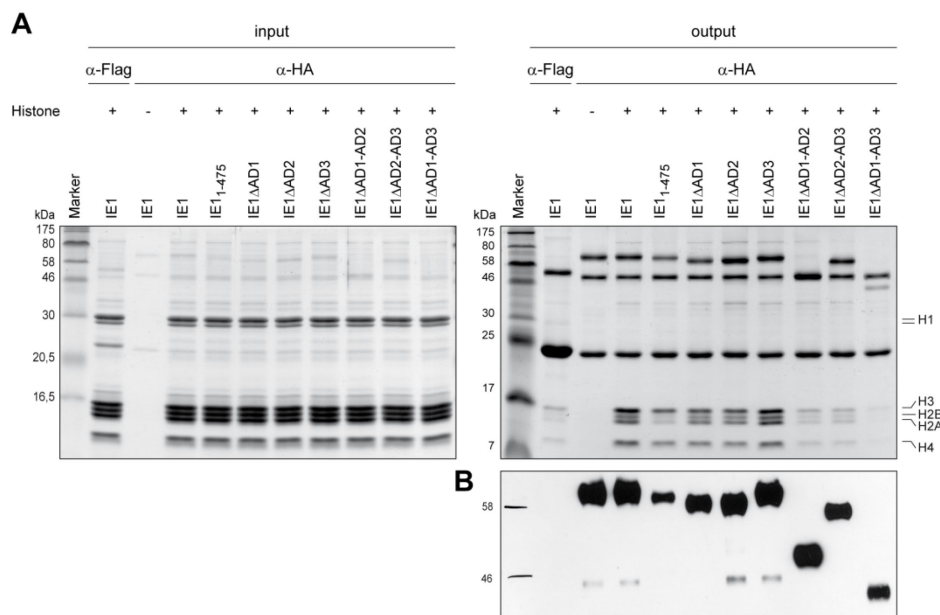


Abbildung D.3: Identifizierung des zweiten Histon-bindenden Bereiches des hCMV IE1-Proteins. (A) H1299-Zellen wurden mit verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert. Die entsprechenden HA-IE1-Fusionsproteine wurden 48 h später mit Anti-HA-Agarose oder Anti-Flag-Agarose (Negativkontrolle) immunpräzipitiert und mit säureextrahierten Histonen aus H1299-Zellen oder mit Puffer inkubiert. Jeweils gleiche Anteile der output- bzw. input-Proben wurden in 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. (B) Die Köderproteine in den output-Proben wurden zusätzlich mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3F10 (178), welcher gegen den HA-Fusionsanteil gerichtet ist, detektiert.

In diesem experimentellen Ansatz konnten zunächst die Ergebnisse des GST-capture-Assays bestätigt werden (vgl. Abbildung D.1). Während das Volllänge IE1 mit allen vier core-Histonen in etwa äquimolaren Mengen interagiert, zeigte das um die CTD verkürzte IE1₁₋₄₇₅ eine im Vergleich schwächere Bindung an die Histone H2A und H2B. Zudem war klar erkennbar, dass die Deletion je einer sauren Domäne (IE1 Δ AD1, IE1 Δ AD2 und IE1 Δ AD3) im IE1-Protein einen kaum merklichen Effekt auf

die Histon-Interaktion hatte. Bei gleichzeitiger Deletion zweier (IE1 Δ AD1-AD2 und IE1 Δ AD2-AD3) oder aller (IE1 Δ AD1-AD3) sauren Bereiche jedoch, war die Histon-Bindung deutlich reduziert und lag kaum bzw. überhaupt nicht über der Hintergrund-Bindung der Anti-Flag-Kontrolle.

Zusammenfassend kann man anhand der Ergebnisse schlussfolgern, dass der zweite Histon-bindende Bereich im IE1-Protein die sauren Domänen AD1, AD2 und AD3 umfasst, wobei diese additiv oder synergistisch zur IE1-Histon-Interaktion beitragen. Da die Bindung wahrscheinlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den basischen Histonen und den sauren Proteinabschnitten des IE1 beruht, kommt es wohl bei Unterschreitung einer kritischen Anzahl negativer Ladungen im IE1-Protein zum Verlust der Interaktion.

1.3 Die Interaktion von IE1 mit zellulären Nukleosomen erfolgt auch in Interphase-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das um die CTD-verkürzte IE1-Protein zwar noch an core-Histone bindet (siehe Abbildung D.1 und Abbildung D.3), jedoch nicht mehr in der Lage ist, mit zellulärem mitotischem Chromatin zu assoziieren (Reinhardt et al., 2005). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die IE1-CTD-vermittelte Bindung an die Histone H2A und H2B eine spezifische Rolle während der Mitose spielen könnte. Da für die bisher durchgeführten Interaktionsstudien Histonpräparationen aus Kulturen verwendet wurden, die einen sehr geringen Anteil an mitotischen Zellen aufwiesen (ca. 3%), die Bindung von IE1 und im Speziellen von IE1₄₇₆₋₄₉₁ an Histone jedoch sehr robust nachweisbar war, ist es jedoch wahrscheinlich, dass das IE1-Protein auch während der Interphase über die CTD mit zellulärem Chromatin interagiert. Auch für die LANA-CTD ist eine Zellzyklus-unabhängige Bindung an zelluläre core-Histone beschrieben (Barbera et al., 2006). Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob die Deletion der CTD einen Einfluss auf die Chromatin-Bindung des IE1-Proteins in Interphasezellen hat.

Um dieser Frage nachzugehen wurden Coimmunpräzipitationen mit Zellen, die induzierbar das Volllänge IE1-Protein (TetR-IE1-Zellen) bzw. ein um die CTD-verkürztes Protein (TetR-IE1₁₋₄₇₅-Zellen) exprimieren und in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert waren durchgeführt (siehe C 5.9). Als Kontrollzellen dienten IE1-negative TetR-Zellen. Zweiundsiebzig Stunden nach Induktion mit Doxycyclin wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und anschließend geerntet. Nach Zellyse und Solubilisierung der Nukleosomen durch Ultraschallbehandlung wurden die löslichen Extrakte in die Immunpräzipitation mit einem Antikörper, der sowohl das Volllänge IE1-, als auch das carboxy-terminal verkürzte IE1₁₋₄₇₅-Protein erkennt, eingesetzt.

Um zu gewährleisten, dass nur Protein-Protein-Wechselwirkungen detektiert werden, wurde die verbleibende DNA in den Proben in einem DNase-Schritt, welcher zwischen der Immunpräzipitation und den Wasch-Schritten durchgeführt wurde, verdaut. Durch Western Blot-Analyse wurden die IE1-Proteinvarianten schließlich auf copräzipitiertes Histon H2A und H2B untersucht.

Aus Abbildung D.4 ist klar zu erkennen, dass das Volllänge IE1-Protein auch unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen mit den beiden untersuchten Histonen interagiert, während das verkürzte IE1₁₋₄₇₅-Protein wenig (H2A) bzw. keine (H2B) Bindung an die Histone zeigte.

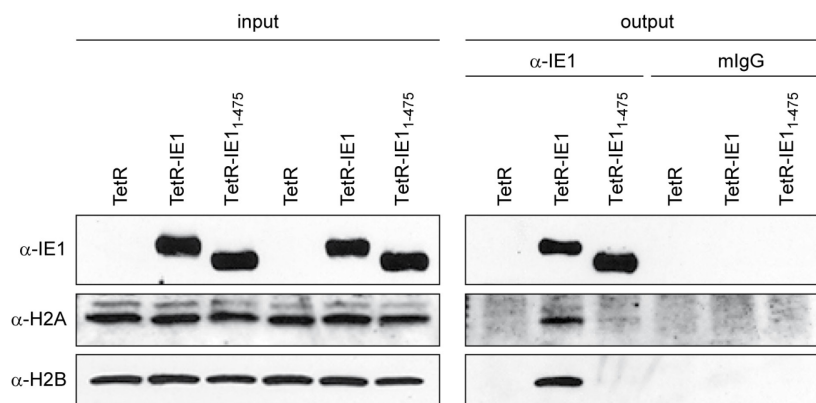


Abbildung D.4: Interaktion zwischen der IE1-CTD und den Histonen H2A und H2B in Interphase-Zellen. TetR-, TetR-IE1- und TetR-IE1₁₋₄₇₅-Zellen wurden in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert. Dazu wurden die Zellen im konfluenten Zustand für sieben Tage im selben Medium und 48 h vor Zellernte in Serum-reduziertem Medium (0,5% statt 10% FKS) kultiviert. Die Expression der IE1-Proteine wurde 72 h vor der Fixierung der Zellen mit Doxycyclin (insgesamt 1 µg/ml) induziert. Die Proteine in den Zellen wurden durch Formaldehyd quervernetzt, die Zellen lysiert und die Gesamtzellextrakte sonifiziert, um Nukleosomen zu solubilisieren. Die anschließende Immunpräzipitation wurde mit einem IE1/IE2-spezifischen Antikörper (MAB810R, 217) bzw. unspezifischem mIgG durchgeführt, wobei zur Präzipitation der Antigen/Antikörper-Komplexe Protein A-Agarose diente. Die input- und output-Proben wurden zum Nachweis der Histone in 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen und zum Nachweis von IE1 in 10%-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Detektion von IE1, H2A und H2B erfolgte durch Western Blot-Analyse mit monoklonalen (α-IE1/IE2, 217) bzw. polyklonalen (α-H2A, 128; α-H2B, 42) Antikörpern.

Analog zum KSHV LANA-Protein bindet IE1 also auch in der Interphase und nicht nur während der Mitose über die CTD an H2A und H2B und folglich an Chromatin. Während die CTD für die IE1-Chromosomen-Interaktion notwendig und ausreichend ist (Reinhardt et al., 2005), scheint der zweite Histon-bindende Bereich für die Interaktion mit Nukleosomen keine Rolle zu spielen. Vielmehr ist aufgrund der bisherigen experimentellen Daten zu vermuten, dass die sauren Domänen im IE1-Protein eher an DNA-freie Histone binden.

1.4 Die IE1-CTD enthält ein zehn Aminosäuren umfassendes Nukleosom-bindendes Motiv

Um die IE1-CTD-Nukleosom-Interaktion genauer zu charakterisieren und so einen Einblick in die molekularen Details dieser Interaktion zu bekommen, sollten mittels Alanin-Mutagenese individuelle Aminosäurereste innerhalb der CTD identifiziert werden, die an der Histon-Bindung beteiligt sind.

Dazu wurden verschiedene pGEX-IE1₄₇₆₋₄₉₁-Konstrukte generiert, die für IE1₄₇₆₋₄₉₁-Varianten kodieren, bei denen der Reihe nach jede Aminosäure einzeln durch Alanin ersetzt wurde. Das einzige Alanin innerhalb der CTD wurde durch Glycin ersetzt (Abbildung D.5).

CTD wt	G	G	K	S	T	H	P	M	V	T	R	S	K	A	D	Q
G476A	A	G	K	S	T	H	P	M	V	T	R	S	K	A	D	Q
G477A	G	A	K	S	T	H	P	M	V	T	R	S	K	A	D	Q
K478A	G	G	A	S	T	H	P	M	V	T	R	S	K	A	D	Q
S479A	G	G	K	A	T	H	P	M	V	T	R	S	K	A	D	Q
T480A	G	G	K	S	A	H	P	M	V	T	R	S	K	A	D	Q
H481A	G	G	K	S	T	A	P	M	V	T	R	S	K	A	D	Q
P482A	G	G	K	S	T	H	A	M	V	T	R	S	K	A	D	Q
M483A	G	G	K	S	T	H	P	A	V	T	R	S	K	A	D	Q
V484A	G	G	K	S	T	H	P	M	A	T	R	S	K	A	D	Q
T485A	G	G	K	S	T	H	P	M	V	A	R	S	K	A	D	Q
R486A	G	G	K	S	T	H	P	M	V	T	A	S	K	A	D	Q
S487A	G	G	K	S	T	H	P	M	V	T	R	A	K	A	D	Q
K488A	G	G	K	S	T	H	P	M	V	T	R	S	A	A	D	Q
A489G	G	G	K	S	T	H	P	M	V	T	R	S	K	G	D	Q
D490A	G	G	K	S	T	H	P	M	V	T	R	S	K	A	A	Q
Q491A	G	G	K	S	T	H	P	M	V	T	R	S	K	A	D	A

Abbildung D.5: Darstellung der verwendeten CTD-Varianten für *in vitro*-Bindungsstudien und Immunfluoreszenz-Analysen. Die Wildtyp (wt) CTD Aminosäure-Sequenz und die Aminosäure-Sequenzen der verschiedenen mutierten CTD-Peptidvarianten mit Angabe der jeweiligen Bezeichnung sind untereinander aufgelistet. Die durch Alanin bzw. Glycin ersetzten Aminosäuren sind grün hinterlegt.

Als Negativkontrolle wurde außerdem ein pGEX-Konstrukt generiert, bei dem die ersten beiden kodierenden Basen-Triplets der CTD durch Stopp-Codons ersetzt wurden (siehe C 1.7.2.2.3). Sämtliche mutierte IE1-CTD-Varianten wurden, neben der Wildtyp CTD als Positivkontrolle, zunächst als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, mit Glutathion-Sepharose gereinigt und in *in vitro*-Bindungsstudien mit säureextrahierten Histonen aus H1299-Zellen eingesetzt (siehe C 5.5, C 5.7 und C 5.8). Die CTD-Stopp-Mutante, also unfusionierte GST, diente als Negativkontrolle. Zur Analyse der Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen CTD-Varianten und den Histonen, wurden die Präzipitate in 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Außerdem wurde die Histon-Bindungs-Effizienz aller CTD-Mutanten im Vergleich zur Wildtyp CTD quantifiziert (Abbildung D.6).

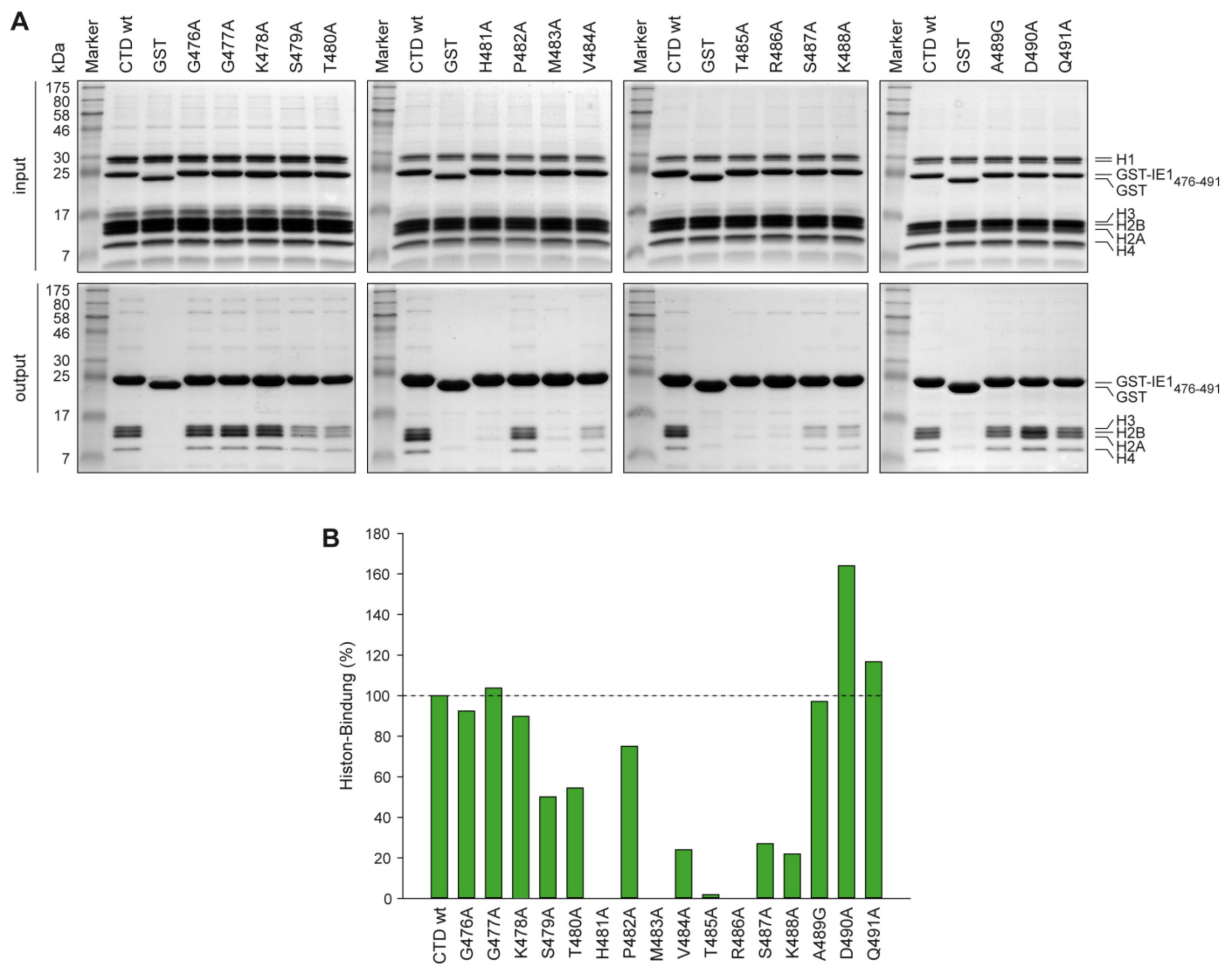


Abbildung D.6: Identifizierung eines Histon-bindenden Motivs innerhalb der IE1-CTD mittels *in vitro*-Bindungsstudien. (A) GST fusioniert mit der Wildtyp CTD bzw. den verschiedenen IE1₄₇₆₋₄₉₁-Peptidvarianten sowie unfusionierte GST wurden in *E. coli* produziert und anschließend mit Glutathion-Sepharose affinitätsgereinigt. Die verschiedenen immobilisierten Proteine wurden mit säureextrahierten Histonen aus H1299-Zellen inkubiert. Schließlich wurden jeweils gleiche Anteile der input- bzw. output-Proben in 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. (B) Die H3-, H2A-, H2B- und H4-output-Banden, sowie die dazugehörigen IE1₄₇₆₋₄₉₁-output-Banden aus (A) wurden densitometrisch quantifiziert. Aus dem Quotienten wurde jeweils die Histon-Bindungs-Effizienz im Vergleich zur Wildtyp CTD auf demselben Gel (100%) berechnet und prozentual aufgetragen. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Katrin Gerrer im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit.

Erstaunlicherweise stellte sich heraus, dass nur vier Aminosäuren innerhalb der CTD für die Bindung an Histone essentiell sind, nämlich H481, M483, T485 und R486. Ersetzte man einen dieser Reste durch Alanin, zeigten die entsprechenden CTD-Varianten keinerlei Wechselwirkung mehr mit den Histonen. Außerdem konnten weitere sechs Aminosäurereste (S479, T480, P482, V484, S487 und K488) identifiziert werden, die unterstützend auf die IE1-CTD-Nukleosom-Interaktion wirkten. Tauschte man einen dieser Reste gegen Alanin, so war die Bindung der entsprechenden CTD-Varianten an die Histone im Vergleich zur Wildtyp CTD deutlich abgeschwächt. Alle Aminosäuren „stromaufwärts“ des S479 (G476, G477 und K478) und „stromabwärts“ des K488 (A489, D490 und Q491) hingegen hatten keinen

nennenswerten negativen Effekt auf die IE1-CTD-Histon-Bindung. Tatsächlich zeigte die D490A-Variante sogar eine stärkere Bindung an Histone als die Wildtyp CTD.

Auffällig war, dass die IE1-CTD bei diesem Experiment nicht wie zuvor (vgl. Abbildung D.1) nur mit den Histonen H2A und H2B interagierte, sondern mit allen vier core-Histonen. Das liegt wahrscheinlich an den leicht modifizierten experimentellen Bedingungen, die dazu geführt haben könnten, dass bei dieser Versuchsreihe die Konzentration der Histone in den Säureextrakten höher war, weshalb mehr Histone als Oktamere vorlagen. Dadurch kam es vermutlich nicht nur zur direkten Wechselwirkung zwischen der IE1-CTD und den H2A/H2B-Dimeren, sondern auch zu indirekten Wechselwirkungen mit den Histonen H3 und H4. Eine Interaktion mit dem linker-Histon H1 konnte auch bei diesem Experiment nicht beobachtet werden.

Um den Zusammenhang zwischen der Histon-Bindung der IE1-CTD und der Assoziation mit zellulärem mitotischem Chromatin genauer zu untersuchen, wurden die beschriebenen IE1₄₇₆₋₄₉₁-Peptidvarianten als EGFP-Fusionsproteine in H1299-Zellen exprimiert. Als Positivkontrolle diente die amino-terminal an EGFP fusionierte Wildtyp CTD, als Negativkontrolle wiederum unfusioniertes EGFP (CTD-Stopp-Mutante). Die mit den entsprechenden pEGFP-Expressionsvektoren (siehe C 1.7.2.2.2) transfizierten H1299 Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit Methanol fixiert. Im Anschluss wurden die EGFP-Fusionsproteine immunologisch gefärbt und schließlich die Lokalisation der verschiedenen CTD-Varianten relativ zu zellulärem mitotischem Chromatin mittels IF-Mikroskopie analysiert (siehe C 5.11). Des Weiteren wurden die Ergebnisse der Colokalisationsstudie durch Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert (Abbildung D.7 A und B).

Interessanterweise waren die vier selben Aminosäuren innerhalb der CTD, die sich bereits für die Interaktion mit Histonen als unabdingbar erwiesen hatten, auch essentiell für die Colokalisation der IE1-CTD mit mitotischem Chromatin. Tauschte man diese Aminosäuren (H481, M483, T485 und R486) einzeln gegen Alanin, wurde die CTD nicht mehr ans mitotische Chromatin rekrutiert. Auch die sechs Aminosäurereste, welche die Histon-Bindung maßgeblich unterstützen (S479, T480, P482, V484, S487 und K488), trugen zur Colokalisation der IE1-CTD mit dem zellulären mitotischen Chromatin bei. Bei Ersetzen einer dieser Aminosäuren wurde ein intermediärer Phänotyp beobachtet, bei dem zwar der Großteil der CTD-Peptide am mitotischen Chromatin lokalisiert war, jedoch ein „Schleier“ an ungebundenen CTD-Peptiden um das Chromatin zu erkennen war. Wiederum hatten alle anderen Aminosäuren, also diejenigen „stromaufwärts“ des S479 (G476, G477 und K478) und „stromabwärts“ des K488 (A489, D490 und Q491) keinen nennenswerten negativen

Effekt auf die Assoziation der IE1-CTD mit zellulären Chromosomen. Dahingegen zeigte sich auch bei der Koloalisations-Studie, dass die D490A-Variante sogar eine effizientere Bindung an das Chromatin vermittelte als die Wildtyp CTD.

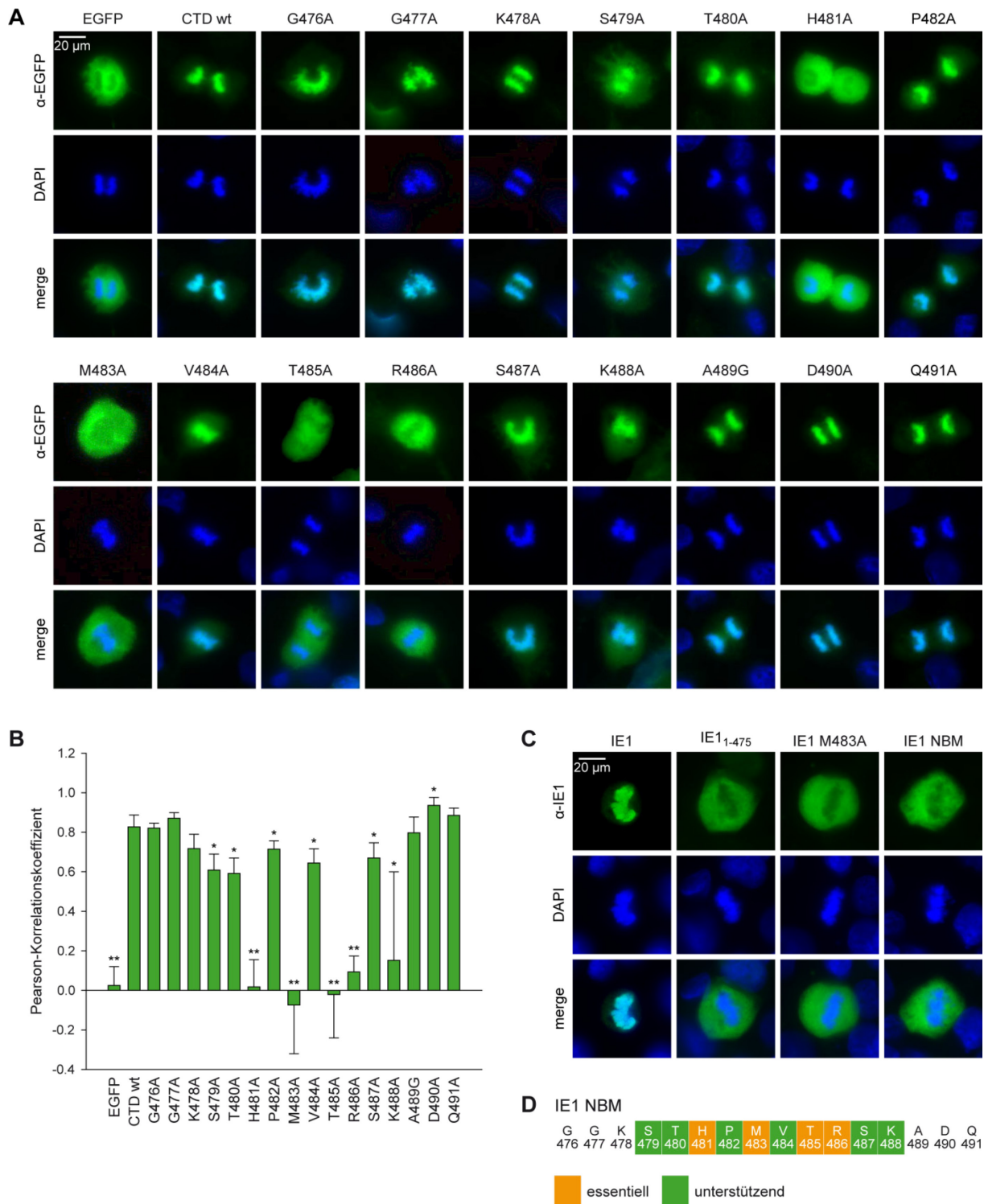


Abbildung D.7: Identifizierung eines Chromatin-bindenden Motivs innerhalb der IE1-CTD mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse in mitotischen Zellen. (A) H1299-Zellen wurden mit pEGFP-Expressionsplasmiden transfiziert, die für EGFP oder für EGFP, das mit der Wildtyp CTD (wt) bzw. mit den verschiedenen IE1₄₇₆₋₄₉₁-Peptidvarianten fusioniert ist, kodieren. Nach 48 h wurden die Zellen mit Methanol fixiert, der EGFP-Fusionsanteil mit einem polyklonalen Antikörper (α -GFP, 124) und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper immunologisch detektiert und durch Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

Zelluläre DNA wurde mit DAPI gefärbt. Dargestellt sind jeweils repräsentative Einzelbilder gefärbter mitotischer Zellen sowie die Überlagerung der beiden Kanäle. (B) Um die Ergebnisse der Colokalisationsstudie zu quantifizieren, wurde der Grad der Übereinstimmung zwischen Pixeln im grünen und blauen Kanal durch Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten bestimmt (1 = perfekte positive Korrelation, 0 = keine Korrelation, -1 = perfekte negative Korrelation). Die Säulen repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung aus jeweils drei zufällig ausgewählten Bildern mitotischer Zellen. Um die Unterschiede zwischen der Wildtyp CTD und den einzelnen Mutanten auf statistische Signifikanz hin zu untersuchen, wurde ein Student-t-Test durchgeführt (* $p < 0,1$; ** $p < 0,01$). (C) H1299-Zellen wurden mit pCMV.TetO-Plasmiden transfiziert, die für das Wildtyp IE1, IE1₁₋₄₇₅ oder Volllänge IE1-Proteine, bei denen eine Aminosäure (M483A) oder vier Aminosäuren (IE1 NBM) innerhalb der CTD durch Alanin substituiert wurden, kodieren. Bei den substituierten Aminosäuren handelt es sich um solche, die sich in (A) und (B) als essentiell für die Assoziation der CTD mit zellulären Chromosomen erwiesen. Nach 48 h wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die IE1-Varianten mit einer 1:1 Mischung zweier monoklonaler Antikörper (α -IE1 [IE1 G10], 215 und α -IE1 [6E1], 216) und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper immunologisch detektiert und durch Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Zelluläre DNA wurde mit DAPI gefärbt. Dargestellt sind jeweils repräsentative Einzelbilder gefärbter mitotischer Zellen, sowie die Überlagerung der beiden Kanäle. (D) Skizzierung des Nukleosom-bindenden Motivs (NBM) innerhalb der IE1-CTD basierend auf den Ergebnissen aus (A), (B) und (C) sowie der Abbildung D.6. Aminosäuren, die sich für die Histon-Bindung und für die Interaktion mit zellulärem Chromatin als essentiell oder unterstützend erwiesen sind hervorgehoben. Die Teilabbildung (A) entstand in Zusammenarbeit mit Katrin Gerrer im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit.

Die Ergebnisse der beiden Versuchsansätze, also der Histon-Bindungsstudie und der Colokalisationsstudie, decken sich nahezu perfekt. Deshalb ist die Schlussfolgerung zu ziehen, dass die Assoziation der IE1-CTD mit zellulärem mitotischem Chromatin durch die Bindung an die Histone H2A und H2B vermittelt wird.

Der Einfluss der vier, für die Interaktion der IE1-CTD mit Chromatin essentiellen Aminosäurereste wurde zusätzlich im Kontext des Volllänge IE1-Proteins untersucht. Dazu wurden zunächst Konstrukte hergestellt, die für IE1-Proteine kodieren, bei denen entweder nur eine Aminosäure (M483A, IE1 M483A) oder gleichzeitig vier Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurden (H481A/M483A/T485A/R486A, IE1 NBM). Anschließend wurden H1299-Zellen mit den generierten Expressionsplasmiden sowie Kontrollplasmiden, die für das Volllänge IE1-Protein bzw. ein um die CTD verkürztes IE1-Protein kodieren, transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit Methanol fixiert und die IE1-Varianten anschließend, zusammen mit zellulärem Chromatin, gefärbt. Die Lokalisation der verschiedenen IE1-Proteine relativ zu zellulärem mitotischem Chromatin wurde wiederum mittels IF-Mikroskopie analysiert (Abbildung D.7 C).

Bei gleichzeitiger Substitution der vier Aminosäuren H481, M483, T485 und R486 oder einzelner Substitution der Aminosäure M483 verlor IE1 sogar im Kontext des Volllänge Proteins jegliche Assoziation mit den kondensierten zellulären Chromosomen.

Anhand der beschriebenen Ergebnisse konnte ein zehn Aminosäuren umfassendes Nukleosom-bindendes Motiv (NBM: STHPMVTRSK) im Zentrum der IE1-CTD identifiziert werden, das aus den vier für die Histon- und Chromatin-Interaktion essentiellen Aminosäuren H481, M483, T485 und R486 sowie den sechs, die Histon- und Chromatin-Interaktion unterstützenden Aminosäuren S479, T480, P482, V484, S487 und K488 (Abbildung D.7 D) besteht.

1.5 Die Interaktion zwischen der IE1-CTD und zellulären Nukleosomen ist abhängig von sauren Resten innerhalb des H2A-Moleküls

Nachdem die Aminosäuren innerhalb der IE1-CTD identifiziert worden waren, die für die Interaktion von IE1 mit zellulären Nukleosomen relevant sind, sollte im Weiteren untersucht werden, welche Aminosäurereste auf Seiten der Histone an der Komplexbildung beteiligt sind. Dank der Aufklärung der Röntgenkristallstruktur des LANA-CTD/Nukleosom-Komplexes ist bekannt, dass negativ geladene Reste im Histon H2A, die an der Ausbildung einer sauren Taschen auf der Nukleosomen-Oberfläche beteiligt sind, eine maßgebliche Rolle bei der Interaktion zwischen dem LANA-Peptid und dem Nukleosom spielen. Betrachtet man wiederum die Ähnlichkeiten der Histon-Bindung zwischen der IE1- und der LANA-CTD (siehe Abbildung D.1) so liegt die Vermutung nahe, dass die beiden CTDs mit ähnlichen Aminosäuren des H2A-Moleküls in Wechselwirkung treten.

Um diese These zu untersuchen, wurden zunächst pME-Konstrukte hergestellt, die für Flag-markierte H2A-Varianten kodieren, bei denen je eine der insgesamt neun negativ geladenen Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurde. Sechs dieser geladenen Aminosäuren (E56, E61, E64, D90, E91 und E92) tragen wiederum zur Ausbildung der sauren Tasche bei. Zusätzlich wurden zwei Tripel-Mutanten generiert, bei denen zugleich drei negativ geladene Aminosäuren (E61/E64/D90 und D90/E91/E92) gegen Alanin substituiert wurden (siehe C 1.7.2.2.2 und Abbildung D.8 A).

Im Anschluss wurden H1299-Zellen mit den Expressionsplasmiden, die für die diversen mutierten Flag-H2A-Varianten bzw. für das Flag-markierte Wildtyp H2A kodieren, transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, die Histone der verschiedenen Ansätze durch Säureextraktion gereinigt und in *in vitro*-Bindungsstudien mit immobilisiertem Wildtyp GST-IE1₄₇₆₋₄₉₁ eingesetzt (siehe C 5.7 und C 5.8). Als Negativkontrolle wurde zum einen ein Histonextrakt aus H1299-Zellen, welche mit dem leeren pME18S-Konrollvektor transfiziert waren, mit der IE1-CTD inkubiert. Zum anderen wurde proteinfreie Glutathion-Sepharose mit einem Histonextrakt inkubiert, der aus H1299-Zellen gewonnen wurde, die mit dem Wildtyp H2A-kodierenden pME-Flag-H2A transfiziert waren. Um Interaktionen zwischen den getesteten H2A-Mutanten und dem IE1₄₇₆₋₄₉₁-Peptid zu analysieren, wurden die input- und output-Proben in 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und zum Nachweis von GST-IE1₄₇₆₋₄₉₁ mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Präzipitiertes Flag-markiertes H2A wurde mittels Western Blot detektiert (Abbildung D.8 B).

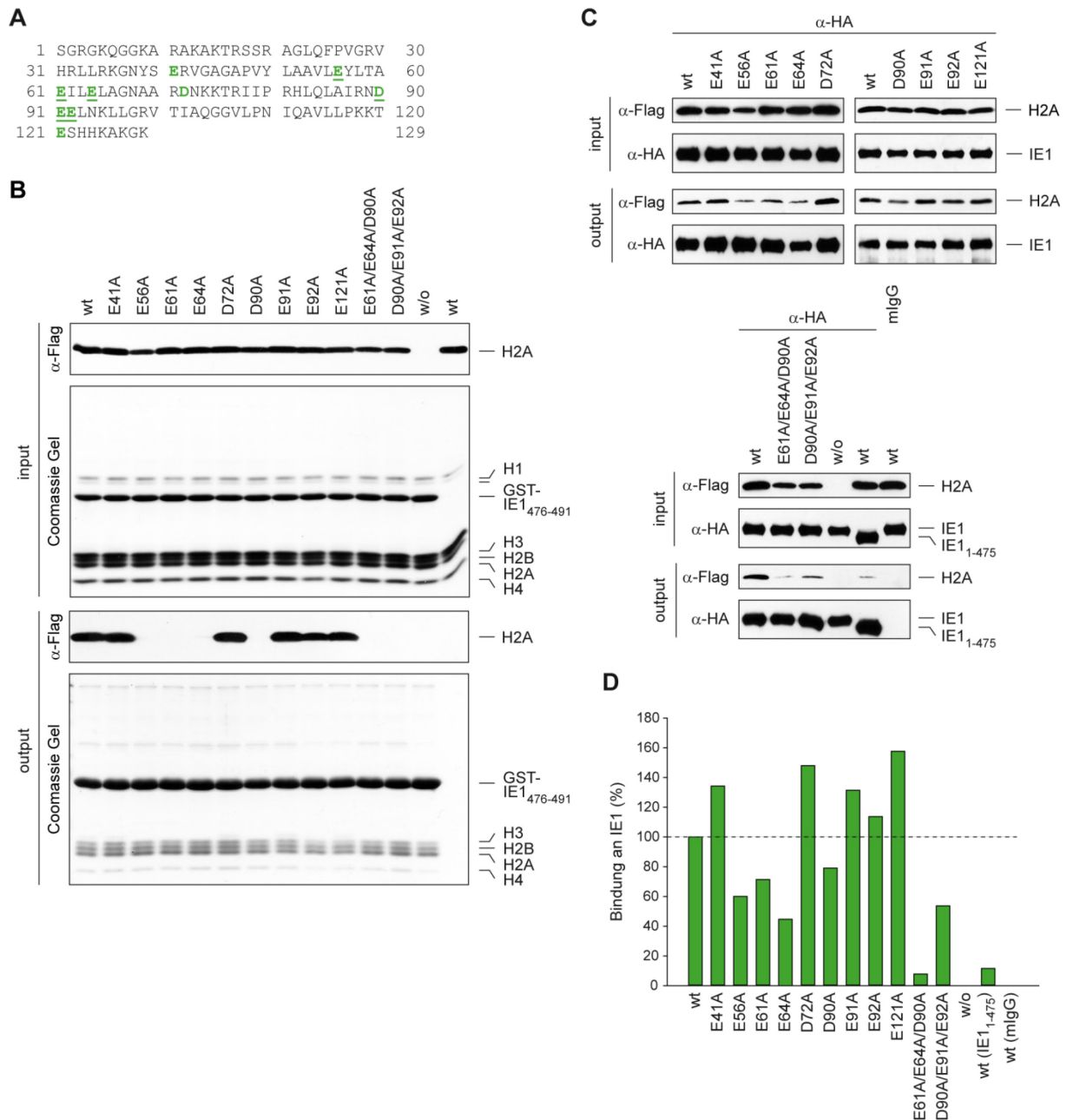


Abbildung D.8: Identifizierung negativ geladener H2A-Reste innerhalb der nukleosomalen sauren Tasche, die die Wechselwirkung mit der IE1-CTD vermitteln. (A) Darstellung der Histon H2A.A-Sequenz (H2A Typ 1-B/E). Saure H2A-Aminosäurereste, die mittels ortsgerechter Mutagenese durch Alanin ersetzt wurden sind in grün dargestellt. Negativ geladene Reste, die zur Ausbildung der sauren Tasche beitragen, sind zusätzlich unterstrichen. (B) Proteinfreie Glutathion-Sepharose oder Glutathion-Sepharose beladen mit GST-IE1₄₇₆₋₄₉₁ wurde mit säureextrahierten Histonen aus H1299-Zellen inkubiert, die zuvor mit dem leeren pME18S-Vektor transfiziert worden waren (w/o) bzw. mit Expressionsplasmiden, die für Flag-markiertes Wildtyp H2A oder die angegebenen H2A-Mutanten kodieren. Jeweils gleiche Anteile der input- bzw. output-Proben wurden in 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Der Nachweis der Flag-H2A-Varianten erfolgte durch Western Blot-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen das Flag-Epitop gerichtet war (M2, 180). (C) H1299-Zellen wurden gleichzeitig mit dem leeren pME18S-Kontrollvektor oder mit Expressionsplasmiden, die für Flag-markiertes Wildtyp H2A oder die verschiedenen H2A-Mutanten kodieren und mit Plasmiden, die für HA-markiertes Volllänge IE1 bzw. IE1₁₋₄₇₅ kodieren, transfiziert. Nach 48 h wurden die Proteine in den Zellen mit Formaldehyd quervernetzt, die Zellen lysiert und die Gesamtzell-extrakte sonifiziert, um Nucleosomen zu solubilisieren. Die anschließende Immunpräzipitation erfolgte mit Anti-HA- bzw. Maus-IgG-Agarose. Die input- und output-Proben wurden zum Nachweis der Histone in 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen, zum Nachweis von IE1 in 10%-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Detektion von IE1 und H2A erfolgte durch Western Blot-Analyse mit monoklonalen Antikörpern, die gegen den HA- bzw. den Flag-Fusionsanteil (3F10, 178 bzw. M2, 180) gerichtet waren. (D) Die Flag-H2A Banden der output- und input-Proben aus (C) wurden densitometrisch quantifiziert. Aus dem Quotienten wurde jeweils die IE1-Bindungs-Effizienz im Vergleich zum Wildtyp H2A auf demselben Gel (100%) berechnet und prozentual aufgetragen.

Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass nur die Mutationen der Aminosäurereste E56, E61, E64 und D90, die alle innerhalb der nukleosomalen sauren Tasche liegen, zu einem Verlust der Interaktion zwischen dem H2A und der IE1-CTD führten. Für die beiden H2A-Tripel-Mutanten konnte ebenfalls keine Interaktion mit dem IE1₄₇₆₋₄₉₁-Peptid nachgewiesen werden. Dagegen blieb bei den H2A-Mutanten E41A, D72A, E91A, E92A und E121A die Bindungsaktivität für die IE1-CTD erhalten.

Um dieses Ergebnis im Kontext des Volllänge IE1-Proteins zu verifizieren, wurden Coimmunpräzitationen durchgeführt. Dazu wurden die oben beschriebenen H2A-Mutanten zusammen mit einem HA-markierten Wildtyp IE1- bzw. IE1₁₋₄₇₅ in H1299-Zellen exprimiert. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion der entsprechenden pME-Flag-H2A- und pcDNA-HA-Plasmide mittels Kalzium-Phosphat-Päzipation wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und anschließend geerntet. Nach Zelllyse und Solubilisierung zellulärer Nukleosomen durch Ultraschallbehandlung wurden die löslichen Extrakte in die Immunpräzitation mit Anti-HA-Agarose oder, als Negativkontrolle, mit Maus-IgG-Agarose eingesetzt (C 5.9). Die Interaktion der verschiedenen H2A-Varianten mit dem IE1-Protein wurde mittels Western Blot untersucht. Zudem wurde die IE1-Bindungs-Effizienz der verschiedenen H2A-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp H2A bestimmt (Abbildung D.8 C und D).

Analog zur oben beschriebenen *in vitro*-Bindungsstudie, konnte auch bei diesem Experiment keine Abschwächung der IE1-Bindungseffizienz bei den H2A-Varianten mit den Aminosäure-Substitutionen E41A, D72A, E91A, E92A und E121A festgestellt werden. Tatsächlich scheinen diese Mutationen die H2A-IE1-Interaktion sogar zu verstärken. Dahingegen konnte reproduzierbar gezeigt werden, dass die einzelnen Aminosäure-Substitutionen E56A, E61A, E64A und D90A und die dreifache Aminosäure-Substitution D90A/E91A/E92A im H2A-Protein die Bindung an IE1 abschwächte. Die IE1-Bindungseffizienz war bei der H2A-Mutante am deutlichsten reduziert, bei der zugleich die drei Aminosäuren E61, E64 und D90 gegen Alanin ausgetauscht wurden. Das liegt wohl daran, dass jeder dieser Aminosäurereste bereits bei Einzelsubstitution einen negativen Effekt auf die IE1-Bindung hatte und sich diese Einzel-Effekte in der Tripel-Mutante addierten.

Wie erwartet verlor keine der H2A-Varianten komplett die Fähigkeit an das virale Protein zu binden. Diese Beobachtung ist dadurch zu erklären, dass bei dem beschriebenen Experiment das Histon H2A überexprimiert wurde und so wahrscheinlich größere Mengen an H2A, das nicht mit DNA assoziiert war, in den transfizierten Zellen vorlagen. Deshalb wurden wohl zusätzlich DNA-freie Histone über den zweiten Histon-bindenden Bereich (AD1, AD2 und AD3) im IE1 gebunden.

Folglich zeigte auch das um die CTD verkürzte IE1₁₋₄₇₅ eine leichte Interaktion mit (DNA-freiem) H2A.

Insgesamt lassen die hier dargestellten Ergebnisse darauf schließen, dass die Interaktion zwischen der IE1-CTD und dem Histon H2A selektiv durch bestimmte negativ geladene H2A-Reste vermittelt wird, die innerhalb der sauren Tasche auf der Nukleosomen-Oberfläche liegen (E56, E61, E64 und D90). Dagegen sind alle negativ geladenen H2A-Reste, die nicht zur Ausbildung dieser Tasche beitragen, für die IE1-Bindung irrelevant.

1.6 Die IE1- und LANA-CTD konkurrieren um die Bindung an zelluläres Chromatin

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die IE1-CTD über die Bindung in die saure Tasche, die durch das H2A/H2B-Dimer ausgebildet wird, mit Nukleosomen und damit zellulärem Chromatin interagiert. Da diese Art der Wechselwirkung sehr stark die Art der Interaktion der LANA-CTD mit dem zellulären Chromatin widerspiegelt, stellte sich die Frage, ob die CTDs der beiden viralen Proteine die gleiche Bindungsstelle auf der Nukleosomen-Oberfläche nutzen und folglich um diese konkurrieren.

Um diese Fragestellung zu adressieren, wurde die LANA-CTD als EGFP-Fusionsprotein (EGFP-LANA₅₋₂₂) zusammen mit einem HA-IE1-Fusionsprotein (HA-IE1) in H1299-Zellen exprimiert und die Lokalisation der beiden Proteine relativ zu zellulärem mitotischem Chromatin mittels Immunfluoreszenz-Analyse beurteilt (siehe C 5.11). Als Kontrollen wurde EGFP-LANA₅₋₂₂ zusammen mit unfusioniertem HA bzw. HA-IE1 zusammen mit unfusioniertem EGFP exprimiert, wobei die beiden getesteten Proteine (EGFP-LANA₅₋₂₂ und HA-IE1) in mitotischen Zellen, wie erwartet, mit dem kondensierten Chromatin colokalisierten. Jedoch kam es bei gleichzeitiger Expression von HA-IE1 und EGFP-LANA₅₋₂₂ zur teilweisen Freisetzung von GST-LANA₅₋₂₂ vom mitotischen Chromatin, während das HA-IE1 sogar annähernd vollständig durch das LANA-Peptid verdrängt wurde. Wie zu erwarten, colokalisierte das um die CTD verkürzte IE1₁₋₄₇₅ nicht mit den kondensierten Chromosomen und hatte keinerlei Einfluss auf die Chromosomen-Assoziation des EGFP-LANA₅₋₂₂-Proteins (Abbildung D.9).

Dass die beiden CTDs in der Tat um die Bindung an Nukleosomen konkurrieren, konnte auch in *in vitro*-Kompetitionsstudien demonstriert werden (Bernhardt, 2012; siehe auch Mücke et al., 2014). Dazu wurden säureextrahierte Histone aus H1299-Zellen mit steigenden molaren Mengen an IE1-Protein oder mit IE1₁₋₄₇₅ inkubiert und anschließend in *in vitro*-Bindungsstudien mit immobilisiertem GST-LANA₅₋₂₂ eingesetzt. Während IE1 die Bildung von LANA₅₋₂₂/Histon-Komplexen konzentrations-

abhängig inhibierte, zeigte das um die CTD verkürzte IE1 einen wesentlich geringeren negativen Effekt auf die Interaktion zwischen der LANA-CTD und den core-Histonen. Umgekehrt konkurrierte ein synthetisch hergestelltes LANA-CTD-Peptid um die Bindung der IE1-CTD an die core-Histone, während ein mutiertes LANA-Peptid keinen negativen Effekt auf die Bindungs-Effizienz hatte.

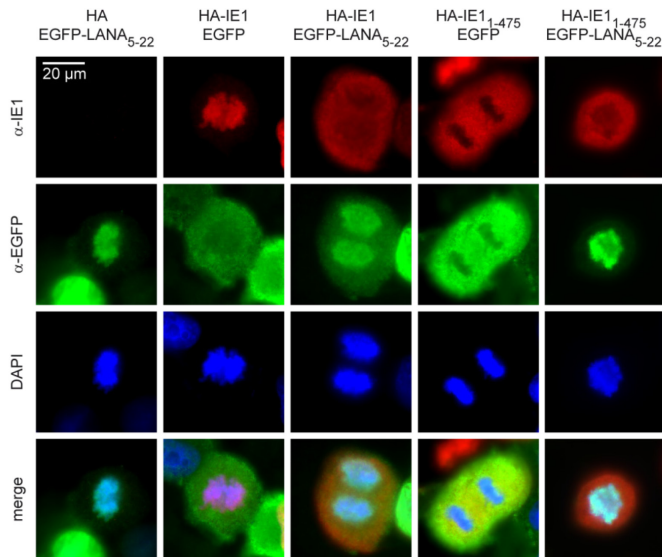


Abbildung D.9: Die HA-IE1- und EGFP-LANA₅₋₂₂-Fusionsproteine konkurrieren um die Assoziation mit zellulärem mitotischem Chromatin. H1299-Zellen wurden mit pcDNA-HA- und pEGFP-Expressionsplasmiden, die für die angegebenen Proteine kodieren, doppeltransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Methanol fixiert, die IE1-Varianten mit einem monoklonalen Antikörper (MAB810R, 217) und einem Alexa Fluor 594-gekoppelten Sekundärantikörper und EGFP mit einem polyklonalen Antikörper (α -GFP, 124) und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper immunologisch detektiert. Zelluläre DNA wurde mit DAPI gefärbt und die Präparate mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Dargestellt sind jeweils repräsentative Einzelbilder gefärbter mitotischer Zellen, sowie die Überlagerung der drei Kanäle.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse stark darauf hin, dass die IE1- und die LANA-CTD dieselbe Bindungsstelle im Nukleosom, nämlich die durch die Histone H2A und H2B ausgebildete saure Tasche nutzen.

1.7 *In silico*-Modell des IE1-CTD/Nukleosom-Komplexes

Die Nutzung derselben Bindungsstelle auf der Nukleosomen-Oberfläche lässt vermuten, dass konservierte Aminosäurereste innerhalb der CTDs der beiden viralen Proteine IE1 und LANA existieren, welche die Wechselwirkung mit den Histonen H2A und H2B vermitteln.

Um diesen Gedanken zu überprüfen, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer (Universität Regensburg) ein Alignment mit den Aminosäuresequenzen der IE1-CTD (IE1₄₇₆₋₄₉₁) und der LANA-CTD (LANA₄₋₁₇) generiert. Das von den verwendeten Software-Programmen (siehe C 5.12) errechnete Alignment beinhaltet in der Tat drei konservierte Aminosäuren sowie eine konservierte und zwei semi-konservierte Substitutionen zwischen der aminoterminalen LANA- und der carboxy-terminalen IE1-CTD (Abbildung D.10 A). Ein zweites Alignment, das nur von dem Programm LALIGN (European Bioinformatics

Institute) errechnet wurde, weist ebenfalls drei konservierte Aminosäuren zwischen den beiden CTD-Sequenzen auf (Daten nicht gezeigt, siehe aber Mücke et al., 2014).

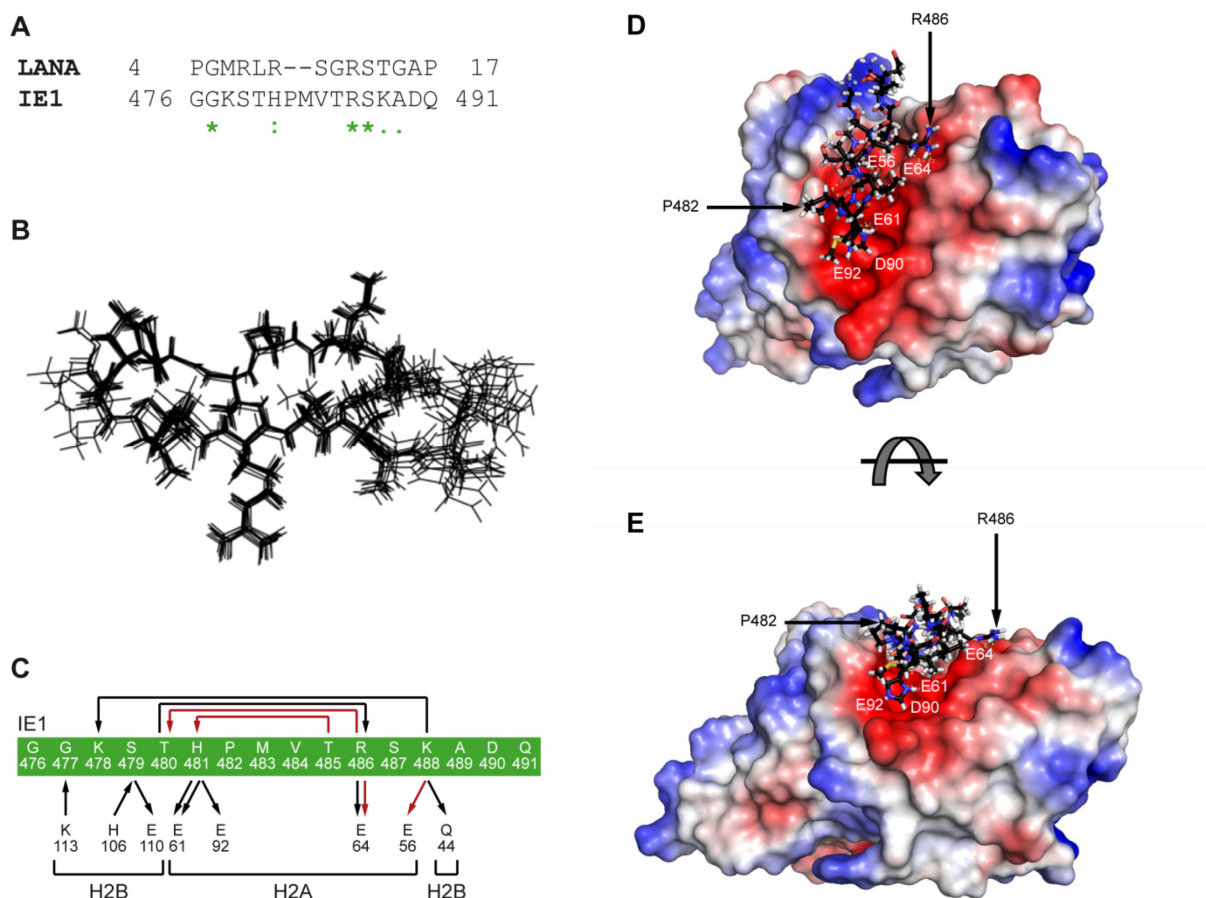


Abbildung D.10: *In silico*-Modell der IE1-CTD im Komplex mit der durch die Histone H2A und H2B ausgebildeten sauren Tasche des Nukleosoms. (A) Darstellung des für das homology modeling herangezogenen Aminosäuresequenz-Alignments der Peptide IE1₄₇₆₋₄₉₁ und LANA₄₋₁₇ (* = konservierte Aminosäure, : = konservierte Substitution, . = semi-konservierte Substitution). (B) Darstellung des Strukturbündels der zehn IE1₄₇₆₋₄₉₁-Strukturen mit niedrigster Gesamtenergie nach Anwendung des Explicit Water Refinement (RMSD = 0,038 nm), basierend auf dem Sequenz-Alignment aus (A) und der Röntgenkristallstruktur des LANA₄₋₁₇/Nukleosom-Komplexes (PDB: 1z1a). (C) Vorhergesagte intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen im IE1₄₇₆₋₄₉₁/Nukleosom-Komplex, basierend auf dem Sequenz-Alignment aus (A) und der Röntgenkristallstruktur des LANA₄₋₁₇/Nukleosom-Komplexes. Schwarze Pfeile symbolisieren vorhergesagte Interaktionen zwischen der IE1-CTD und den Histonen H2A und H2B, die auch im LANA₄₋₁₇/Nukleosom-Komplex vorkommen. Rote Pfeile hingegen symbolisieren vorhergesagte Interaktionen, die für den IE1₄₇₆₋₄₉₁/Nukleosom-Komplex spezifisch sind. Die Pfeile zeigen vom Donor der Wasserstoffbrücken-Bindung zum Akzeptor. (D) Frontansicht des Modells mit der niedrigsten Gesamtenergie der IE1-CTD im Komplex mit dem H2A/H2B-Dimer, basierend auf dem Sequenz-Alignment aus (A) und der Röntgenkristallstruktur des LANA₄₋₁₇/Nukleosom-Komplexes. Das H2A/H2B-Dimer ist in Oberflächen-Darstellung abgebildet, wobei positiv geladene Seitenketten blau und negativ geladene Seitenketten rot gefärbt sind. H2A-Reste, die in Bindungsstudien essentiell für die Interaktion mit der IE1-CTD waren (siehe Abbildung D.8) bzw. im gezeigten Modell als für die Interaktion kritische Reste vorhergesagt wurden, sind angegeben. Das in die saure Tasche eingepasste virale IE1₄₇₆₋₄₉₁-Peptid ist als Stäbchenmodell abgebildet. Zur besseren Orientierung sind die IE1-Reste P482 und R486 durch Pfeile markiert. (E) zeigt das in (D) dargestellte Modell nach einer Drehung um 90° in der angezeigten Richtung. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer, insbesondere mit Bärbel Kieninger und Prof. Dr. Werner Kremer (Universität Regensburg).

Der Unterschied der beiden Alignments basiert hauptsächlich auf der Positionierung der RS-Sequenz innerhalb der IE1-CTD (R486, S487) relativ zu einer der beiden RS-Sequenzen in der LANA-CTD (R9, S10 oder R12, S13). Alle weiteren möglichen Alignments wurden ausgeschlossen, da sie die für die Nukleosom-Bindung benötigten Aminosäuren innerhalb der LANA-CTD nicht beinhalteten.

Basierend auf den zwei oben beschriebenen Aminosäuresequenz-Alignments und der publizierten Röntgenkristallstruktur des LANA₄₋₁₇/Nukleosom-Komplexes (Barbera et al., 2006; PDB: 1zla) wurden zwei Homologie Modelle des IE1₄₇₆₋₄₉₁/Histon-Komplexes erstellt. Mit Hilfe von festgelegten Einschränkungen für Wasserstoffbrücken-Bindungen, interatomare Abstände und dihedrale Winkel wurden für jedes der beiden Modelle, anhand des sogenannten restrained simulated annealing, 1000 mögliche IE1-CTD Strukturen berechnet. Die jeweils zehn stabilsten Strukturen, das heißt diejenigen mit der niedrigsten Gesamtenergie, wurden im sogenannten explicit water refinement weiter prozessiert. Die Berechnungen resultierten schließlich in einem zehn Strukturen umfassenden IE1₄₇₆₋₄₉₁-Strukturbündel für jedes der beiden alternativen Modelle (siehe Abbildung D.10 B und Mücke et al., 2014). Die so erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die IE1-CTD, ähnlich wie die LANA-CTD, eine β -Haarnadelstruktur annehmen kann. Das Strukturbündel des hier vorgestellten Modells ist mit einer mittleren quadratischen Abweichung (root-mean-square deviation, RMSD) des Peptid-Rückgrats von 0,038 nm sehr gut definiert (Abbildung D.10 B), während das alternative Modell mit einem Wert von 0,200 nm wesentlich schlechter definiert ist (Daten nicht gezeigt, siehe aber Mücke et al., 2014). Im dargestellten Modell wird die von der IE1-CTD ausgebildete β -Haarnadelstruktur durch vier intramolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen Atomen der Peptid-Hauptkette stabilisiert. Zusätzlich existieren zehn intermolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen Aminosäureresten der IE1-CTD und des H2A/H2B-Dimers, wobei sich drei der beteiligten Reste auf Seiten des Histons H2A (E56, E61, E64) bereits in Bindungsstudien (siehe Abbildung D.8) als essentiell für die Interaktion mit der IE1-CTD erwiesen (Abbildung D.10 C und Abbildung D.11).

Ein dreidimensionales Modell der IE1-CTD im Komplex mit dem H2A/H2B-Dimer zeigt die exzellente Form- und Ladungs-Komplementarität zwischen dem viralen Peptid und der nukleosomalen sauren Tasche (Abbildung D.10 D, E und Abbildung D.11). Im Gegensatz zu dem hier dargestellten Modell, bildet die IE1-CTD im alternativen Modell nur drei intra- und fünf intermolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen aus (siehe Mücke et al., 2014). Obwohl beide errechnete Modelle die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen der *in vitro*- und *in vivo*-Bindungsstudien größtenteils

bestätigen, favorisieren die *in silico*-Ergebnisse und die Schlussfolgerungen aus den Mutagenese-Experimenten das hier vorgestellte Modell.

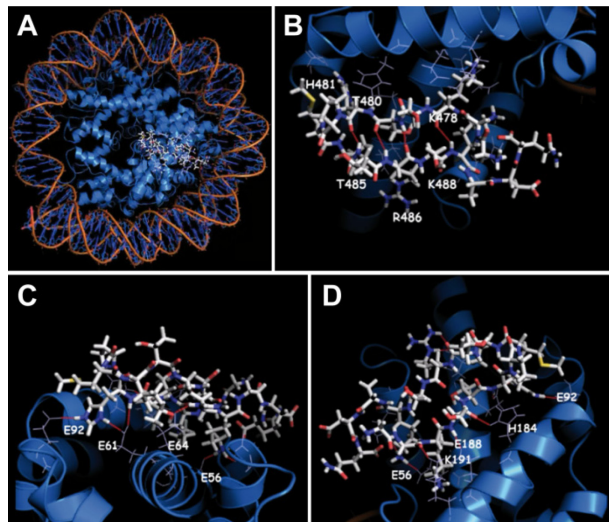


Abbildung D.11: Momentaufnahmen aus einem animierten 3D Modell des IE1-CTD/Nukleosom-Komplexes. Das Histon-Oktamer eines Nukleosoms ist in blau in Ribbon-Darstellung, die um das Oktamer gewundene DNA als orange/blau Doppelhelix gezeigt. Die an die saure Tasche des H2A/H2B-Dimers gebundene IE1-CTD ist als weißes Stäbchenmodell abgebildet. (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme des kompletten Nukleosoms mit der daran gebundenen IE1-CTD, die eine β -Haarnadelstruktur ausbildet. In (B) sind die intramolekularen Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den angegebenen Aminosäureresten des IE1₄₇₆₋₄₉₁-Peptids, die zur Stabilisierung der β -Haarnadelstruktur beitragen, als rot gestrichelte Linien dargestellt. (C und D) zeigen Detailaufnahmen der Wechselwirkung zwischen dem IE1-Peptid und den angegebenen sauren H2A/H2B-Resten. Intermolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen Aminosäureresten der IE1-CTD und den Histonresten sind wiederum als rot gestrichelte Linien dargestellt. Die als Vorlage für diese Abbildung dienende Animation des 3D Modells wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer, insbesondere von Bärbel Kieninger und Prof. Dr. Werner Kremer (Universität Regensburg) erstellt.

Abschließend ist festzuhalten, dass der Großteil der vorhergesagten Interaktionen zwischen der IE1-CTD und dem H2A/H2B-Dimer im favorisierten Modell auch im LANA-CTD/Nukleosom-Komplex vorkommen. Jedoch wurden anhand des Modells ebenso Interaktionen vorhergesagt, die nicht im LANA-CTD/Nukleosom-Komplex auftreten und somit für die Wechselwirkung der IE1-CTD mit der sauren Tasche des Nukleosoms spezifisch sind. Die Interaktion zwischen dem Nukleosom und der IE1- bzw. der LANA-CTD ist somit nicht vollständig, aber teilweise konserviert.

2 Funktionelle Untersuchungen zur IE1-Histon-Interaktion

2.1 Charakteristika der verwendeten hCMV-Stämme

Nachdem die zwei Histon-bindenden Bereiche im IE1-Protein identifiziert und die molekularen Details der Interaktion zwischen der IE1-CTD und zellulärem Chromatin aufgeklärt worden waren, stellte sich im Weiteren die Frage, welche Funktion die Wechselwirkung des IE1-Proteins mit Histonen hat.

Für die nachfolgenden funktionellen Untersuchungen wurden hauptsächlich Infektionsexperimente mit verschiedenen hCMV-Stämmen durchgeführt. Dabei kamen neben dem laboradaptierten Towne (TN)-Stamm die beiden klinischen hCMV-Isolate FIX (FX) und TB40/E (TB) zum Einsatz. Der TN-Stamm wurde ursprünglich

aus dem Urin eines hCMV-infizierten Kindes isoliert, ist jedoch aufgrund der hohen Anzahl an Zellkultur-Passagen an die Vermehrung in humanen Fibroblasten angepasst (laboradaptiert) und gilt als apathogen. Der FX-Stamm wurde aus dem klinischen Isolat VR1814 einer schwangeren Frau mit primärer hCMV-Infektion gewonnen (Hahn et al., 2002), der TB-Stamm aus dem Rachen eines immunsupprimierten Patienten nach Knochenmarktransplantation (Sinzger et al., 1999, 2008). Im Gegensatz zu laboradaptierten hCMV-Stämmen, haben der FX- und der TB-Stamm nur eine sehr begrenzte Anzahl an Passagen in kultivierten Fibroblasten durchlaufen und sind daher weiterhin in der Lage auch andere, physiologisch relevante Zelltypen, wie beispielsweise Endothelzellen oder Monocyten-abgeleitete Zellen, zu infizieren.

Der Verlust des breiten Zelltropismus der laboradaptierten Stämme ist durch Mutationen im UL128-131 Gen-Locus, als Folge der hohen Anzahl an Zellkultur-Passagen in Fibroblasten zu erklären. Im Prinzip können hCMV-Partikel zwei verschiedene Membran-ständige Protein-Komplexe enthalten, die für die Infektion unterschiedlicher Zelltypen verantwortlich sind. Zum einen wird ein Komplex aus den drei hCMV-Glycoproteinen gH/gL/gO, zum anderen ein pentamerer Komplex bestehend aus gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 gebildet. Der Komplex aus gH/gL/gO ist für die Infektion von Fibroblasten wichtig, wohingegen für die Infektion anderer Zelltypen (z.B. Endothel- und Epithelzellen) der pentamere Komplex benötigt wird. Während also die Mutation eines der drei pUL128-131-Proteine bereits den Verlust des breiten Zelltropismus nach sich zieht, ist die Infizierbarkeit von Fibroblasten dadurch nicht betroffen, was die große Mutationshäufigkeit dieser Proteine in laboradaptierten hCMV-Stämmen erklärt (Hahn et al., 2004; Wang und Shenk, 2005; Adler et al., 2006; Ryckman et al., 2008; Freed et al., 2013).

Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine mögliche funktionelle Bedeutung der IE1-Nukleosom-Interaktion nicht nur in Fibroblasten, sondern auch in anderen Zellsystemen untersucht werden sollte (siehe D 2.4.7), war es also unabdingbar auch auf die beiden genannten klinischen hCMV-Isolate zurückzugreifen.

2.2 Histon-bindende Bereiche im IE1-Protein haben keinen Einfluss auf die Nukleosomen-Dichte am viralen Genom

Kürzlich konnte in einer internationalen Kollaboration mit Beteiligung unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das IE1 Protein während der produktiven hCMV-Infektion die globale Nukleosomen-Dichte am viralen Genom reduziert und zusätzlich eine entscheidende Rolle bei der zeitlichen Reorganisation von Nukleosomen entlang

des viralen Genoms spielt (Zalckvar et al., 2013). Jedoch ist der molekulare Mechanismus, der diesen Beobachtungen zugrunde liegt, bisher ungeklärt.

Daher wurde im Folgenden die naheliegende Hypothese untersucht, dass die Eigenschaft des IE1-Proteins Histone zu binden im funktionellen Zusammenhang mit der antagonistischen Wirkung von IE1 auf die Chromatinisierung des viralen Genoms steht. Dazu wurde die Nukleosomen-Okkupanz am viralen Genom in Abhängigkeit verschiedener IE1-Proteinvarianten mittels ChIP-Analysen bestimmt, wobei stellvertretend für das komplette Nukleosom die Besetzung mit dem Histon H3 untersucht wurde. Bei den ChIP-Experimenten wurde ein besonderes Augenmerk auf die im ersten Teil dieser Arbeit identifizierten Histon-bindenden Bereiche innerhalb des IE1-Proteins gelegt, also auf die drei sauren Domänen AD1, AD2 und AD3 sowie auf die CTD.

Die Bereitstellung der verschiedenen IE1-Varianten erfolgte *in trans* anhand von MRC-5-abgeleiteten Zellen, die Doxycyclin-induzierbar das Wildtyp IE1-Protein bzw. die getesteten IE1-Varianten exprimieren. Die Infektion aller Zellen erfolgte mit jeweils derselben Viruspräparation einer IE1-Deletionsmutante des TN-Stammes.

Für die ChIP-Analyse wurden demnach zunächst wachstumsarretierte TetR-IE1dl373-386 (Δ AD1)-, TetR-IE1dl395-409 (Δ S/P)-, TetR-IE1dl421-445 (Δ AD2)-, TetR-IE1dl421-475 (Δ AD3)-, TetR-IE1dl373-420 (Δ AD1-S/P)-, TetR-IE1dl421-475 (Δ AD2-AD3)- und TetR-IE1₁₋₄₇₅-Zellen für 72 h mit Doxycyclin behandelt, um die Expression der verschiedenen IE1-Proteinvarianten zu induzieren. Als Kontrollen dienten TetR-IE1-Zellen bzw. IE1-negative TetR-Zellen, die ebenfalls für 72 h mit Doxycyclin behandelt worden waren. Im Anschluss wurden alle Zellen für 8 h mit dem IE1-defizienten hCMV-Stamm (TNdlIE1) mit einer moi von 0,5 PFU/Zelle infiziert, bevor sie mit Formaldehyd fixiert wurden. Nach Zellyse wurde die DNA durch Ultraschall-Behandlung geschoren und Nukleosomen-assoziierte DNA-Fragmente mit Hilfe eines H3-spezifischen Antikörpers angereichert. Als Spezifitätskontrolle diente eine Immunpräzipitation mit Kaninchen-Präimmenserum (rbIgG). Nach Aufreinigung der DNA in den verschiedenen Proben, wurde diese schließlich mittels q-PCR analysiert (siehe C 5.4).

Die Bestimmung der H3-Besetzung erfolgte exemplarisch am Promotor des viralen E-Gens UL54 (UL54-P), da sich der antagonistische Effekt von IE1 auf die Chromatinisierung des viralen Genoms an diesem Locus in vorangegangenen Experimenten als besonders robust erwiesen hatte. Als Kontroll-Locus diente ein in der transkribierten Region des Haushalts-Gens β -Tubulin (TUBB-T) gelegener Sequenzbereich. Die Mengen an H3-spezifisch copräzipitierter UL54-P-DNA wurden auf die jeweilige Gesamt-DNA (input) normalisiert. Im Anschluss wurden die

entsprechenden IgG-Werte subtrahiert und die Differenz auf die zugehörigen Werte des zellulären Kontroll-Locus normiert. In Abbildung D.12 A ist die so errechnete relative H3-Besetzung am UL54-P für die verschiedenen getesteten IE1-Mutanten und die Kontrollen dargestellt. Um die Expression der jeweiligen *trans*-komplementierenden IE1-Proteinvarianten zu überprüfen, wurde zudem ein kleiner Teil der in die ChIP eingesetzten Zellysate mittels Western Blot analysiert (Abbildung D.12 B).

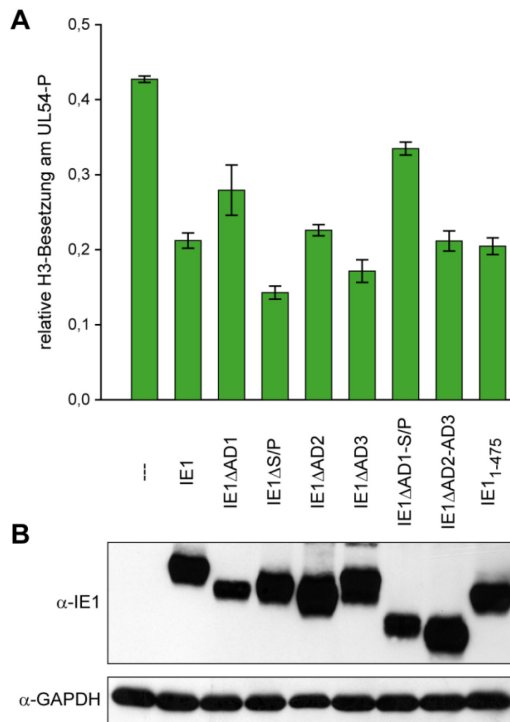


Abbildung D.12: Bestimmung der relativen H3-Besetzung am viralen UL54-P in Abhängigkeit verschiedener IE1-Proteinvarianten. Wachstumsarretierte IE1-negative TetR-Zellen und Zellen, die induzierbar die angegebenen IE1-Proteinvarianten exprimieren wurden für 72 h mit Doxycyclin (insgesamt 1 μ g/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 8 h mit TNdIE1 infiziert (moi = 0,5 PFU/Zelle), bevor sie mit Formaldehyd fixiert wurden. (A) Die Zellysate wurden für ChIP-Analysen mit einem Antikörpern gegen H3 (α -H3, 40) bzw., als Hintergrundkontrolle, mit rbIgG (199) versetzt. Nach erfolgter Immunpräzipitation wurde die Menge an copräzipitierter DNA mittels q-PCR und UL54-P-spezifischer Primer quantifiziert und auf den jeweiligen input-Wert normiert. Nach Abzug der entsprechenden IgG-Werte erfolgte eine weitere Normierung auf das zelluläre Kontrollgen TUBB-T. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten. (B) Die Proteinmengen der *in trans* exprimierten IE1-Varianten wurden durch Western Blot-Analyse bestimmt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 10%-igen SDS-Polyacrylamidgelen. Zur Detektion von IE1 wurde ein monoklonaler Antikörper (α -IE1/IE2, 127), zur Detektion von GAPDH (Ladekontrolle) ein polyklonaler Antikörper (α -GAPDH, 77) verwendet.

Die deutlich erhöhte H3-Besetzung am viralen UL54-P in IE1-negativen Kontrollzellen im Vergleich zu den Wildtyp IE1-exprimierenden Zellen (Faktor 2) konnte in dieser ChIP-Analyse bestätigt werden. Nur zwei der sieben getesteten IE1-Proteinvarianten (IE1 Δ AD1 und IE1 Δ AD1-S/P), denen die Deletion der AD1 gemein ist, zeigten ebenfalls eine leicht erhöhte Histon-Okkupanz verglichen mit dem Volllänge IE1-Protein, wobei diese Effekte wohl auf die deutlich niedrigeren Proteinmengen der *in trans* bereitgestellten IE1-Varianten zurückzuführen sind (siehe Abbildung D.12 B). Überraschenderweise hatte weder die Deletion der CTD, noch die gleichzeitige Deletion der sauren Domänen AD2 und AD3, die jeweils zu einer drastischen Reduzierung der IE1-Histon-Interaktion führen (vgl. Abbildung D.3), einen Einfluss auf die Nukleosomen-Dichte am hCMV-Genom.

Insgesamt zeigen diese ChIP-Daten, dass die Bindung von IE1 an core-Histone wahrscheinlich nicht im funktionellen Zusammenhang mit der antagonistischen Wirkung von IE1 auf die Chromatinisierung des nukleären, viralen Genoms steht.

Jedoch kann anhand dieses Ergebnisses nicht ausgeschlossen werden, dass die Histon-bindenden Domänen im IE1 die im Infektionsverlauf auftretende Nukleosomen-Reorganisation entlang des viralen Genoms regulieren.

2.3 Histon-bindende Bereiche im IE1-Protein haben einen Einfluss auf die transaktivierenden Eigenschaften von IE1

Wie in der Einleitung dargelegt, fungiert das IE1-Protein während einer lytischen hCMV-Infektion als Aktivator viraler E-Gene sowie bestimmter Wirts-Gene (Paulus und Nevels, 2009). Da die Transkription von Genen unter anderem durch die Organisation der DNA in Nukleosomen und dadurch ermöglichte Chromatin-basierte Prozesse reguliert wird, ist es vorstellbar, dass die Wechselwirkung von IE1 mit den nukleosomalen core-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 in Zusammenhang mit der aktivierenden Eigenschaft von IE1 auf die Transkription steht.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Luciferase Reporter Assays durchgeführt (siehe C 5.2). Dabei sollte untersucht werden, inwieweit verschiedene Deletionen in den Histon-bindenden Bereichen des IE1-Carboxy-Terminus die Transaktivierungsfähigkeit des viralen Proteins beeinflussen. Als Effektorplasmide dienten pcDNA-HA-Konstrukte, die für die zu untersuchenden IE1-Proteinvarianten kodieren. Herangezogen wurden die bereits vorgestellten internen IE1-Deletionsmutanten IE1 Δ AD1, IE1 Δ S/P, IE1 Δ AD1-S/P, IE1 Δ AD2, IE1 Δ AD3, IE1 Δ AD1-AD2, IE1 Δ AD2-AD3, IE1 Δ AD1-AD3 und ein um die CTD verkürztes IE1₁₋₄₇₅ (siehe D 1.2 und D 2.2). Da die IE1-Varianten IE1 Δ AD2-AD3 und IE1₁₋₄₇₅ in der Arbeitsgruppe nur im Kontext von pSG5-HA-Plasmiden vorlagen, wurden zunächst die entsprechenden pcDNA-HA-Konstrukte kloniert (siehe C 1.7.2.2.2). Als Positivkontrolle diente das Plasmid pcDNA-HA-IE1, welches für das Volllänge IE1-Protein kodiert, als Hintergrundkontrolle wurde der leere pcDNA-HA-Vektor verwendet.

In zwei getrennten Versuchsansätzen wurden MRC-5-Zellen mit den beschriebenen pcDNA-HA-Konstrukten und einem Reporterplasmid cotransfiziert, bei dem die Expression des Luciferase Gens unter der Kontrolle des hCMV UL112-Promotors (pGL3-UL112plusATF) bzw. des SV40-Promotors (pGL3-Control) steht. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Reporter-genaktivierung der getesteten IE1-Proteinvarianten anhand der enzymatischen Aktivität der jeweils exprimierten Luciferase gemessen (Abbildung D.13 A und B).

Um die Expression der verschiedenen IE1-Proteine zu überprüfen, wurden zudem die Gesamtzelllysate von MRC-5-Zellen, die mit den unterschiedlichen pcDNA-HA-Konstrukten und dem Reporterplasmid pGL3-Control transfiziert worden waren,

mittels Western Blot analysiert und die detektierten IE1-Banden densitometrisch quantifiziert (Abbildung D.13 C).

Alle getesteten HA-IE1-Proteine konnten nach der beschriebenen Doppeltransfektion erfolgreich exprimiert werden. Analog zu vorherigen Experimenten (vgl. Abbildung D.3) wurden jedoch aufgrund unterschiedlicher Transfektions-Effizienzen und/oder Proteinstabilitäten keine gleichmäßigen IE1-Protein-Mengen erreicht. Dennoch war gut zu erkennen, dass die vorliegende IE1-Menge nicht zwingend mit der gemessenen Promotor-Aktivierung korrelierte, was darauf hindeutet, dass die verschiedenen IE1-Proteine im Überschuss vorhanden waren.

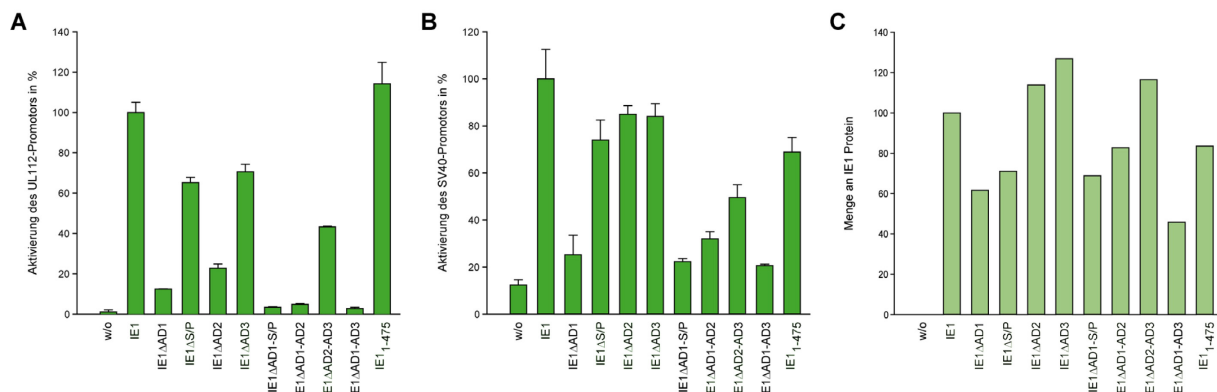


Abbildung D.13: Bestimmung der relativen Aktivierung zweier viraler Promotoren in Abhängigkeit verschiedener IE1-Proteinvarianten. MRC-5-Zellen wurden mit pcDNA-HA-Effektorplasmiden, die für HA (w/o) bzw. die angegebenen HA-IE1-Fusionsproteine kodieren, und mit dem Reporterplasmid pGL3-UL112plusATF (A) bzw. pGL3-Control (B und C) cotransfiziert. (A und B) Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die IE1-abhängige Aktivierung des hCMV UL112- (A) bzw. des SV40-Promotors (B) anhand der enzymatischen Aktivität der exprimierten Luciferase gemessen. Die Transaktivierung durch das Wildtyp IE1 wurde auf 100% gesetzt und gemessen daran die Aktivität der untersuchten IE1-Proteinvarianten errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei biologischen Replikaten. (C) Mit pcDNA-HA- und pGL3-Control-Plasmiden cotransfizierte MRC-5-Zellen wurden 48 h nach Transfektion lysiert. Die löslichen Gesamtzelllysate wurden zum Nachweis der IE1-Proteinvarianten in 10%-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Detektion von IE1 erfolgte durch Western Blot-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper (MAB810R, 127). Die IE1-Banden wurden densitometrisch quantifiziert und die Menge der exprimierten IE1-Proteinvarianten im Vergleich zum Wildtyp IE1 (auf 100 gesetzt) berechnet.

Wie erwartet aktivierte das Wildtyp IE1-Protein die beiden getesteten viralen Promotoren, verglichen mit der leeren Vektor-Kontrolle, um ein Vielfaches (100- bzw. 10-fach). Des Weiteren war zu erkennen, dass die CTD keinen nennenswerten Einfluss auf die Aktivität der untersuchten Promotoren zeigte. Dahingegen hatten manche Deletionen, welche die sauren Bereiche im IE-Protein betreffen, einen deutlich negativen Effekt auf die Aktivität der beiden Promotoren zur Folge. So zeigten IE1-Proteinvarianten mit Deletion der AD1 sowie der AD2 eine deutlich reduzierte Transaktivierung des hCMV UL112-Promotors verglichen mit dem Volllänge IE1. Dieser negative Effekt wurde bei gleichzeitiger Deletion beider saurer Domänen (IE1 Δ AD1-AD2 und IE1 Δ AD1-AD3) verstärkt, sodass die gemessenen Aktivitäten des hCMV UL112-Promotors nahe der Hintergrundaktivität lagen.

Ähnliches war für den SV40-Promotor zu beobachten. Hier zeigten IE1-Proteinmutanten mit Deletion der AD1 bzw. der AD2-AD3 (IE1 Δ AD1, IE1 Δ AD1-S/P, IE1 Δ AD1-AD2, IE1 Δ AD2-AD3, IE1 Δ AD1-AD3) eine drastisch reduzierte Transaktivierung des Promotors im Vergleich zum Wildtyp IE1.

Zusammenfassend kann man aus den dargestellten Daten ableiten, dass die Histonbindung des IE1-Proteins zumindest teilweise mit der Transaktivierung der untersuchten Promotoren korreliert.

2.4 Bedeutung der IE1-CTD für die produktive und nicht produktive Infektion mit klinischen hCMV-Isolaten

2.4.1 Herstellung CTD-defizienter und revertierter TB40/E-Viren

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde ein besonderes Augenmerk auf die Funktion der CTD gelegt, da die Interaktion dieser carboxy-terminalen IE1-Domäne mit den nukleosomalen Histonen H2A und H2B im ersten Teil dieser Arbeit besonders detailliert aufgeklärt werden konnte. Für die nachfolgenden funktionellen Untersuchungen wurde hauptsächlich das klinische hCMV-Isolat TB verwendet, da dieser Stamm, wie unter D 2.1 beschrieben, über einen breiten Zelltropismus verfügt, der bekanntlich ein wichtiges Charakteristikum der β -Herpesviren darstellt. Dadurch war es nicht nur möglich die Funktion der CTD in produktiv infizierten Fibroblasten zu untersuchen, sondern auch in nicht produktiv infizierten myeloiden Zellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen.

Zur Herstellung rekombinanter, CTD-defizienter TB-Viren wurden zunächst, ausgehend von dem Wildtyp Bacmid pTBwt (Sinzger et al., 2008), CTD-defiziente Bacmide generiert. Mittels *en passant*-Mutagenese (siehe C 1.7.2.2.4) wurden dazu die 48 Nukleotide vor dem Stopp-Codon des Exon 4 der MIE-Region (Nukleotide 204720 bis 204767) deletiert, die für die letzten 16 Aminosäuren des IE1-Proteins (CTD) kodieren (pTBIE1₁₋₄₇₅). Analog dazu wurden IE1-defiziente Bacmide konstruiert, bei denen die Nukleotide des Exon 4 sowie Teile der angrenzenden Introns der MIE-Region (Nukleotide 204645 bis 206098) fehlen. Diese pTBdIE1-Bacmide lagen bereits gebrauchsfertig in der Arbeitsgruppe vor. Um ungewollte genetische Veränderungen in den mutierten Bacmiden auszuschließen, wurden zusätzlich revertierte Bacmide generiert, bei denen die deletierten Sequenzbereiche der MIE-Region (Nukleotide 204621 bis 206122) wieder eingefügt wurden (pTBrvIE1₁₋₄₇₅ und pTBrvIE1). In Abbildung D.14 A sind die MIE-Transkriptionseinheiten der neu generierten bzw. gebrauchsfertigen pTB-Bacmide und die davon exprimierten IE-Hauptproteinspezies schematisch dargestellt.

Zur Überprüfung aller, im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendeten, rekombinanten pTB-Bacmide, wurde ein EcoRI-Restriktionsverdau durchgeführt und mit dem ebenfalls EcoRI-verdauten pTBwt-Bacmid verglichen (Abbildung D.14 B und C). Während, wie erwartet, kein Unterschied im Restriktionsmuster zwischen den pTBwt-, pTBIE1₁₋₄₇₅- (2 unabhängige Klone), pTBrvIE1₁₋₄₇₅- und pTBrvIE1-Bacmiden zu erkennen war, verkürzte sich bei den pTBdIE1-Bacmiden (2 unabhängige Klone) durch die Deletion des Exon 4 der MIE-Region erwartungsgemäß die bei pTBwt auftretende ~10 Kb Bande auf ~8,5 Kb. Mit Hilfe der Restriktionsanalyse konnten zudem schwerwiegende, ungewollte genetische Veränderungen der Bacmide, beispielsweise verursacht durch spontane Rekombinationsereignisse, weitgehend ausgeschlossen werden.

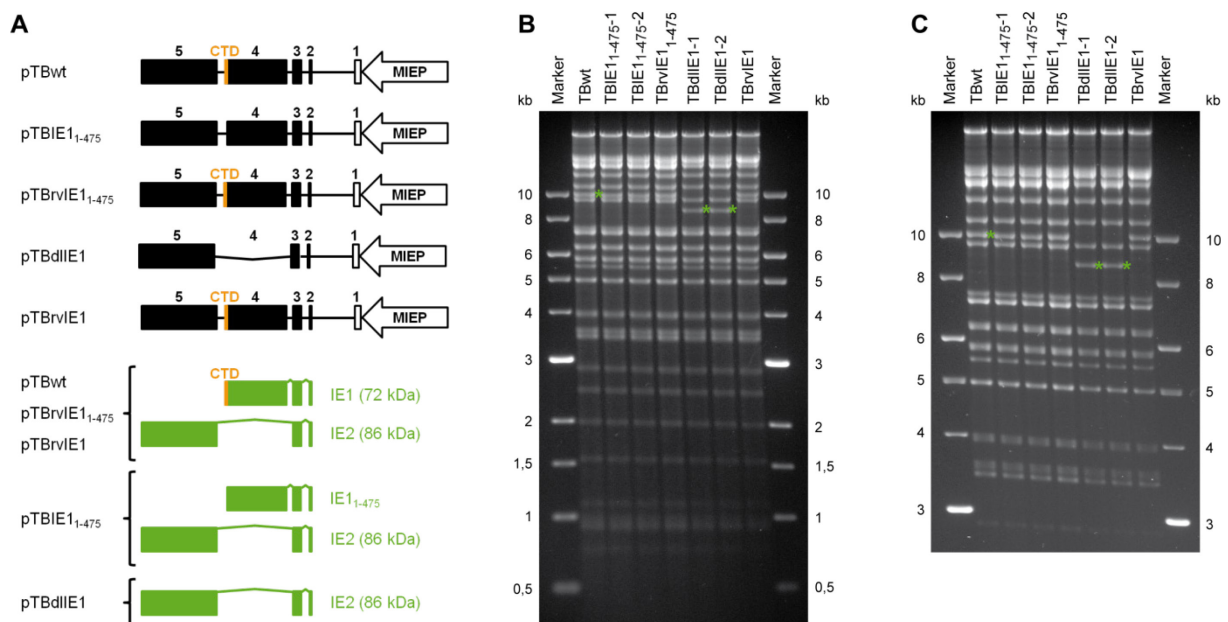


Abbildung D.14: Charakterisierung neu generierter TB-Bacmide. (A) Schematische Darstellung der MIE-Transkriptionseinheit in TBwt-, TBIE1₁₋₄₇₅-, TBrvIE1₁₋₄₇₅-, TBdIE1- und TBrvIE1-Bacmiden. Gezeigt sind die Längen und relativen Positionen der Exons 1 bis 5 sowie des MIE-Promotors. Kodierende Bereiche sind schwarz markiert, wobei die im Exon 4 gelegene CTD orange hervorgehoben ist. Die Exons 2, 3 und 4 kodieren für das IE1-Protein, die Exons 2, 3 und 5 für IE2. In grün sind die von den verschiedenen Bacmiden vorwiegend exprimierten Proteinspezies dargestellt. Während vom TBwt-Genom neben IE2 (86 kDa) das Volllänge IE1-Protein (72 kDa) exprimiert wird, wird ausgehend vom TBIE1₁₋₄₇₅-Genom das um die CTD verkürzte IE1₁₋₄₇₅ produziert. Aufgrund der Deletion des Exon 4 im TBdIE1-Bacmid, wird nur das 86 kDa IE2-Protein gebildet. Da bei den Revertanten-Genomen (TBrvIE1₁₋₄₇₅ und TBrvIE1) die deletierten Bereiche reinsertiert wurden, entspricht das IE1- und IE2-Expressionsmuster wieder dem des pTBwt. (B) Je 3 µg der TBwt-, TBIE1₁₋₄₇₅- (2 Klone), TBrvIE1₁₋₄₇₅-, TBdIE1- (2 Klone) und TBrvIE1-Bacmid DNA wurden mit EcoRI verdaut, elektrophoretisch in einem 0,7%-igen Agarosegel aufgetrennt und schließlich mit Ethidiumbromid gefärbt. (C) zeigt dasselbe Gel nach besserer Auftrennung der großen DNA-Fragmente durch Verlängern der Elektrophorese-Dauer. Die Sterne (*) kennzeichnen die Position einer ~10 Kb großen Bande (pTBwt), die aufgrund der Deletion des Exon 4 in den TBdIE1-Bacmiden durch eine ~8,5 Kb große Bande ersetzt wird.

Durch Transfektion von MRC-5- bzw. TetR-IE1-Zellen (IE1-Deletionsmutanten) mit den verschiedenen infektiösen Bacmiden konnten rekombinante Viruspartikel rekonstituiert werden (siehe C 3.1). Durch Ernte der Zellkulturüberstände mit nachfolgender Zentrifugation wurden Zelltrümmer-freie Viruspräparationen in

Serum-haltigem Medium gewonnen. Mit Hilfe von PCR-Analysen aller in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Viruspräparationen, wurden mögliche Mycoplasmen-Kontaminationen ausgeschlossen. Die gemessenen Titer der verschiedenen Viruspräparationen waren sehr gleichmäßig und unterschieden sich höchstens um den Faktor 2,5 (Daten nicht gezeigt).

2.4.2 Vergleichende Analyse der IE1- und IE2-Expressionskinetiken sowie der IE1-Lokalisation in produktiv infizierten Zellen

Zur Charakterisierung der hergestellten TB-Deletionsmutanten und -Revertanten auf Proteinebene, wurden die Expressionskinetiken der IE1- und IE2-Proteine im Verlauf der lytischen hCMV-Infektion sowie die Lokalisation der IE1-Varianten relativ zu zellulärem mitotischem Chromatin im Vergleich zum TBwt-Virus untersucht.

Hierzu wurden zunächst wachstumsarretierte MRC-5-Zellen mit der jeweils gleichen Anzahl infektiöser TBwt-, TBrvIE1₁₋₄₇₅⁻, TBIE1₁₋₄₇₅⁻¹-, TBIE1₁₋₄₇₅⁻²-, TBrvIE1-, TBdlIE1-1- und TBdlIE1-2-Viruspartikel (siehe C 4.1) oder mock infiziert (moi = 3 PFU/Zelle). Die Zellen wurden 6, 24, 48 und 96 h nach Infektion geerntet, lysiert und die löslichen Gesamtzellextrakte schließlich mittels Western Blot unter Verwendung eines IE1/IE2-spezifischen Antikörpers analysiert. Als Ladekontrolle wurde außerdem zelluläres GAPDH detektiert (Abbildung D.15 A).

Während die von den TBIE1₁₋₄₇₅-Virusgenomen exprimierten, um die CTD verkürzten IE1-Proteine mit Wildtyp IE1-ähnlicher Kinetik und Wildtyp-IE1-ähnlichen Gleichgewichtsmengen nachgewiesen werden konnten, wurde wie erwartet kein IE1 in den Gesamtzellextrakten der TBdlIE1-infizierten Zellen detektiert. Auch das IE2-Expressionsmuster war zwischen Wildtyp und CTD-defizienten Viren vergleichbar, wohingegen die von den TBdlIE1-Genomen exprimierten Mengen an IE2 48 und 96 h nach Infektion im Vergleich zum TBwt leicht reduziert waren. Die eingeschränkte Expression von IE2 bei Fehlen von IE1 ist wohl durch die Autoregulation des MIEP durch diese beiden Proteine zu erklären: Während das IE1-Protein seinen eigenen Promotor aktiviert, wird dieser durch das IE2-Protein reprimiert (Sambucetti et al., 1989; Macias und Stinski, 1993; Mocarski et al., 1996). Abschließend ist festzuhalten, dass bei beiden Virus-Revertanten (TBrvIE1₁₋₄₇₅ und TBrvIE1) der Wildtyp-Zustand bezüglich der MIE-Proteinexpression wieder hergestellt werden konnte.

Um nun die IE1-Proteine, die von den verschiedenen Virusgenomen exprimiert werden, auf deren Fähigkeit zu untersuchen mit mitotischen Chromosomen der Wirtszelle zu assoziieren, wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Dafür wurden subkonfluente MRC-5-Zellen mock bzw. mit den genannten TB-

Virusvarianten mit einer *moi* von 0,06 PFU/Zelle infiziert und ungefähr 48 h später mit Methanol fixiert. Im Anschluss wurden die IE1-Proteine immunologisch gefärbt und deren Lokalisation relativ zu zellulärem mitotischem Chromatin mittels IF-Mikroskopie beurteilt (Abbildung D.15 B).

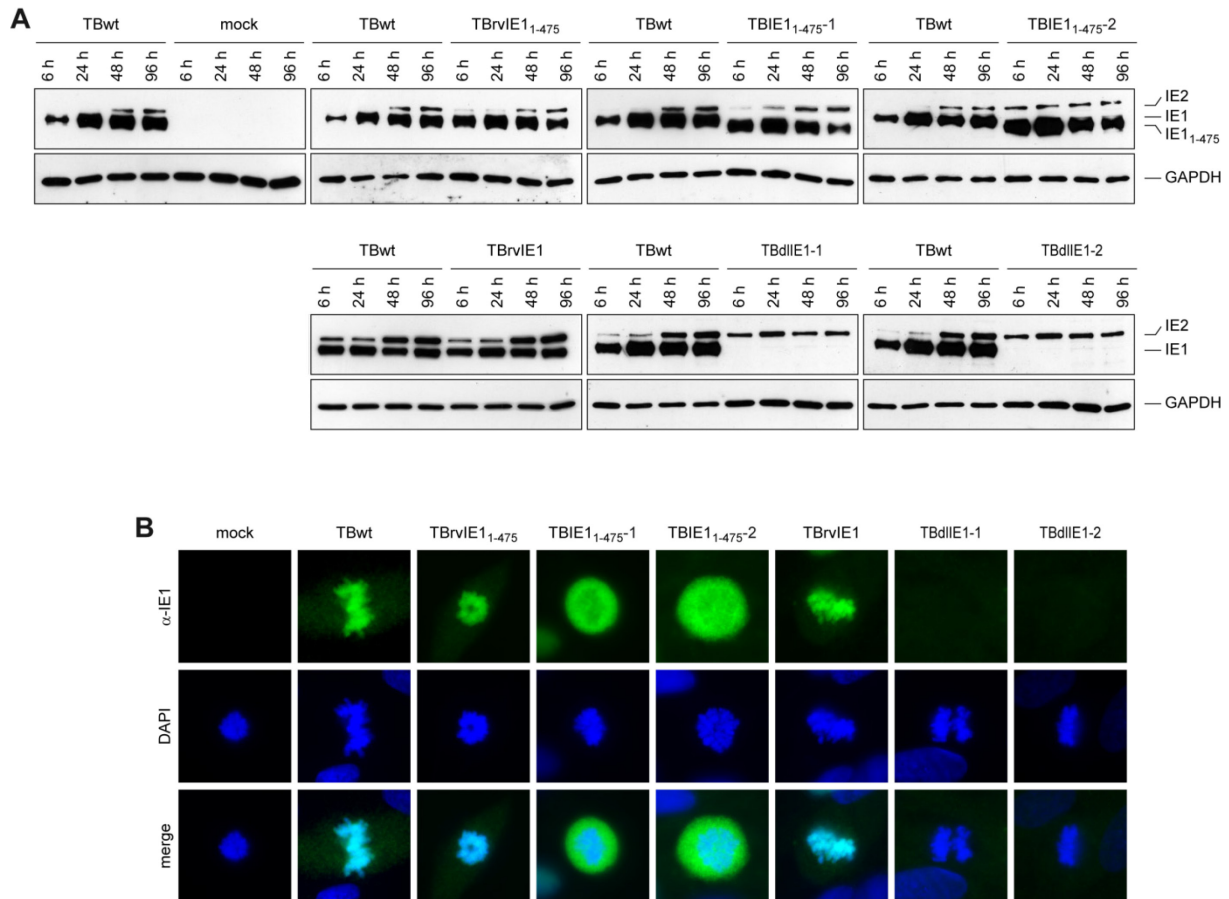


Abbildung D.15: Analyse der Gleichgewichtsmengen und Chromatin-Assoziation von IE-Proteinen in hCMV-infizierten Zellen. (A) Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden mit TBwt, TBrvIE1₁₋₄₇₅, TBIE1₁₋₄₇₅ (2 unabhängige Klone), TBrvIE1 und TBdlIE1 (2 unabhängige Klone) mit einer *moi* von 3 PFU/Zelle oder mock infiziert. Die Zellen wurden 6, 24, 48 und 96 h nach Infektion geerntet, lysiert und die Proteine in den Gesamtzellextrakten in 10%-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis der viralen Proteine IE1 und IE2 erfolgte durch Western Blot-Analyse mit einem IE1/IE2-spezifischen monoklonalen Antikörper (MAB810R, 127). Als Ladekontrolle wurde das zelluläre Protein GAPDH mit einem polyklonalen Antikörper (α -GAPDH, 77) nachgewiesen. (B) Subkonfluente MRC-5-Zellen wurden mit TBwt, TBrvIE1₁₋₄₇₅, TBIE1₁₋₄₇₅ (2 unabhängige Klone), TBrvIE1 und TBdlIE1 (2 unabhängige Klone) mit einer *moi* von 0,06 PFU/Zelle oder mock infiziert und ca. 48 h später mit Methanol fixiert. Anschließend wurde IE1 mit einer 1:1 Mischung zweier monoklonaler Antikörper (α -IE1 [IE1 G10], 215 und α -IE1 [6E1], 216) und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper immunologisch detektiert. Zelluläre DNA wurde mit DAPI gefärbt und die Präparate schließlich mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Dargestellt sind jeweils repräsentative Einzelbilder gefärbter mitotischer Zellen, sowie die Überlagerung der beiden Kanäle. Die Teilabbildung (B) wurde in Zusammenarbeit mit Kathrin Schön im Rahmen ihrer Master-Arbeit angefertigt.

Anhand der Beobachtungen der Immunfluoreszenz-Studie konnten die Ergebnisse der Western Blot-Analyse, in Bezug auf das Fehlen von IE1 nach Infektion der MRC-5-Zellen mit TBdlIE1-Viren, auf Einzelzellebene bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das nach Infektion mit TBIE1₁₋₄₇₅-Viren exprimierte verkürzte IE1-Protein, im Gegensatz zum Volllänge IE1, erwartungsgemäß nicht mit

zellulären Chromosomen colokalisiert. Dahingegen ergaben beide Revertanten-Viren bezüglich der Assoziation von IE1 mit zellulärem Chromatin das gleiche Bild wie das TBwt-Virus.

Insgesamt konnte anhand dieser Ergebnisse die Identität und Funktionalität der im Rahmen dieser Arbeit generierten TB-Viruspräparationen auf MIE-Proteinebene bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die CTD auch im Kontext einer Infektion mit dem klinischen hCMV-Stamm TB für die Assoziation von IE1 mit zellulärem mitotischem Chromatin essentiell ist, was bislang nur für den laboradaptierten TN-Stamm nachgewiesen wurde (Shin et al., 2012).

2.4.3 Bedeutung des IE1-Proteins und dessen CTD für die Replikation des klinischen TB40/E-Stammes in produktiv infizierten Zellen

Nach Charakterisierung der verschiedenen TB-Viren auf MIE-Proteinebene, sollte nun die Bedeutung des Volllänge IE1-Proteins und der CTD-vermittelten IE1-Nukleosom-Interaktion für die Replikation des klinischen hCMV-Isolats TB im zeitlichen Verlauf einer produktiven Infektion untersucht werden.

Dafür wurden MCR-5-Zellen mit hoher ($moi = 3$ PFU/Zelle) und niedriger ($moi = 0,03$ PFU/Zelle) Multiplizität mit TBwt-, TBrvIE1₁₋₄₇₅⁻, TBIE1₁₋₄₇₅⁻¹-, TBIE1₁₋₄₇₅⁻²-, TBrvIE1-, TBdIE1-1- oder TBdIE1-2-Viren infiziert. Als Marker für die Virusreplikation wurde die Menge an im Kulturmedium akkumulierender, extrazellulärer viraler DNA im Abstand von einem Tag (hohe moi) bzw. zwei Tagen (niedrige moi) mittels q-PCR und UL54-P-spezifischer Primer quantifiziert (Abbildung D.16 A, C, E und G).

Des Weiteren wurden die Endpunkttiter der virushaltigen Überstände von Tag 7 (hohe moi) bzw. Tag 16 (niedrige moi) der Replikations-Analyse ermittelt. Zu diesem Zweck wurde die Anzahl an infektiösen Nachkommenviren in den Kulturüberständen mittels Plaque Assay quantifiziert, wobei die Überstände der IE1-Deletionsmutanten nicht auf MRC-5- sondern auf komplementierenden TetR-IE1-Zellen titriert wurden (Abbildung D.16 B, D, F und H).

Die Quantifizierung der extrazellulären viralen DNA ergab, dass das Volllänge IE1-Protein für die effiziente Replikation von TB-Viren nicht nur unter „single-hit“-Bedingungen (niedrige moi) sondern auch nach Infektion mit hoher Multiplizität benötigt wird. So zeigten beide IE1-Deletionsmutanten einen deutlichen Replikationsdefekt verglichen mit dem TBwt- und dem TBrvIE1-Virus (Abbildung D.16 A und C). Auch die Anzahl an produzierten infektiösen Nachkommenviren war im Vergleich deutlich reduziert (Abbildung D.16 B) bzw. lag sogar unter der Nachweisgrenze (Abbildung D.16 D).

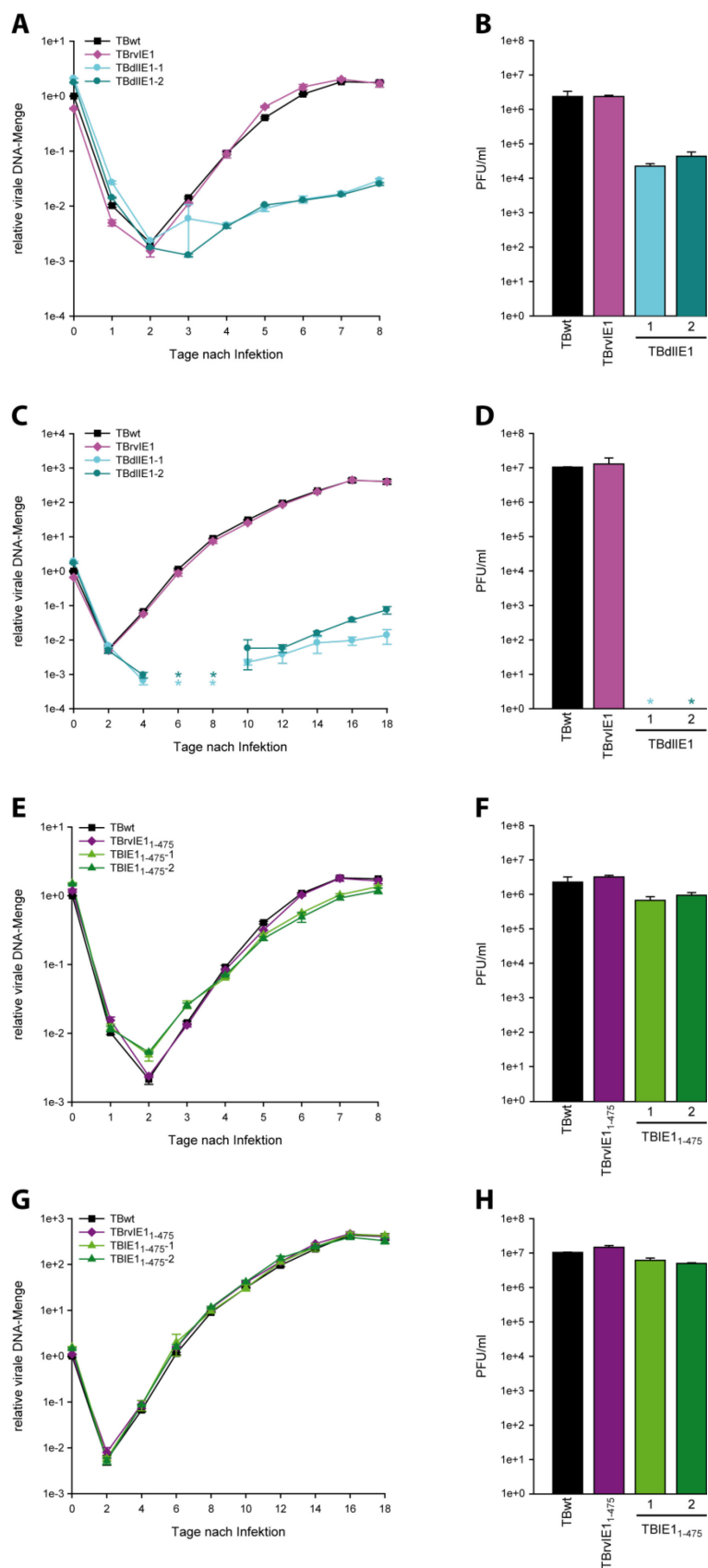


Abbildung D.16: Analyse der Replikationskinetiken und Endpunkttiter der CTD- und IE1-defizienten TB-Viren sowie deren Revertanten nach Infektion von MRC-5-Zellen mit hoher und niedriger Multiplizität. (A und E) MRC-5-Zellen wurden mit TBwt, TBvIE1 und TBdIE1 (2 unabhängige Klone) (A) bzw. mit TBwt, TBvIE1₁₋₄₇₅ und TBIE1₁₋₄₇₅ (2 unabhängige Klone) (E) mit einer moi von ~3 PFU/Zelle infiziert. Die Menge an extrazellulärer viraler DNA im Kulturüberstand wurde täglich mittels q-PCR quantifiziert und auf die virale DNA-Menge von TBwt an Tag 0 (auf 1 gesetzt) normiert. (B und F) Extrazelluläre, infektiöse Nachkommenviren in den Kulturüberständen von Tag 7 (A bzw. E) wurden mittels Plaque-Assay auf MRC-5-

bzw. komplementierenden TetR-IE1-Zellen (TBdIE1) quantifiziert. (C und G) MRC-5-Zellen wurden mit TBwt, TBvIE1 und TBdIE1 (2 unabhängige Klone) (C) bzw. mit TBwt, TBvIE1₁₋₄₇₅ und TBIE1₁₋₄₇₅ (2 unabhängige Klone) (G) mit einer *moi* von $\sim 0,03$ PFU/Zelle infiziert. Die Menge an extrazellulärer viraler DNA im Kulturüberstand wurde alle zwei Tage mittels q-PCR quantifiziert und auf die virale DNA-Menge von TBwt an Tag 0 (auf 1 gesetzt) normiert. (D und H) Extrazelluläre, infektiöse Nachkommenviren in den Kulturüberständen von Tag 16 (C bzw. G) wurden mittels Plaque-Assay auf MRC-5- bzw. komplementierenden TetR-IE1-Zellen (TBdIE1) quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei biologischen und zwei technischen Replikaten. Sterne (*) kennzeichnen Werte unter der Nachweisgrenze.

Im Gegensatz dazu zeigten die CTD-defizienten Viren keine attenuierte Replikation im Vergleich zum Wildtyp-Virus und der entsprechenden Revertante, sodass sowohl nach Infektion mit hoher Multiplizität als auch nach Infektion mit niedriger Multiplizität eine vergleichbare Menge an extrazellulärer viraler DNA (Abbildung D.16 E und G) sowie eine vergleichbare Anzahl infektiöser Nachkommenviren nachgewiesen werden konnte (Abbildung D.16 F und H).

Anhand dieser Ergebnisse können mehrere Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum einen ist die Replikation des TB-abgeleiteten dIE1-Virus deutlich stärker (und somit auch unter Bedingungen hoher *moi*) attenuiert als die Replikation einer vergleichbaren Mutante des laboradaptierten TN-Stammes (Greaves und Mocarski, 1998). Ähnliche Beobachtungen wurden in unserer Arbeitsgruppe mit einem weiteren klinischen hCMV-Isolat (FX) gemacht (Fink, 2012). Dies deutet darauf hin, dass dem IE1-Protein während der produktiven Infektion mit klinischen hCMV-Isolaten eine kritischere Rolle zukommt als während der produktiven Infektion mit laboradaptierten hCMV-Stämmen. Zum anderen ist die IE1-CTD, und somit die Interaktion von IE1 mit dem nukleosomalen H2A/H2B-Dimer, für die Replikation des hCMV-Stammes TB in produktiv infizierten Zellen offensichtlich nicht von Bedeutung, was in unserer Arbeitsgruppe auch für den FX-Stamm gezeigt werden konnte (Fink, 2012; siehe auch Mücke et al., 2014). Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen einer kürzlich veröffentlichten Studie überein, in der eine CTD-defiziente Mutante des laboradaptierten TN-Stammes untersucht wurde (Shin et al., 2012).

2.4.4 Die CTD stellt einen selektiv hoch konservierten Bereich innerhalb des IE1-Proteins dar

Betrachtet man den Konservierungsgrad des IE1-Proteins zwischen verschiedenen Primaten CMV-Spezies so fällt auf, dass die Sequenzübereinstimmungen zwischen den orthologen Volllänge IE1-Proteinen sehr limitiert sind. Interessanterweise stellt die CTD und, in einem noch größeren Maße das NBM, den am stärksten konservierten Bereich innerhalb des IE1-Proteins dar. Besonders hoch konserviert sind dabei die Aminosäuren innerhalb des NBM, die für die Interaktion der IE1-CTD mit dem Nukleosom und mit zellulären Chromosomen essentiell sind (Abbildung D.17).

A

Humanes (Towne)	1	MESS-AKRRKMPD-----NPDGPPSSK-----VPRP-----ETPVTRKATTFLOQMLRKEVNV--SOLSL	50
Schimpanzen	1	MESSSGKRRKMSA-----NPDGPPSSK-----IPRP-----ETPVSKACAFITSMIQKQVNV--SOLNL	51
Grüne Meerkatzen	1	MDPRQTARKADDQPPQHTEGGDPGEGTSAG--PEFCPSPPKMSRYDDPGT-ERAVQLEKLELEPTK--AVLNL	69
Rhesusaffen	1	MDSR--KRPPEDE-THTGEAGDPEEGTSGG--PSTGSPPKQAR--KDMALQHAVDLLEKMLADEBEKLTFEFL	67
Rhesusaffen (68-1)	1	MDSR--KRPPEDE-THTGEAVDPEEGTSGG--PSTGSPPKQAR--KDMALQHAVDLLEKMLADEBEKLTFEFL	67
Pavian	1	MDPRQLKRRKADDE--QQSQGDEGEGPSSGSPAPGSPPKMPREDKNIHDEAVEFLEKLAQETN--VVLISL	70
Humanes (Towne)	51	GDPLPELA---EESLKTFRVETEDCNENPEKVDLAEVLKQIKVRVDMVRHRIKEHMLKKYTQTEEEKTGAENM	121
Schimpanzen	52	GDPLFPDVS---EDDLKSFEDVTKCEDENPGKDILQELVKQIKVRVDIVRQVKVTHMLTKYTMQDEKTAFAENM	122
Grüne Meerkatzen	70	GDPLFGYANVPEDEQFKTLEEIMNEDDQDPLR-KVOTLVYQIKLRVARTHTTEIKNQHLQDFNDIRMGMEGKFKQ	142
Rhesusaffen	68	GDPLEESA---NDDPIKTLLEEIIQEG-DDVVG-AHQLVVTQIKLRVQRNRLADEIIREQLDIRKVSDFKFEK	136
Rhesusaffen (68-1)	68	GDPLEESA---NDDPIKTLLEEIIQEG-DDVVG-AHQLVVTQIKLRVQRNRLADEIIREQLDIRKVSDFKFEK	136
Pavian	71	GDPIHLHSPVEEVNMQSFDILLNPNPQGDVIR-QTONVWVQIKRLARNHTSHKNEGLFQLNQIRLEMGKEEVE	143
Humanes (Towne)	122	MGGCLQNALDILDKVHEPPEEMKCIGLVMQSMYENYIIVE--EDKREMMWACIKELHVDVSKGAANKLGGALQAKA	193
Schimpanzen	123	MGGCLQNALDILDKVNEPFEDMKCIQVIMQNMENYIYVVT--EESRDWLQCLKDLHDVAKNAASKLGNALKAKA	194
Grüne Meerkatzen	143	LQDGVNNSIDLLKVMPEFLGGKGLIQLEDTCPILQFL--FVLQDKFIECVKLADETVNMTQMFETALNEKV	214
Rhesusaffen	137	LEQGIQNSYLLDLKLVFPQNMRCLEFVANEQFNDTPVP--PQYKEKFMVCLKEIVQYAVNSSGKLEKFMILK	208
Rhesusaffen (68-1)	137	LEQGIQNSYLLDLKLTPEQDMRCLEFVANEQFNDTPVP--PQYKEKFMVCLKEIVQYAVNSSGKLEKFMILK	208
Pavian	144	VQNEMRGAMNVNKLPSDKDKGLIQTYDMLCDYQMRGSEISHKHTAEVQLTAQMAVKLAKLEIINYRV	217
Humanes (Towne)	194	RAKKDELRRKMMYMCYRNIEFFTKNSAFFKTTNGCSQAMAALQNLPOCS-PDEIMAYAQKIFKILDEERDKVLT	266
Schimpanzen	195	QAKKEELNRKMTYIALKHVEFFTKNSAFFKTTNGTSAIAALQSFHQCS-PEEVKCHAQIRIMKTLDEERDKVLL	267
Grüne Meerkatzen	215	EMKQKDLQNRILYTHFKYSVMTVNSVTTFNLSHGITQALIFLRGLPLHDDPETMINSGLNIIKPLDGGQTDLQI	288
Rhesusaffen	209	KTKKGDIDRVTYTCMKYLLMAMQGTGGPKAINNEEHVKLEFKQLSNYDLDLTDANSAGLELIKLLDDQKEVVF	282
Rhesusaffen (68-1)	209	KTKKDDIKRVTYTCMKYLLMAMQGTGGPKAINNEEHKLFKQLSNYDLDLDANHDGLELIKLLDKQKEVAF	282
Pavian	218	EQKKNCIYESLHATYAYAVQVNSICLEKTVNSQEAIMEFLRGLPQHDGMEDEVVRCQQVQVMDMLDKPNEIMN	291
Humanes (Towne)	267	HIDHIFMDILTTCVETMCNEYKVTSDACMMTYGGISLSEFCRVLSCVLEETSVMIAKRPLITKPIVISVMK	340
Schimpanzen	268	HIDNIFMDILTTCVETMGNEYKVTSDASMMTYGATSLTFEFCRVLSCVILESSVMIAARQITKEDLVSTMT	341
Grüne Meerkatzen	289	ENA-KFDALLLNIMNAFYKEGSKQNDTEIMLSVYPIQOTSIIIMNSLSAFLCDETAQIMYSKSHLSTETIIVKLM	361
Rhesusaffen	283	HVN-SFTHLVTTLGMALYKEGHQKNDAMLMGHTFITMLSDQVRVILLYLIDEIVHAIHTNSQNSDELIDGLK	355
Rhesusaffen (68-1)	283	HVN-NFTHLVTTLGMALYKEGHQKNDAMLMGHTFITMLSDQVRVILLYLIDEIVHAIHTNSQNSDELIDGLK	355
Pavian	292	FSG-MFKHMLSEIKLAFRKECSLTTKYLMQFAFVTOATAWVNTLSAFLCHETADIVLRNPQITVEIVVKKMD	364
Humanes (Towne)	341	RRTEEICMRVFAQYLLG-ADPLRVCSPSVDLRLAIAEESDEEBAIVAYTLATRGASSDSSLVSPPEPVP--AT	411
Schimpanzen	342	RRIQEICMRVFAQYLLG-CDPLRVCSPSVDLRLAIAEESDEDEAIAAHVRATAVSSP---ISPDSVPVSESD	410
Grüne Meerkatzen	362	PKIQYLVREMYLKMCDKTKIKIWS--LAEIREIVNDNEREASYPVTTGGVLPENVPSPDIPESVMLYSDTE	433
Rhesusaffen	356	PKVRIVINEFHATLMMG-TDRMRFYS--ISELRDIVNDKLNDRFP-VVSGVLPENVPGTDIPLASVIIHSDTE	425
Rhesusaffen (68-1)	356	PKVRIVINEFHATLMMG-IDKMKFYS--LNELRDIVNDKINDRFP-VVSGVLPENVPGTDIPLASVIIHSDTE	425
Pavian	365	FKIRAIVRDMFLKVVDRDKVKVTS--LEDFRKLKEAEDEELLANIIGGDFPFAVMPRSESD---ESEE	432
Humanes (Towne)	412	IPLS-----SIVIVANSQD--EESQSDDEEEGAQBER---EDTVSVKSEPVSE---455	
Schimpanzen	411	IPLG-----HVTVAETSDEEADGEEESQAEVEEETQEEEGEA-DDSVSVKSEPESEGEV	463
Grüne Meerkatzen	434	E-----EESAEEETTAEEAEAEQ-ETQIEQGTQAEEGQVEAEETESEMVIPETEQGE	487
Rhesusaffen	426	DEEEQSDADEEEQESETDEGEGAEETQAEETEETGDETDIEGTESETQIGSEAQPEAAESETQVEQ	499
Rhesusaffen (68-1)	426	D-----EEQESEADDEQESETDEGEGAEETQAEETDEGDETDIEGTESETQIGSEAQPK-AESETQIEQ	489
Pavian	433	E-----EQAEDEEVEETESEEEEQADTQAEETQVEEEQAAQTEEGQAEQAEQAEQAEQ	487
Humanes (Towne)	456	---EIEEVAPEEEDG-----AEEPTASGGKSTHPMVRTRSKADQ--491	
Schimpanzen	464	HHAELVEVKDEDTDSGEV-----EEEQPASGRKTHPMVTRSKADQ--505	
Grüne Meerkatzen	488	TQAEETEGKAEESDDETEIEEELVGTVLRAGKIKKGGDDGEGS--KSSHMPVMTSKTKDPE	546
Rhesusaffen	500	TEGETEVETPQETEEGDEEEDLQMTVIKYAKPHVKEEGAGPSSKSLHPMQTRSRDK--558	
Rhesusaffen (68-1)	490	TEGETEVETPQETEEGDEEEDLQMTVIKYAKPHVKEEGAGPSSKSKHMQTRSRDK--548	
Pavian	488	QAEQAESESEEEESLSEVEVII--LFGAGRPOVK-QEPEPS--TSHPMVTRSKKSH--541	

CTD
NBM

B

GenBank	CMV	IE1	CTD	NBM
AAR31448	Humanes (Towne)	100	100	100
AAM00752	Schimpanzen	67.2	87.5	90.0
AAB16882	Grüne Meerkatzen	26.3	62.5	80.0
AAB00487	Rhesusaffen	25.1	62.5	80.0
AAZ80666	Rhesusaffen (68-1)	24.2	56.3	70.0
ACX71624	Pavian	23.9	56.3	90.0

C



Abbildung D.17: Konservierung des IE1-Proteins im Lauf der Primaten CMV Evolution. (A) Dargestellt ist ein Aminosäure-Sequenzalignment orthologer Volllänge IE1-Proteine des hCMV (TN) und aller in der GenBank (National Center for Biotechnology Information, Benson et al., 2012) aufgeführten, nicht-humanen Primaten CMV-Spezies, darunter Schimpanzen CMV (panines Herpesvirus 2), Grüne Meerkatzen (simian) CMV (cercopithecines Herpesvirus 5), Rhesusaffen CMV (*Macaca mulatta* CMV und macacines Herpesvirus 3, Stamm 68-1) sowie Pavian CMV. Das Sequenzalignment wurde mit ClustalW2 (European Bioinformatics Institute) erstellt und mit Jalview 2.7 (Waterhouse et al., 2009) weiterbearbeitet. Der Konservierungsgrad der Aminosäuren wird durch die Blauschattierung angezeigt. Die CTD- und NBM-Sequenzen im carboxy-terminalen IE1-Proteinbereich sind markiert. (B) Die dargestellte Tabelle beinhaltet die GenBank Zugangs-Nummern der für das Alignment (A) verwendeten, orthologen IE1-Sequenzen der einzelnen Primaten CMV-Stämme. Zudem ist der jeweilige Prozentsatz an übereinstimmenden Aminosäuren für die Volllänge IE1-Proteine, die IE1-CTDs und die IE1-NBMs verglichen mit dem IE1 des hCMV (TN) angegeben. Die Berechnung erfolgte dabei anhand von paarweisen Sequenzalignments (Volllänge IE1-Proteine) bzw. mit Hilfe des in (A) gezeigten Alignments (CTDs und NBMs). (C) Dargestellt ist ein mit WebLogo 2.8.2 (Crooks et al., 2004) generiertes Sequenz-Logo,

das den Konservierungsgrad der einzelnen Aminosäuren der orthologen IE1-CTDs der verschiedenen Primaten CMV-Spezies veranschaulicht. Die Nummerierung unterhalb des Logos bezieht sich auf die Positionen der einzelnen Aminosäuren in der IE1-Proteinsequenz des hCMV (TN). Die Aminosäurepositionen im Zentrum der CTD, welche das NBM umfassen, sind fett-gedruckt hervorgehoben, wobei solche, die sich für die IE1-CTD-Nukleosom-Interaktion als essentiell erwiesen, zusätzlich unterstrichen sind.

Es erscheint demnach äußerst unwahrscheinlich, dass ein derart hoch-konservierter Proteinbereich keine Funktion für die hCMV-Infektion hat. Viel wahrscheinlicher ist es, dass die CTD-vermittelte IE1-Nukleosom-Interaktion eine Funktion während der nicht produktiven Infektion und/oder der Infektion anderer Zelltypen besitzt.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte deshalb eine mögliche funktionelle Bedeutung der IE1-CTD im Hinblick auf die persistierende hCMV-Infektion und dafür benötigte molekulare Mechanismen untersucht werden.

2.4.5 IE1-abhängige intrazelluläre Lokalisation von hCMV-Genomen

Aufgrund der Analogien zwischen der Nukleosom-Assoziation des LANA- und des IE1-Proteins wäre es vorstellbar, dass den beiden viralen Proteinen ähnliche Funktionen während einer persistierenden Infektion der entsprechenden Viren zukommen. So ermöglicht LANA die Erhaltung viraler Genome während der persistierenden Infektion u.a. durch Anheftung der viralen Episome an die Chromosomen sich teilender Zellen. Auf diese Weise werden die KSHV-Genome von einer Wirtszelle gezielt auf deren Tochterzellen übertragen, wobei gleichzeitig die nukleäre Lokalisation des viralen Erbguts nach erfolgter Zellteilung gewährleistet wird (Feeney und Parish, 2009; Ohsaki und Ueda, 2012). Bisher war jedoch nicht bekannt, ob hCMV-Genome im Verlauf einer Infektion überhaupt mit zellulären Chromosomen assoziieren.

Um eine mögliche IE1- bzw. IE1-CTD-abhängige Lokalisation von hCMV-Genomen während der Mitose zu untersuchen, wurden FISH-Analysen durchgeführt (siehe C 4.4). Dazu wurden MRC-5-Zellen mock- oder mit gleicher Anzahl infektiöser TBwt-, TBIE1₁₋₄₇₅- und TBdIE1-Viruspartikel infiziert (ca. 1 PFU/Zelle). Die mock-infizierten bzw. die mit TBwt und TBIE1₁₋₄₇₅ infizierten Zellen wurden für die Präparation der Chromosomen 18 h nach Infektion geerntet. Um den Replikationsdefekt der dIE1-Virusmutante auszugleichen (vgl. D 2.4.3), wurden die mit der IE1-Deletionsmutante infizierten MRC-5-Zellen erst 42 h nach Infektion untersucht. Die Färbung der viralen DNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer Alexa Fluor 488-markierten, TB-spezifischen Bacmid-Sonde bei allen Präparaten parallel. Zur Visualisierung der zellulären Metaphase-Chromosomen wurde DAPI verwendet und schließlich die Lokalisation der viralen Genome relativ zu den zellulären Chromosomen mittels Epifluoreszenz- und Konfokal-Mikroskopie analysiert (Abbildung D.18).

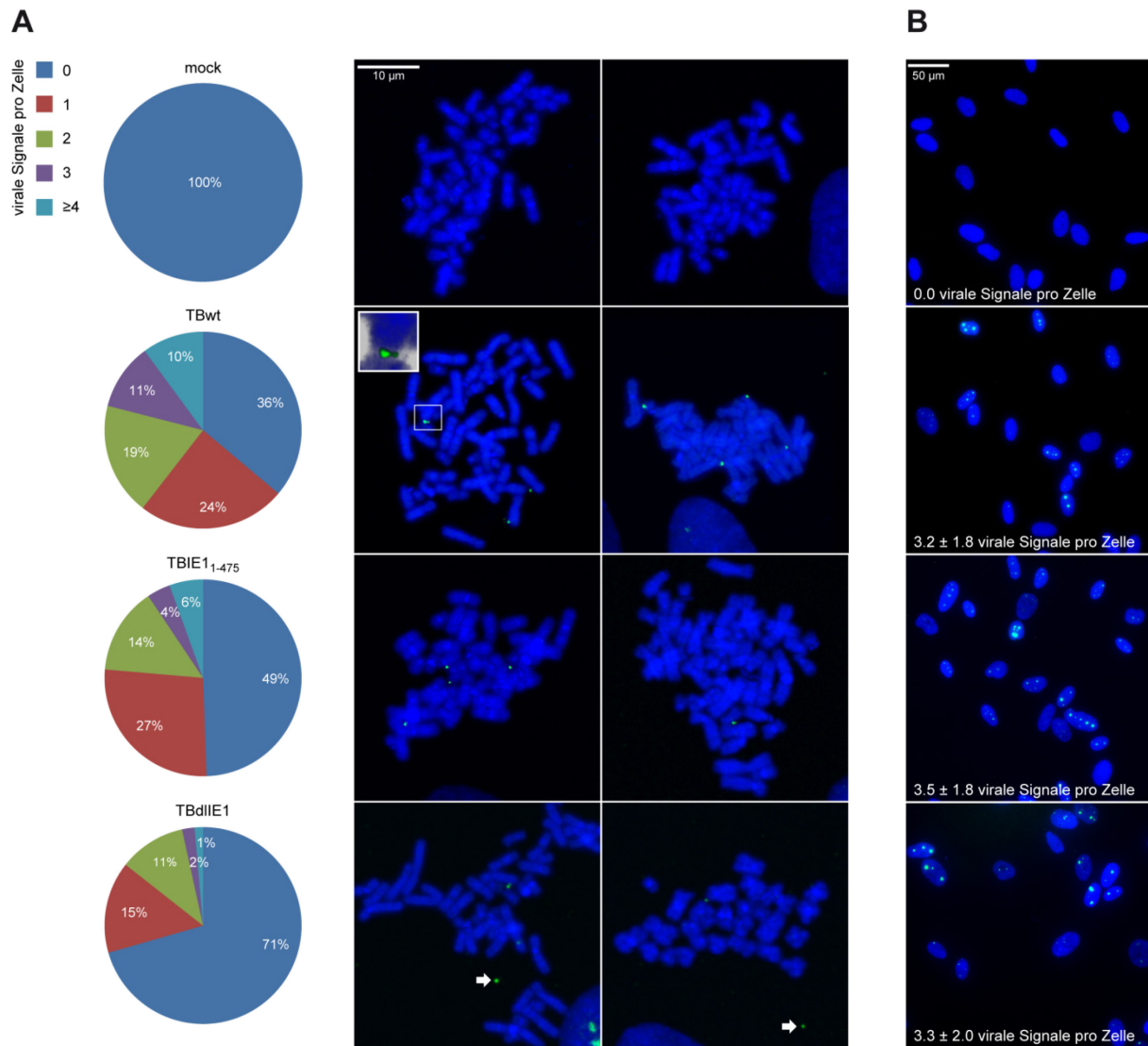


Abbildung D.18: Analyse der IE1-abhängigen Lokalisation von hCMV-Genomen in produktiv infizierten Zellen mittels FISH. (A) MRC-5-Zellen wurden mock- oder mit TBwt, TBIE1₁₋₄₇₅ oder TBdlIE1 infiziert ($\text{moi} \approx 1$ PFU/Zelle). Zur Anreicherung von Zellen, die sich in der Metaphase befinden, wurde das Medium ca. 14 h vor Zellernte mit Colcemid versetzt und die Kulturen 18 (mock, TBwt, TBIE1₁₋₄₇₅) bzw. 42 h (TBdlIE1) nach Infektion geerntet. Die Lokalisation der viralen Genome relativ zu den zellulären Metaphase-Chromosomen wurde mittels FISH und Konfokal-Mikroskopie analysiert. Außerdem wurde die Anzahl an hCMV-spezifischen Signalen pro „Metaphase-Spread“ quantifiziert, wofür 100 (mock), 119 (TBwt), 182 (TBIE1₁₋₄₇₅) bzw. 146 (TBdlIE1) Metaphase-Zellen ausgezählt wurden. Die Ergebnisse sind anhand von Kreisdiagrammen dargestellt, wobei jeweils der Prozentsatz an „Metaphase-Spreads“, die mit 0 bis ≥ 4 viralen Signalen assoziiert waren angegeben ist. Rechts daneben sind je zwei repräsentative Bilder (Maximalprojektionen aus Z-Stapeln, wobei die Schichtdicke der Einzelbilder $0,3 \mu\text{m}$ betrug) pro Infektion dargestellt. Die Vergrößerung (Ausschnitt aus dem zugehörigen 3D Modell) im linken der beiden TBwt-Bilder zeigt virale Genome, die eindeutig an den zellulären Chromosomen anhaften. In (B) sind repräsentative Übersichtsbilder von Interphasekernen der entsprechenden Infektionen aus (A) dargestellt. Die Anzahl an hCMV-spezifischen Signalen pro Zelle wurde anhand von je 100 Kernen durch Auszählen quantifiziert. Die FISH-Methode wurde in Zusammenarbeit mit Kathrin Schön im Rahmen ihrer Master-Arbeit etabliert.

Tatsächlich konnten zahlreiche Virusgenome, die mit der Peripherie ausgebreiteter Metaphase-Chromosomen assoziiert waren, sowohl nach Infektion mit dem Wildtyp Virus, als auch nach Infektion mit der CTD- sowie der IE1-Deletionsmutante nachgewiesen werden. Die Assoziation von viraler DNA mit der Chromosomen-Peripherie, dem sogenannten Perichromatin, wurde kürzlich auch für das Epstein-Barr-Virus gezeigt (Deutsch et al., 2010).

Jedoch waren Unterschiede in der Anzahl assoziierter Virusgenome zwischen dem Wildtyp Virus und den beiden Virusmutanten zu erkennen. Während in Anwesenheit des Volllänge IE1-Proteins nur 36% der „Metaphase-Spreads“ nicht mit mindestens einem viralen Genom assoziiert vorlagen, waren es bei Fehlen der IE1-CTD 49% und bei Fehlen des gesamten IE1-Proteins sogar 71%. Des Weiteren war die Prozentzahl an „Metaphase-Spreads“, die mindestens drei virale Genome trugen, nach Infektion mit der CTD- bzw. der IE1-Deletionsmutante verglichen mit der Wildtyp Infektion deutlich reduziert. Die Deletion des gesamten IE1-Proteins zeigte auch hier den größten negativen Effekt, wobei gleichzeitig vermehrt virale Genome detektiert wurden, die deutlich neben den Metaphase-Chromosomen lokalisiert waren (Abbildung D.18 A, weiße Pfeile).

Die genannten Beobachtungen waren nicht auf generelle Unterschiede in der Anzahl an intrazellulären hCMV-Genomen nach Infektion mit den verschiedenen Viren zurückzuführen, wie die Quantifizierung der Genome in Interphasekernen, die sich auf den gleichen Präparaten befanden, zeigte (Abbildung D.18 B).

Insgesamt konnte mit Hilfe der FISH-Analyse erstmals gezeigt werden, dass hCMV-Genome während der Infektion mit zellulärem mitotischem Chromatin assoziieren. Des Weiteren deuten die Ergebnisse auf eine Beteiligung der IE1-CTD sowie anderer Bereiche innerhalb des IE1-Proteins an der Anheftung der Virusgenome an die zellulären Chromosomen hin. Da diese Anheftung jedoch nicht strikt IE1-abhängig ist, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass neben dem IE1-Protein vermutlich weitere hCMV-Genprodukte an der Assoziation viraler Genome mit den Chromosomen der Wirtszelle involviert sind.

2.4.6 Physikalische Interaktion zwischen IE1 und dem viralen Genom

Die LANA-vermittelte Anheftung der KSHV-Genome an das mitotische zelluläre Chromatin wird durch die Dimerisierung des viralen Proteins ermöglicht, wobei der Amino-Terminus über die dort gelegene CTD an jeweils ein Nukleosom der zellulären Chromosomen und der Carboxy-Terminus an die terminal repeat (TR)-Region des viralen Genoms bindet (Ballestas et al., 1999; Schwam et al., 2000; Barbera et al., 2006; siehe auch Feeney und Parish, 2009; Ohsaki und Ueda, 2012). Aufgrund der viel diskutierten Analogien zwischen LANA und IE1 bezüglich der Nukleosom-Bindung und der Ergebnisse der FISH-Analyse (D 2.4.5) stellte sich im Weiteren die Frage, ob auch das IE1-Protein, möglicherweise CTD-abhängig, an das virale Genom bindet.

Um diese Fragestellung zu adressieren wurden ChIP-Analysen durchgeführt. Allerdings konnten diese nicht anhand von TBwt-, TBIE1₁₋₄₇₅- und TBdIE1-infizierten MRC-5-Zellen durchgeführt werden, da alle erhältlichen Antikörper gegen IE1

entweder nicht ChIP-geeignet sind (IE1 G10 und 6E1) oder Epitope innerhalb der CTD (1B12) bzw. des Amino-Terminus (MAB810R) des IE1-Proteins erkennen. Die Verwendung des zuletzt genannten Antikörpers würde dazu führen, dass neben IE1 auch IE2 präzipitiert werden würde. Stattdessen wurden für die ChIP-Analysen MRC-5-abgeleitete, IE1-negative TetR-Zellen (TetR) und Zellen, die induzierbar ein amino-terminal HA-markiertes Wildtyp IE1-Protein (TetR-HA-IE1) bzw. ein IE1-Protein, bei dem die Funktionalität der CTD durch Aminosäure-Substitutionen (IE1K478A/H481A) zerstört wurde (TetR-HA-IE1CBM), herangezogen. Die Zellen wurden wachstumsarretiert und zur Expression der genannten Proteine für 72 h mit Doxycyclin behandelt, bevor sie für 8 h mit dem IE1-defizienten TB-Virus infiziert wurden ($\text{moi} = 2$ PFU/Zelle). Nach Formaldehyd-Fixierung wurden die Zellen schließlich geerntet, lysiert und die DNA durch Ultraschall-Behandlung geschoren (Abbildung D.19 B). Je ein kleines Volumen der löslichen Extrakte wurde zur Überprüfung der Expression der *in trans* bereitgestellten IE1-Proteine für Western Blot-Analysen eingesetzt (Abbildung D.19 A). Das restliche Lysat wurde für die ChIP-Experimente verwendet. IE1-assoziierte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines monoklonalen, HA-spezifischen Antikörpers, der an eine Agarose-Matrix gekoppelt war (Anti-HA-Agarose, siehe C 1.2), angereichert. Als Spezifitätskontrolle diente eine Immunpräzipitation mit unspezifischer Maus IgG-Agarose. Nach Aufreinigung der DNA in den verschiedenen Proben, wurde diese schließlich mittels q-PCR analysiert (siehe C 5.4). Insgesamt wurden fünf ausgewählte virale Loci und fünf zelluläre Kontroll-Loci untersucht. Dabei handelte es sich um die TR-Region sowie die Promotorbereiche dreier viraler Gene der verschiedenen kinetischen Klassen: des MIE-Gens (MIE-P), des E-Gens UL54 (UL54-P) und des L-Gens UL32 (UL32-P). Zudem wurde der transkribierte Bereich des MIE-Gens (MIE-T) auf die Assoziation mit IE1 überprüft. Als zelluläre Loci dienten zum einen typische Heterochromatin-Regionen, nämlich der Promotorbereich des γ -Globins (HBG-P) und die pericentromerische Satelliten-DNA 2 (Sat2) bzw. eine typische Euchromatin-Region, nämlich der transkribierte Bereich des ribosomalen Proteins L30 (RPL30-T). Zum anderen wurden die Promotorbereiche der IE1-abhängig regulierten, Interferon stimulierten Gene (ISGs) C-X-C Motiv-Ligand 10 (CXCL10-P) und transporter associated with antigen processing 1 (TAP1-P) herangezogen (Knoblach et al., 2011). Die ermittelten, IgG-substrahierten input-Ratio-Werte (Prozentsatz der immunpräzipitierten DNA) sind in Abbildung D.19 C dargestellt.

Wie erwartet wurden die beiden komplementierenden Proteine (HA-IE1 und HA-IE1CBM) in etwa gleichen Mengen exprimiert (Abbildung D.19 A) und auch das Scheren der DNA in den einzelnen Proben gelang äußerst gleichmäßig (Abbildung

D.19 B). Interessanterweise konnte anhand der ChIP-Analyse eine CTD-unabhängige Assoziation von IE1 mit allen getesteten viralen Loci nachgewiesen werden. Auch an allen untersuchten zellulären Sequenzbereichen konnte eine Besetzung mit IE1 gezeigt werden, wobei der Anreicherungsgrad verglichen mit den viralen Sequenzen erhöht war. Zudem war die Assoziation des CTD-mutierten Proteins mit den zellulären Loci im Vergleich zum Wildtyp IE1, besonders an den Nukleosomenreichen Heterochromatin-Sequenzen (HBG-P und Sat2), deutlich reduziert.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Assoziation des IE1-Proteins mit den zellulären Sequenzbereichen hauptsächlich (jedoch nicht ausschließlich) über die CTD-abhängige Wechselwirkung mit Nukleosomen vermittelt wird, während das IE1-Protein überraschenderweise CTD- und damit Nukleosomen-unabhängig mit dem chromatinisierten viralen Genom interagiert. Zudem scheint IE1 promiskuitiv mit dem zellulären und auch mit dem viralen Chromatin zu interagieren; das virale Protein bindet nicht nur an IE1-regulierten Promotoren (z.B. MIE-P, CXCL10-P und TAP1-P) sondern quer über das zelluläre und virale Genom, d.h. auch an nicht von IE1 beeinflussten Sequenzen (z.B. TR, Sat2).

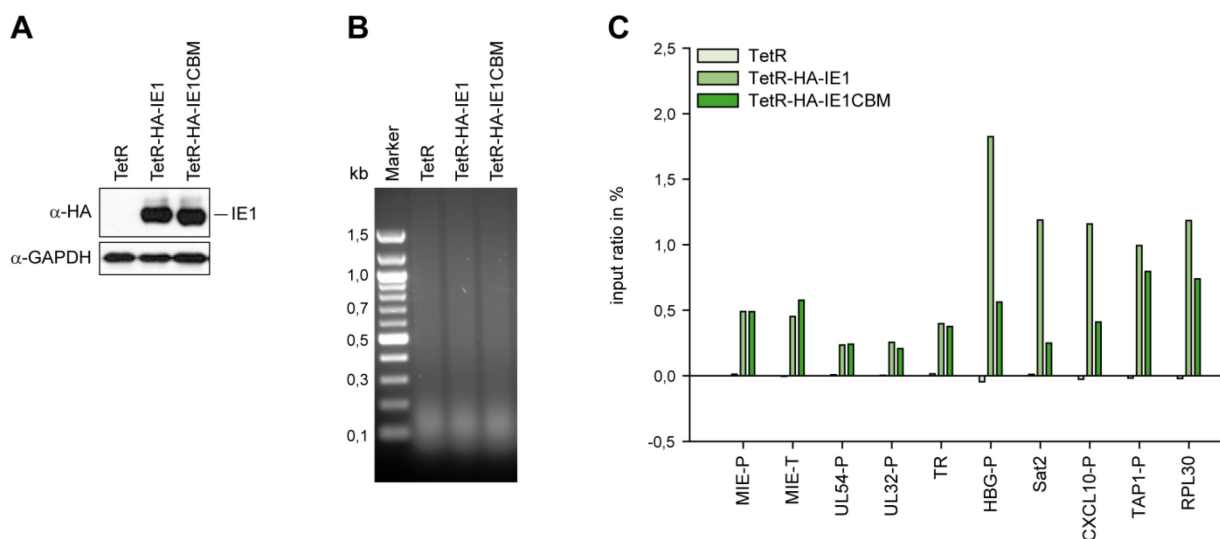


Abbildung D.19: Bestimmung der IE1-Besetzung an zellulärem und viralem Chromatin anhand von ChIP-Analysen. Wachstumsarretierte TetR-, TetR-HA-IE1-, und TetR-HA-IE1CBM-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin (insgesamt 1 µg/ml) behandelt und anschließend für 8 h mit TBdIE1 infiziert (moi = 2 PFU/Zelle), bevor sie mit Formaldehyd fixiert wurden. (A) Die Proteinmengen der *in trans* exprimierten IE1-Varianten im löslichen Zelllysate wurden durch Western Blot-Analyse bestimmt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 10%-igen SDS-Polyacrylamidgelen. Zur Detektion der HA-IE1-Proteine wurde ein monoklonaler Antikörper, der den HA-Fusionsanteil erkennt (3F10, 178), zur Detektion von GAPDH (Ladekontrolle) ein polyklonaler Antikörper (α-GAPDH, 77) herangezogen. (B) Kleine Volumina der input-Proben (1,25 µg DNA) wurden elektrophoretisch in einem 1,2%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. (C) Die Zelllysate wurden für ChIP-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen HA, der an eine Agarose-Matrix gekoppelt war (Anti-HA-Agarose, HA-7) bzw., als Hintergrundkontrolle, mit unspezifischer Maus IgG-Agarose versetzt. Nach erfolgter Immunpräzipitation wurde die Menge an copräzipitierter DNA mittels q-PCR quantifiziert. Die ermittelten output-DNA-Mengen wurden auf die entsprechende Gesamt-DNA-Menge (input) normiert und die zugehörigen IgG-Werte subtrahiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten.

Insgesamt deuten die Daten der ChIP-Analyse darauf hin, dass IE1 tatsächlich (direkt oder indirekt) an das virale Genom bindet, wobei diese Interaktion scheinbar nicht durch die CTD vermittelt wird.

2.4.7 Bedeutung der IE1-CTD für die nicht produktive hCMV-Infektion in myeloiden Zellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen

Um schließlich eine mögliche funktionelle Bedeutung der IE1-CTD während der nicht produktiven Infektion mit hCMV zu untersuchen, wurden Infektionsexperimente in der humanen, CD34⁺ myeloiden Leukämiezelllinie KG-1 sowie, in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Felicia Goodrum (University of Arizona, USA), in primären CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPCs) durchgeführt. KG-1-Zellen teilen einige Charakteristika mit CD34⁺ HPCs, die sowohl als natürlicher Latenz- bzw. Persistenzort für hCMV als auch als experimentelles *in vitro* hCMV-Latenzsystem gelten. Die Infektion dieser beiden Zelltypen mit klinischen hCMV-Isolaten führt nicht zur lytischen Virusreplikation oder Freisetzung von infektiösen Nachkommenviren (Sindre et al., 1996; Goodrum et al., 2002, 2007; Poole et al., 2011; Albright und Kalejta, 2013 und unveröffentlichte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe).

Für die Untersuchung einer möglichen Bedeutung der IE1-CTD für die nicht produktive Infektion in KG-1-Zellen war es zunächst wichtig herauszufinden, ob IE1 in diesen Zellen überhaupt exprimiert wird. Deshalb wurden KG-1-Zellen in Triplikaten mit dem TBwt-Virus mit einer moi von 3 PFU/Zelle (Titerbestimmung auf MRC-5-Zellen) infiziert (Erstinfektion). Nach 24 h wurde mit der Selektion auf Zellen begonnen, die transkriptionell aktive TBwt-Genome tragen. Diese wurden dann, zur Verbesserung der Infektionsrate, nach weiteren 24 h reinfiziert (Zweitinfektion; siehe C 2.1 und C 3.2). Das Erneuern des Selektionsmediums sowie die Ernte von Zellen für die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgten alle zwei Tage.

Zur möglichst vollständigen Eliminierung von DNA-Verunreinigungen, wurden alle RNA-Proben mit dem TURBO DNA-free™ Kit von Ambion behandelt. Die IE1-spezifische cDNA-Synthese erfolgte Gen- und Strang-spezifisch um zu gewährleisten, dass es sich bei dem nachgewiesenen Transkript tatsächlich um IE1 mRNA handelt und nicht um mögliche Transkripte des Gegenstranges. Zudem wurden für alle IE1-spezifischen Proben Minus-RT-Kontrollen mitgeführt (siehe C 4.2). Als zelluläres Kontroll-Transkript diente β -Tubulin, wobei auch hier die cDNA-Synthese Gen- und Strang-spezifisch erfolgte. Da aufgrund der anhaltenden Selektion viele Zellen abstarben, nahmen die resultierenden RNA-Ausbeuten mit fortschreitender Dauer der Infektion drastisch ab, weshalb die isolierten Gesamt-RNA-Proben der Triplikate für die cDNA-Synthese ab Tag 4 nach Infektion vereint wurden. Insgesamt wurden

die infizierten Zellen über einen Zeitraum von 16 Tagen auf Expression von IE1 überprüft (Abbildung D.20).

Tatsächlich konnte ab 3 h nach Erstinfektion (Tag 0) IE1-Transkript in den infizierten KG-1-Zellen nachgewiesen werden, wobei die Mengen nach Zweitinfektion (ab Tag 2) zunächst tendenziell abnahmen bis schließlich keine IE1 mRNA mehr nachweisbar war (Tag 12 und 14). An Tag 16 jedoch stieg die IE1-Transkript-Menge erneut an.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass IE1 während der nicht produktiven Infektion in KG-1-Zellen nicht kontinuierlich, jedoch sporadisch exprimiert wird, was weitere Untersuchungen hinsichtlich der Funktion der IE1-CTD in diesen Zellen sinnvoll erscheinen ließ.

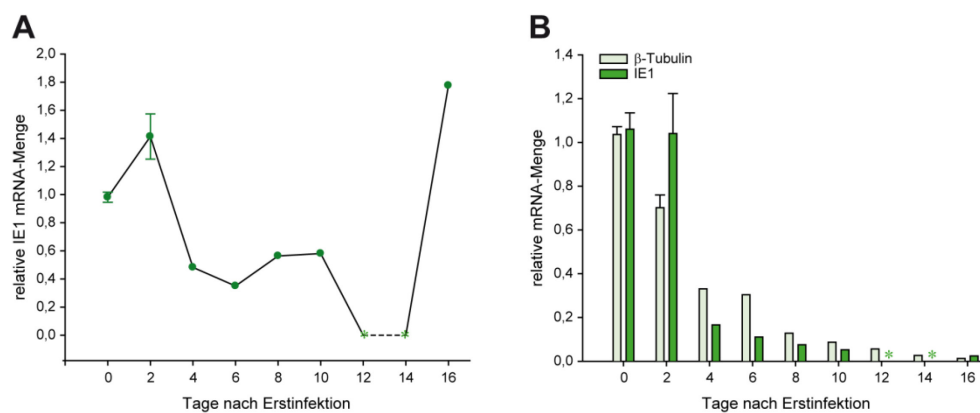


Abbildung D.20: Analyse der IE1-Expression in infizierten KG-1-Zellen. KG-1-Zellen wurden 24 h in Serum-freiem RPMI-Medium kultiviert und im Anschluss mit TBwt (moi = 3 PFU/Zelle) infiziert. Nach 24 h wurde durch Zugabe von 10% [v/v] dialysiertem FKS, 25 µM Mycophenolsäure und 100 µM Xanthin zum RPMI-Medium auf Zellen mit transkriptionell aktiven Virusgenomen selektiert und die Zellen weitere 24 h später reinfiziert. Das Erneuern des Selektionsmediums sowie die Ernte von Zellen zur Isolierung der Gesamt-RNA erfolgten alle zwei Tage. Die anschließende cDNA-Synthese wurde sowohl für IE1 als auch für das zelluläre Haushaltsgen β -Tubulin Gen- und Strang-spezifisch durchgeführt. Die Teilabbildung (A) zeigt die relative IE1 mRNA-Menge nach Normierung auf das zelluläre Haushaltsgen β -Tubulin (Tag 0 auf 1 gesetzt). In Teilabbildung (B) sind die relativen mRNA-Mengen von IE1 und β -Tubulin aus 1 ml Kultur getrennt voneinander dargestellt (Tag 0 jeweils auf 1 gesetzt). Gezeigt sind an Tag 0 und 2 die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei biologischen und zwei technischen Replikaten, ab Tag 4 die Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten. Sterne (*) kennzeichnen Werte unter der Nachweisgrenze.

Um die Stabilität von Wildtyp und CTD-defizienten Virusgenomen in nicht produktiv infizierten Zellen zu untersuchen, wurden im Anschluss KG-1-Zellen in zwei unabhängigen Experimenten in Triplikaten mock- bzw. mit TBwt oder TBIE1₁₋₄₇₅ infiziert (moi = 3 PFU/Zelle). Die Erst- und Zweitinfektionen erfolgten wie oben beschrieben im Abstand von 48 h und auch die Selektion auf Zellen mit transkriptionell aktiven Virusgenomen wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Wie in Abbildung D.21 A dargestellt, wurde die relative Anzahl an intrazellulären viralen Genomen in einem Zeitraum von bis zu sieben Tagen nach Infektion mittels q-PCR gemessen. Dafür wurde die virale DNA durch Amplifikation des UL54-P quantifiziert und auf das zelluläre Einzelkopiegen RPPH1 normiert.

Wie erwartet und in der Literatur beschrieben, sank die Anzahl an intrazellulären viralen Genomen mit fortschreitender Dauer der Infektion (Goodrum et al., 2004; Rossetto et al., 2013; Albright und Kalejta, 2013). Während jedoch die Zahl an input-Genomen an Tag 1 nach Infektion zwischen dem Wildtyp und dem CTD-defizienten Virus noch äußerst gleichmäßig war, nahm die Anzahl der viralen Genome in TBIE1₁₋₄₇₅-infizierten Zellen verglichen mit den TBwt-infizierten Zellen im zeitlichen Verlauf der Infektion deutlich schneller ab (1,7 bis 4,5-fach).

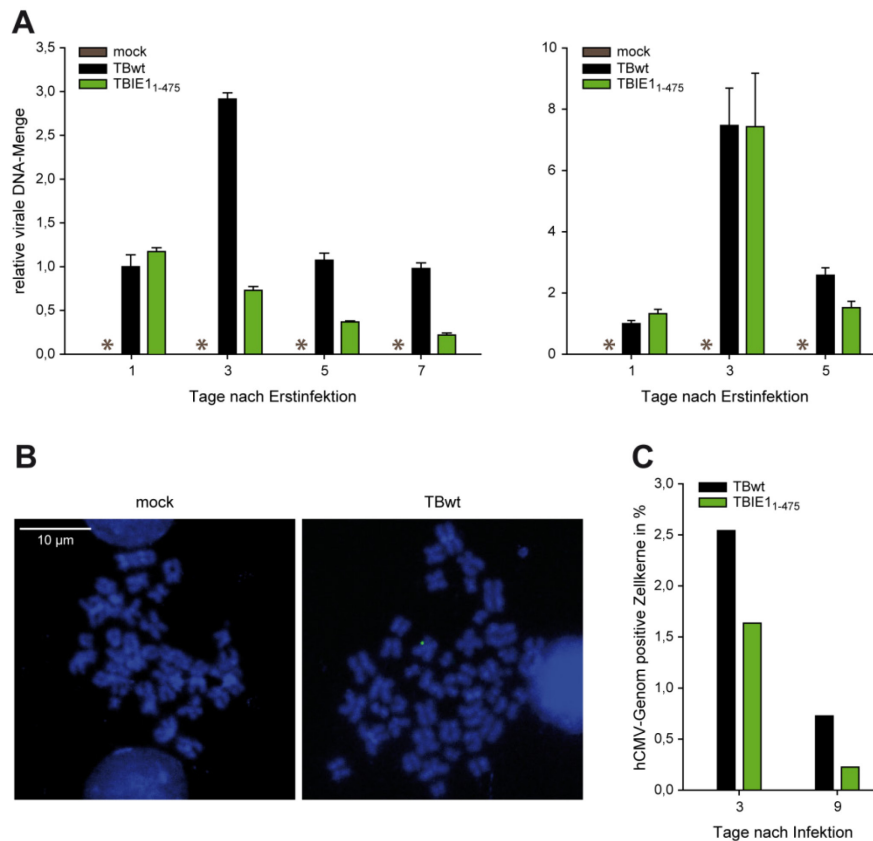


Abbildung D.21: Analyse der viralen Genomstabilität in TBwt- und TBIE1₁₋₄₇₅-infizierten KG-1-Zellen mittels q-PCR und FISH. KG-1-Zellen wurden mock bzw. mit TBwt oder TBIE1₁₋₄₇₅ (moi = 3 PFU/Zelle) infiziert. (A) Nach 24 h wurde durch Zugabe von 10% [v/v] dialysiertem FKS, 25 µM Mycophenolsäure und 100 µM Xanthin zum RPMI-Medium mit der Selektion auf Zellen mit transkriptionell aktiven Virusgenomen begonnen und die Zellen weitere 24 h später reinfiziert. Einen Tag sowie 3, 5, und 7 Tage nach Erstinfektion wurde jeweils ein Teil der Zellen geerntet, mit Trypsin (siehe C 4.1) behandelt und die Gesamt-DNA isoliert. Die virale und zelluläre DNA wurde mittels q-PCR quantifiziert und die Anzahl intrazellulärer Genome relativ zu TBwt an Tag 1 (= 1) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten, wobei die linke und rechte Abbildung die Daten zweier unabhängiger Experimente zeigen. Sterne (*) kennzeichnen Werte unter der Nachweisgrenze. (B und C) Drei und 9 Tage nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die Lokalisation der viralen Genome relativ zu zellulären Metaphase-Chromosomen bzw. der Prozentsatz an hCMV-Genom positiven Interphasekernen mittels FISH und Epifluoreszenz- bzw. Konfokal-Mikroskopie analysiert. Teilabbildung (B) zeigt je ein Bild für mock und TBwt 3 Tage nach Infektion, wobei es sich bei den Bildern um Maximalprojektionen aus Z-Stapeln handelt, bei denen die Schichtdicke der Einzelbilder 0,3 µm betrug. In Teilabbildung (C) ist der Prozentsatz an hCMV-Genom positiven Interphasekernen für TBwt und TBIE1₁₋₄₇₅ 3 und 9 Tage nach Infektion dargestellt. Ausgezählt wurden 1299 (TBwt) bzw. 1284 (TBIE1₁₋₄₇₅) Interphasekerne 3 Tage nach Infektion und 1514 (TBwt) bzw. 1331 (TBIE1₁₋₄₇₅) Interphasekerne 9 Tage nach Infektion.

Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei FISH-Analysen zur Untersuchung der Stabilität von TBIE1₁₋₄₇₅- im Vergleich zu TBwt-Genomen ab (siehe C 4.4). Für diese wurden

KG-1-Zellen wiederum mock- bzw. mit TBwt- oder TBIE1₁₋₄₇₅-Viren mit einer moi von 3 PFU/Zelle infiziert (gleiche Anzahl an infektiösen Genomen), wobei bei diesem Experiment, anders als zuvor, kein Selektionsdruck ausgeübt wurde. Die Zellen wurden 3 und 9 Tage nach Infektion für die Chromosomenpräparation geerntet und die virale DNA durch Hybridisierung mit einer Alexa Fluor 488-markierten, TB-spezifischen Bacmid-Sonde nachgewiesen. Die zelluläre DNA wurde mit DAPI gefärbt und die Lokalisation der viralen Genome relativ zu den zellulären Metaphase-Chromosomen sowie der Prozentsatz an Interphasekernen mit hCMV-spezifischen Signalen mit Hilfe von Epifluoreszenz- bzw. Konfokal-Mikroskopie analysiert und ausgezählt (Abbildung D.21 B und C).

Die Rate an infizierten Metaphase-Zellen war so niedrig, dass keine qualitative oder quantitative Auswertung anhand von „Metaphase-Spreads“ möglich war. Jedoch war auch in infizierten KG-1-Zellen, zumindest für TBwt-Genome, eine Assoziation mit Metaphase-Chromosomen zu beobachten (Abbildung D.21 B). Eine quantitative Auswertung wurde für dieses Experiment in Interphasekernen durchgeführt (Abbildung D.21 C). Analog zu den q-PCR-Analysen konnte auch mit Hilfe der FISH eine schnellere Abnahme der Anzahl an viralen Genomen im Verlauf der Infektion mit der CTD-defizienten Virusmutante beobachtet werden. So waren bereits 3 Tage nach Infektion mit der CTD-Deletionsmutante verglichen mit dem Wildtyp Virus 1,5-mal weniger Zellkerne hCMV-Genom positiv, 9 Tage nach Infektion sogar 3,2-mal weniger.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der q-PCR- und der FISH-Analysen darauf hin, dass die IE1-CTD zur Erhaltung viraler Genome in nicht produktiv infizierten KG-1-Zellen beiträgt.

Um die Ergebnisse aus den KG-1-Infektionsstudien in einem seit längerem etablierten, physiologisch hoch relevanten hCMV-Latenzsystem zu verifizieren, wurden CD34⁺-angereicherte Knochenmarkszellen herangezogen. Diese wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Felicia Goodrum mit Wildtyp Viren sowie CTD- und IE1-defizienten Virusmutanten des klinischen hCMV-Isolats FX, wie in Goodrum et al., 2007 und Petrucelli et al., 2009 beschrieben, infiziert. Die verwendeten FX-Viren kodieren für EGFP, wodurch es nach 20-stündiger Infektion möglich war, infizierte (EGFP-positive) CD34⁺ HPCs mittels fluorescence-activated cell sorting (FACS) zu isolieren. Die so gewonnenen reinen, infizierten primären Zellen wurden in Langzeit Knochenmark-Kulturen gezogen, um deren Differenzierung entgegenzuwirken. Die Zellen wurden 5 und 10 Tage nach Infektion für DNA- und RNA-Analysen geerntet um zum einen die relative Anzahl an intrazellulären viralen Genomen mittels q-PCR zu bestimmen (Abbildung D.22) und zum anderen die

Expression der MIE-Transkripte IE1 und IE2 sowie der Latenz-assoziierten Transkripte LUNA und UL138 mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR (q-RT-PCR, siehe C 4.2 und C 4.3) zu untersuchen (Abbildung D.23). Die Eliminierung möglicher DNA-Kontaminationen in den RNA-Proben und die IE1-spezifische cDNA-Synthese (einschließlich der Minus-RT-Kontrollen) erfolgten wie oben beschrieben. Zum Nachweis aller anderen genannten viralen Transkripte und des zellulären Kontroll-Transkripts β -Tubulin wurde Gesamt-RNA in Erststrang-cDNA umgeschrieben und diese anhand von Gen-spezifischen Primern mittels q-PCR amplifiziert.

Die relative Quantifizierung der intrazellulären viralen DNA-Mengen in den mit FXwt-, FXIE1₁₋₄₇₅⁻ bzw. FXdIE1-infizierten CD34⁺ HPCs bestätigte im Wesentlichen die Beobachtungen aus den Infektionsexperimenten in KG-1-Zellen. So war die gemessene relative virale DNA-Menge in FXIE1₁₋₄₇₅-infizierten Zellen im Vergleich zu FXwt-infizierten Zellen sowohl 5 als auch 10 Tage nach Infektion um etwa den Faktor 10 niedriger. Ein noch deutlicherer Effekt zeigte sich in CD34⁺ HPCs, die mit der IE1-Deletionsmutante infiziert worden waren. Hier betrug die ermittelte relative virale DNA-Menge zu beiden untersuchten Zeitpunkten verglichen mit der Wildtyp-Infektion nur noch etwa ein Hundertstel.

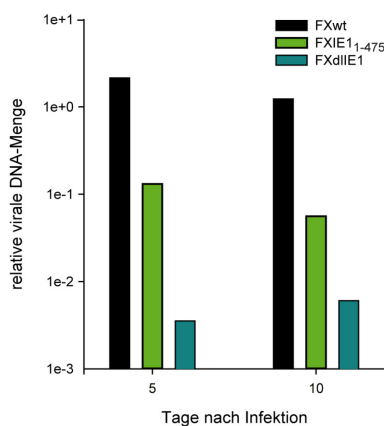


Abbildung D.22: Analyse der viralen Genomstabilität in infizierten primären CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen. Primäre CD34⁺ HPCs wurden mit FXwt, FXIE1₁₋₄₇₅ bzw. FXdIE1 mit hoher Multiplizität für 20 h infiziert. Im Anschluss wurden infizierte (EGFP-positive) Zellen mittels FACS isoliert und in Langzeit Knochenmark-Kulturen für die Dauer von zehn Tagen kultiviert. Die Zellen wurden 5 und 10 Tage nach Infektion zur Isolierung der Gesamt-DNA geerntet. Die virale und zelluläre DNA wurde mittels q-PCR quantifiziert, wobei zur Amplifizierung der viralen DNA IE2-spezifische Primer, zur Amplifizierung der zellulären DNA GAPDH-spezifische Primer verwendet wurden. Dargestellt ist die relative virale DNA-Menge zweier technischer Replikate nach Normierung der viralen auf die zelluläre DNA-Menge. Dieses Experiment wurde im Rahmen einer Kollaboration von Dr. Mahadevaiah Umashankar (University of Arizona, USA) durchgeführt.

Des Weiteren wurden die infizierten Zellen auf Transkription von IE1 sowie drei anderer viraler Gene hin untersucht (Abbildung D.23). Sowohl nach Infektion mit dem Wildtyp Virus als auch nach Infektion mit der CTD-defizienten Virusmutante konnte zu beiden untersuchten Zeitpunkten IE1 mRNA detektiert werden, wobei die relativen Mengen von Tag 5 auf Tag 10 sogar anstiegen. Die beobachteten größeren Mengen an IE1-Transkript in TBwt-infizierten Zellen im Vergleich zur TBIE1₁₋₄₇₅⁻ Infektion sind durch die unterschiedlichen Mengen an intrazellulärer Virus-DNA zu erklären (siehe Abbildung D.22). Der Anstieg der IE1 mRNA im zeitlichen Verlauf der Infektion war nicht auf eine generelle Reaktivierung der Viren aus der latenten

Infektion zurückzuführen, da im Gegensatz zu IE1 die IE2-Transkriptmenge von Tag 5 auf Tag 10 abnahm (FXwt) bzw. kein IE2-Transkript nachweisbar war (FXIE1₁₋₄₇₅). Es kam folglich nicht zur allgemeinen Aktivierung der IE-Expression, sondern zur selektiven Hochregulierung von IE1. Die beiden Latenz-assoziierten Transkripte LUNA und UL138 konnten in FXwt- und FXIE1₁₋₄₇₅-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Während die relativen Mengen an LUNA mRNA im Verlauf der Infektion abnahmen, stiegen die UL138 mRNA-Mengen leicht an. Nach Infektion mit der IE1-Deletionsmutante konnten keinerlei virale Transkripte detektiert werden, was wohl auf die geringe Menge an viraler DNA in den infizierten Zellen (siehe Abbildung D.22) und nicht etwa auf zu geringe Zellzahlen bzw. schlecht präparierte RNA zurückzuführen ist (siehe Abbildung D.23, β -Tubulin).

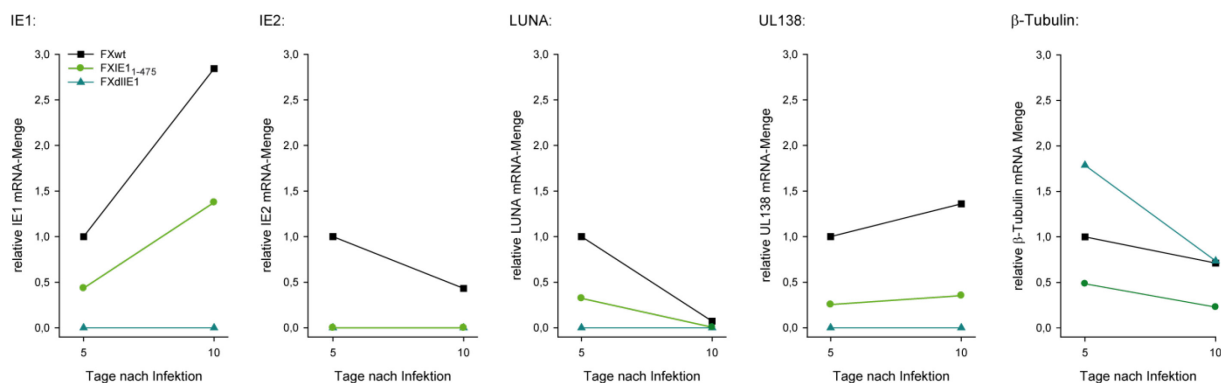


Abbildung D.23: Expressions-Analyse ausgewählter viraler Transkripte in infizierten primären CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen. Primäre CD34⁺ HPCs wurden mit FXwt, FXIE1₁₋₄₇₅ bzw. FXdIE1 mit hoher Multiplizität für 20 h infiziert. Im Anschluss wurden infizierte (EGFP-positive) Zellen mittels FACS isoliert und in Langzeit Knochenmark-Kulturen für die Dauer von zehn Tagen kultiviert (vgl. Abbildung D.22). Die Zellen wurden 5 und 10 Tage nach Infektion zur Isolierung der Gesamt-RNA geerntet. Die anschließende cDNA-Synthese wurde für IE1 Gen- und Strang-spezifisch durchgeführt. Die restliche RNA wurde in die cDNA-Synthese mit Oligo(dT)-Primern eingesetzt. Für die anschließende q-PCR-Analyse wurden IE1-, IE2-, LUNA-, UL138- und β -Tubulin-spezifische Primer verwendet. Gezeigt sind die mRNA-Mengen relativ zum TBwt an Tag 5 (= 1) nach Normierung auf das zelluläre Haushaltsgen β -Tubulin. Der rechte Graph zeigt die mRNA-Menge von β -Tubulin relativ zum TBwt an Tag 5 (= 1). Dargestellt sind die Mittelwerte zweier technischer Replikate. Die Zellen wurden im Rahmen einer Kollaboration von Dr. Mahadevaiah Umashankar (University of Arizona, USA) infiziert und geerntet.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Infektionsexperimente in KG-1-Zellen und primären CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen auf eine funktionelle Bedeutung von IE1, und im Speziellen der IE1-CTD, für die Erhaltung viraler Genome während der persistierenden, nicht produktiven hCMV-Infektion hin.

E Diskussion

1 Strukturelle Grundlagen der IE1-Histon-Interaktion

1.1 Die CTD des IE1-Proteins bindet in die saure Tasche des Nukleosoms

Das Nukleosom ist die grundlegende, sich wiederholende Einheit des Chromatins. Je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden den Kern des Nukleosoms. Während die amino-terminalen, flexiblen Histon-Schwänze teilweise aus der kompakten Nukleosomen-Struktur herausragen, bilden die gefalteten Protein-Bereiche der Histone den konturenreichen Proteinkörper, um den die DNA-Doppelhelix gewunden ist. Die Oberfläche dieses Proteinkörpers ist weitgehend hydrophob oder positiv geladen. Den einzig negativ geladenen Bereich auf der Nukleosomen-Oberfläche bezeichnet man als saure Tasche. Dabei handelt es sich um eine schmale Furche, die durch sechs Glutamat- bzw. Aspartat-Reste des Histons H2A (E56, E61, E64, D90, E91 und E92) und zwei Glutamat-Reste des Histons H2B (E102 und E110) ausgebildet wird. Zudem besitzt die saure Tasche teilweise unpolaren Charakter, da zwei Tyrosin- und ein Valin-Rest des Histons H2A (Y50, V54 und Y57) eine kleine hydrophobe Vertiefung am Boden der Furche bilden. Die Größe der sauren Tasche ist ausreichend, um verschiedenste Binde-Motive (z.B. Schlaufen, Haarnadeln oder α -Helices) zu beherbergen (Luger et al., 1997; Davey et al., 2002; Kalashnikova et al., 2013). Sie ist nicht wichtig für die Aufrechterhaltung der Nukleosomen-Struktur, jedoch bindet die flexible H4 Schwanz-Domäne des benachbarten Nukleosoms über positiv geladene Reste in die saure Tasche, was zu Nukleosom-Nukleosom-Interaktionen und zur Ausbildung höher geordneter Chromatin-Strukturen beiträgt (Luger et al., 1997; Davey et al., 2002; Dorigo et al., 2003; Fan et al., 2004; Kan et al., 2009).

Neben dem core-Histon H4 wurden in der Zwischenzeit eine Reihe weiterer zellulärer Proteine und auch ein virales Protein identifiziert, die mittels kurzer Peptid-Sequenzen spezifisch in die saure Tasche des Nukleosoms binden. Das erste dieser Proteine war, wie in der Einleitung bereits erwähnt, das von dem γ -Herpesvirus KSHV kodierte LANA (Barbera et al., 2006). Auch das humane Interleukin 33 (IL-33), der *Drosophila melanogaster*-kodierte regulator of chromosome condensation 1 (RCC1), das humane Protein high-mobility group nucleosomal 2 (HMGN2) und der *Saccharomyces cerevisiae*-kodierte silent information regulator 3 (SIR3) nutzen die

saure Tasche als Bindestelle am Nukleosom (Roussel et al., 2008; Makde et al., 2010; Armache et al., 2011; Kato et al., 2011). Für H4, LANA, RCC1, HMG2 und SIR3 konnte die Struktur des jeweils bindenden Proteinabschnittes im Komplex mit der sauren Tasche anhand von Kernspinresonanz-Spektroskopie bzw. Röntgenkristallstruktur-Analysen charakterisiert werden, während für IL-33 ein Strukturmodell berechnet wurde.

Für das hCMV-kodierte IE1-Protein konnte bereits vor 25 Jahren eine Assoziation mit zellulärem Chromatin beobachtet werden. Zwar wurde diese Aktivität nach und nach den 16 carboxy-terminalen Aminosäuren (CTD) des viralen Proteins zugeschrieben, der genaue Mechanismus dieser Assoziation wurde bisher jedoch nicht untersucht (Lafemina et al., 1989; Reinhardt et al., 2005). Dennoch wurde vermutet, dass die Colokalisation des IE1-Proteins mit zellulären Metaphase-Chromosomen nicht auf einer direkten Interaktion von IE1 mit DNA beruht (Münch et al., 1992; Paulus und Nevels, 2009), was eine Wechselwirkung zwischen IE1 und Protein-Komponenten des Chromatins nahe legte.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals der molekulare Mechanismus, welcher der IE1-Chromatin-Assoziation zugrunde liegt, detailliert aufgeklärt werden. So konnte gezeigt werden, dass das IE1-Protein durch spezifische Interaktion mit der sauren Tasche an das Nukleosom bindet (Abbildung E.1). Mit IE1 wurde demnach das erste β -herpesvirale Protein identifiziert, welches die saure Tasche als Interaktionsplattform für die Bindung an die Nukleosomen-Oberfläche nutzt.

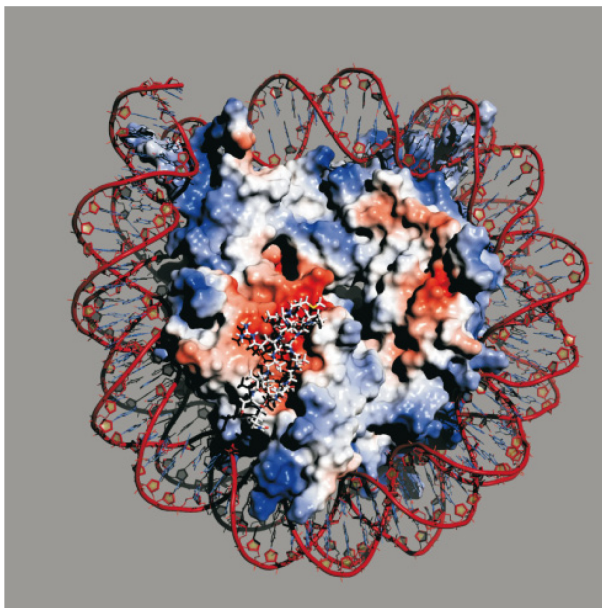


Abbildung E.1: Illustration der IE1-CTD-Nukleosom-Interaktion. Der Proteinkörper eines Nukleosoms ist in Oberflächen-Darstellung abgebildet, wobei positiv geladene Seitenketten blau und negativ geladene Seitenketten rot gefärbt sind. Die um den nukleosomalen Kern gewundene DNA ist als rotbraune Doppelhelix gezeigt. Die IE1-CTD ist als Stäbchenmodell dargestellt und bildet eine β -Haarnadelstruktur, die in die saure Tasche des Nukleosoms bindet, welche durch das H2A/H2B-Dimer ausgebildet wird. Diese Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer, insbesondere mit Bärbel Kieninger und Prof. Dr. Werner Kremer (Universität Regensburg). Journal of Virology cover image zu Mücke et al., 2014.

Bei den meisten anderen Proteinen, für die eine Interaktion mit der sauren Tasche nachgewiesen wurde (H4, LANA, IL-33, SIR3 und HMG2), sind lineare Motive, die

die beiden Aminosäuren Arginin und Serin beinhalten und innerhalb flexibler Bereiche des jeweiligen Proteins lokalisiert sind, an der Bindung an das H2A/H2B-Dimer beteiligt. Ein derartiges Motiv konnte in dieser Arbeit auch innerhalb der IE1-CTD identifiziert werden und wurde daraufhin als NBM bezeichnet. Es ist im Zentrum der CTD lokalisiert und setzt sich aus den zehn Aminosäuren STHPMVTRSK zusammen. Ergebnisse einer Kernspinresonanz-Spektroskopie, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Hans-Robert Kalbitzer durchgeführt wurde zeigten zudem, dass auch die IE1-CTD hoch flexibel ist und eine im nativen Zustand unstrukturierte Domäne darstellt (Daten nicht gezeigt). Der unstrukturierte Charakter der IE1-CTD wurde bereits zuvor mittels *in silico*-Analysen vorhergesagt (Krauss et al., 2009).

Im Gegensatz dazu ergaben die Computer-gestützten Berechnungen von Strukturmodellen des IE1-CTD/Nukleosom-Komplexes, dass das virale Peptid eine β -Haarnadelstruktur ausbildet, wenn es im Komplex mit dem H2A/H2B-Dimer vorliegt (D 1.7, siehe auch Mücke et al., 2014). Dieses Phänomen, also die Änderung der Konformation eines Bindungspartners als Folge von Protein-Protein-Wechselwirkungen, wird als „induced fit“ bezeichnet (Koshland, 1958).

Die berechnete β -Haarnadelstruktur, welche die IE1-CTD im Komplex mit dem Nukleosom in dem von uns favorisierten Modell einnimmt, ähnelt sehr der Struktur der komplexierten LANA-CTD (Barbera et al., 2006). Dementsprechend ist die Art der Interaktion zwischen der IE1- bzw. der LANA-CTD mit der sauren Tasche des Nukleosoms auf molekularer Ebene ebenfalls sehr ähnlich. Diese Ähnlichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit zudem experimentell, anhand von Bindungsstudien (D 1.1 und D 1.5) und Kompetitionsstudien (D 1.6, siehe auch Mücke et al., 2014), bestätigt. Laut der publizierten Kristallstruktur des LANA-CTD/Nukleosom-Komplexes, interagiert das LANA₄₋₁₇-Peptid mit den H2A-Resten E61, E64, D90 und E92 (Barbera et al., 2006). Übereinstimmend dazu wurden im favorisierten Modell Wechselwirkungen zwischen dem IE1₄₇₆₋₄₉₁-Peptid und den H2A-Resten E61, E64 und E92 vorhergesagt, wobei eine Beteiligung von H2A E92 an der IE1-Nukleosom-Interaktion in Bindungsstudien nicht bestätigt werden konnte. Dafür konnte gezeigt werden, dass die Substitution von H2A D90 einen stark negativen Effekt auf die Bindung des Volllänge IE1 hat, bzw. den Verlust der Bindung der IE1-CTD nach sich zieht (D 1.5). Diese Beobachtung kann jedoch nicht direkt aus dem vorhergesagten Muster der Wasserstoffbrücken-Bindungen im favorisierten Modell abgeleitet werden. Eine mögliche Erklärung wäre allerdings, dass der Imidazol-Ring von IE1 H481 im Komplex mit dem H2A/H2B-Dimer in positiv geladener Form vorliegt und so

möglicherweise eine elektrostatische Wechselwirkung mit der in räumlicher Nähe gelegenen, negativ geladenen Seitenkette von H2A D90 eingeht.

Eine generelle Schwachstelle der Computer-gestützten Strukturberechnung des IE1-CTD/Nukleosom-Komplexes ist die Tatsache, dass nur Wasserstoffbrücken-Bindungen, nicht jedoch elektrostatische Wechselwirkungen oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen, vorhergesagt wurden. Dadurch ist auch zu erklären, dass das für die experimentelle Nukleosom-Bindung essentielle IE1 M483 scheinbar in keinem der beiden berechneten Komplexe von Bedeutung ist (D 1.4 und D 1.7, siehe auch Mücke et al., 2014). Vom entsprechenden Methionin-Rest der LANA-CTD (M6) ist allerdings bekannt, dass dieser in die hydrophobe Vertiefung innerhalb der sauren Tasche eingepasst ist, die von den H2A Resten Y50, V54 und Y57 ausgebildet wird. Die Interaktion zwischen LANA M6 und den genannten unpolaren H2A-Resten wird durch zahlreiche Van-der-Waals-Kräfte stabilisiert. LANA M6 ist, genau wie IE1 M483, essentiell für die Assoziation des viralen Proteins mit zellulären Chromosomen (Barbera et al., 2006). Es ist also naheliegend, dass nicht nur das LANA M6 sondern auch das IE1 M483 Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit H2A-Resten der hydrophoben Vertiefung innerhalb der sauren Tasche eingeht, die jedoch aufgrund der genannten Limitationen in der Strukturberechnung nicht vorhergesagt wurden.

Interessanterweise wurde anhand des favorisierten Modells eine Interaktion des IE1₄₇₆₋₄₉₁-Peptids mit dem H2A-Rest E56 vorhergesagt, der ebenfalls an der Ausbildung der sauren Tasche beteiligt ist (D 1.7). Auch die Alanin-Mutagenese-Studien bestätigen die wichtige Rolle des H2A E56 für die IE1-Nukleosom-Interaktion (D 1.5). Eine derartige Wechselwirkung existiert im LANA-CTD/Nukleosom-Komplex nicht. Auch wird diese wichtige Interaktion nicht von dem alternativen Strukturmodell vorhergesagt, wodurch wiederum das favorisierte Modell experimentell bestätigt wird (Barbera et al., 2006; Mücke et al., 2014).

Jedoch sollte das alternative Modell nicht komplett ausgeschlossen werden. Trotz der Unterschiede in der Art der jeweiligen Interaktion verfügen nämlich die Proteine LANA, IL-33, RCC1, SIR3 und HMGN2, die ebenfalls alle in die nukleosomale saure Tasche binden, über einen strategisch positionierten Arginin-Rest, der drei Wasserstoffbrücken-Bindungen mit den H2A-Resten E61, D90 und E92 ausbildet (Kalashnikova et al., 2013). Interessanterweise bildet auch der Arginin-Rest innerhalb des IE1 NBM (R486) im alternativen Modell Wasserstoffbrücken-Bindungen mit genau denselben drei H2A-Resten der sauren Tasche aus (Mücke et al., 2014), welche wiederum in dem von uns favorisierten Modell nicht vorhergesagt werden.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten aus Strukturvorhersagen und biochemischen Bindungs-Experimenten, dass die

Interaktion des LANA- und des IE1-Proteins mit der sauren Tasche des Nukleosoms auf molekularer Ebene äußerst ähnlich, jedoch nicht identisch erfolgt.

1.2 Saure Abschnitte im IE1-Protein binden vermutlich DNA-freie Histone

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht klar hervor, dass die CTD zwar ausreichend für die Bindung an das H2A/H2B-Dimer, die Interaktion mit dem nukleosomalen Kern und die Assoziation mit zellulären Chromosomen ist, jedoch nicht den einzigen Histon-bindenden Bereich innerhalb des IE1-Proteins darstellt. Vielmehr konnten weitere IE1-Protein-Abschnitte identifiziert werden, die im Gegensatz zur CTD mit allen vier core-Histonen interagieren und eine präferentielle Bindung an H3 und H4 zeigen (D 1.1 und D 1.2). Bei diesen Abschnitten handelt es sich um drei saure Domänen (AD1, AD2 und AD3), die durch das gehäufte Auftreten von Glutamat- und Aspartat-Resten charakterisiert sind und „stromaufwärts“ der CTD im carboxy-terminalen Bereich des IE1-Proteins lokalisiert sind (Abbildung E.2).

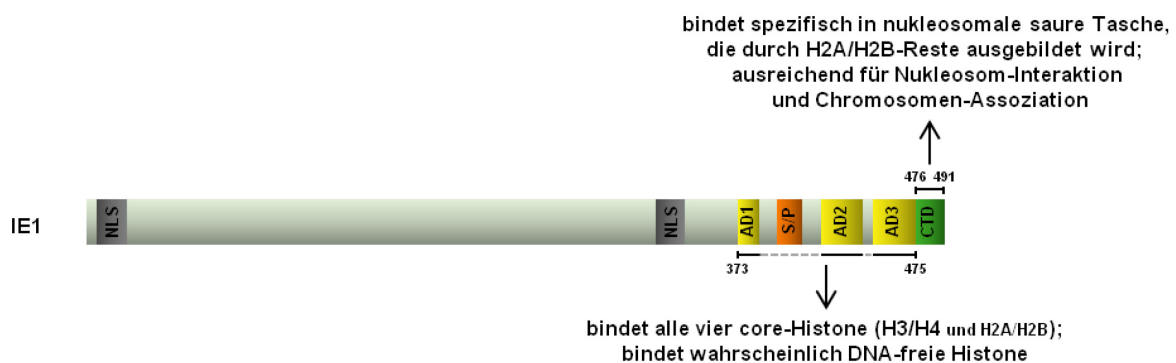


Abbildung E.2: Das IE1-Protein besitzt zwei unabhängige Histon-bindende Bereiche. Die schematische Darstellung zeigt das 491 Aminosäuren umfassende IE1-Protein (hCMV TN-Stamm) mit den beiden Protein-Bereichen, die für die Interaktion mit zellulären core-Histonen verantwortlich sind. Während die IE1-CTD (As 476-491) spezifisch in die nukleosomale saure Tasche, die durch Reste des H2A/H2B-Dimers geformt wird bindet, bilden die weiter amino-terminal gelegenen sauren Domänen (AD1: As 373-386, AD2: As 421-445, AD3: As 451-475) einen zweiten, unabhängigen Histon-bindenden Bereich, der präferentiell mit den Histonen H3 und H4 interagiert. Protein-Bereiche zwischen den ADs (angedeutet durch die grau gestrichelte Linie innerhalb des As-Abschnittes 373 bis 475) tragen wahrscheinlich nicht zur IE1-Histon-Interaktion bei (Daten nicht gezeigt). NLS, nukleäres Lokalisationssignal; AD, acidic domain; S/P, Serin/Prolin-reiche Domäne; CTD, chromatin-tethering domain.

Der molekulare Mechanismus, über den das virale Protein mit seinen sauren Protein-Bereichen an core-Histone bindet, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Die Tatsache, dass alle getesteten Alanin-mutierten H2A-Varianten eine gewisse Affinität für das Volllänge IE1-Protein zeigen deutet allerdings darauf hin, dass die sauren Domänen mit H2A- und H2B-Resten außerhalb der sauren Tasche interagieren (D 1.5). Das hCMV-kodierte IE1 ist nicht das einzige Protein, das über ein lineares Motiv in die nukleosomale saure Tasche bindet und zudem über weitere Protein-Bereiche

verfügt, die mit Histon-Resten außerhalb dieser Tasche interagieren. Auch die 214 Aminosäuren umfassende bromo-associated homology (BAH)-Domäne des SIR3-Proteins bindet mit den Resten 17 bis 37 in die saure Tasche des H2A/H2B-Dimers, während zahlreiche andere Abschnitte innerhalb der BAH-Domäne mit H2B-, H3- und H4-Resten außerhalb der sauren Tasche in Wechselwirkung treten (Armache et al., 2011).

Im Fall von IE1 erscheint es sehr naheliegend, dass die zweite Histon-bindende Aktivität auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den sauren Bereichen des viralen Proteins und basischen Resten der Histon-Proteine beruht. Während die Deletion einer der drei sauren Domänen des IE1 einen kaum merklichen Effekt auf die Histon-Interaktion zeigt, ist diese Interaktion bei gleichzeitiger Deletion aller sauren Protein-Bereiche praktisch nicht mehr nachweisbar. Daher ist davon auszugehen, dass es bei Unterschreitung einer kritischen Anzahl an negativen Ladungen im IE1-Protein zum Verlust der IE1-Histon-Wechselwirkung kommt (D 1.2). Interessanterweise führt die Substitution aller negativ geladener H2A-Reste, die nicht an der IE1-CTD-Nukleosom-Interaktion beteiligt sind, zu einer höheren Affinität der entsprechenden H2A-Varianten für das Volllänge IE1-Protein (D 1.5). Es liegt also nahe, dass durch die Neutralisation der negativen Ladungen auf Seiten von H2A die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den sauren Domänen des IE1-Proteins und dem basischen Histon aufgrund der nun fehlenden Abstoßungs-Kräfte verstärkt werden. Zudem scheint die zweite Histon-bindende Domäne des IE1 nicht mit ladungsabgeschirmten, DNA-komplexierten Histonen, sondern vielmehr mit DNA-freien Histonen zu interagieren. Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen bekräftigt, dass das um die CTD-verkürzte IE1₁₋₄₇₅ nicht in der Lage ist mit zellulärem kondensiertem Chromatin zu assoziieren und zudem nicht bzw. in sehr abgeschwächter Form an Nukleosomen bindet (D 1.3 und D 1.4). Außerdem colokalisieren IE1-Proteine sowohl nach Deletion einer der drei sauren Domänen als auch bei gleichzeitiger Deletion der AD2 und AD3 weiterhin unverändert mit zellulären Chromosomen, was eine Beteiligung der sauren Protein-Bereiche an der IE1-Chromosomen-Assoziation weitestgehend ausschließt (Reinhardt et al., 2005; Huh et al., 2008; Krauss et al., 2009).

2 Funktionelle Konsequenzen der IE1-Histon-Interaktion

2.1 Möglicher Einfluss der IE1-Histon-Interaktion auf die virale Chromatin-Struktur

Wie in der Einleitung beschrieben, wird die virale DNA sofort nach Eintritt in den Wirtszellkern mit zellulären Histonen zumindest teilweise in Nukleosomen verpackt. Dabei wird die Nukleosomen-Dichte am viralen Genom durch das in der sehr frühen Phase der Infektion akkumulierende IE1 aktiv niedrig gehalten (Nitzsche et al., 2008; Zalckvar et al., 2013). Jedoch konnte die Hypothese, dass IE1 die Reduktion der Nukleosomen-Besetzung des viralen Genoms durch die Interaktion mit Histonen gewährleistet nicht bestätigt werden (D 2.2). Die antagonistische Wirkung dieses viralen Proteins auf die Chromatinisierung des hCMV-Genoms wird demnach wahrscheinlich über einen anderen Mechanismus bewerkstelligt. Denkbar wäre beispielsweise, dass die höhere Histon-Besetzung der Genome IE1-defizienter Viren (im Vergleich zu Wildtyp Viren) womöglich mit der IE1-induzierten Auflösung von PML-Körpern zu Beginn der hCMV-Infektion in Zusammenhang steht. PML-Körper enthalten, neben anderen Chromatin-modifizierenden Enzymen, auch Histon-Chaperone, wie beispielsweise die präferentiell H3.3/H4-bindenden Chaperone HIRA und hDaxx, die beide an der Replikations-unabhängigen Besetzung genomischer DNA mit Nukleosomen beteiligt sind (Tagami et al., 2004; Drané et al., 2010). Es erscheint demnach naheliegend, dass die Chromatinisierung der in den Wirtszellkern eintretenden viralen DNA, die sofort mit PML-Körpern assoziiert, zumindest teilweise durch die in diesen Strukturen enthaltenen Histon-Chaperone erfolgt. Mit Fortschreiten der Infektion kommt es jedoch zur Auflösung der antiviral wirkenden PML-Körper durch das IE1-Protein (Paulus und Nevels, 2009), was somit möglicherweise der Besetzung der viralen DNA mit Histonen entgegenwirkt. Die hier untersuchten Histon-bindenden Bereiche des IE1-Proteins sind unterdessen nicht ausschlaggebend für die Auflösung der PML-Körper. Diese Aktivität wird vielmehr dem zentralen, hydrophoben IE1-Protein-Bereich zugeschrieben (Ahn et al., 1998; Lee et al., 2004; Huh et al., 2008; Krauss et al., 2009).

Auch ein Einfluss der IE1-Nukleosom-Interaktion auf die Kompaktierung des viralen und/oder zellulären Chromatins wäre denkbar. Wie oben bereits erwähnt ist bekannt, dass die Interaktion zwischen der sauren H2A/H2B-Tasche und der H4-Schwanz-Domäne des benachbarten Nukleosoms mit der Ausbildung höher geordneter Chromatin-Strukturen in Zusammenhang steht (Luger et al., 1997; Dorigo et al., 2003; Zhou et al., 2007). Die Bindung anderer Proteine in die saure Tasche des Nukleosoms könnte nun diese Wechselwirkung aufheben und somit der Kondensation

der Chromatin-Faser entgegenwirken. Tatsächlich lassen alle bisher vorliegenden Strukturinformationen darauf schließen, dass die entsprechenden Proteine (IE1, LANA, RCC1, IL-33, SIR3, HMG2) untereinander und mit dem Histon H4 um die Bindung in die saure Tasche des Nukleosoms konkurrieren (Kalashnikova et al., 2013). In Übereinstimmung dazu konnte gezeigt werden, dass das zelluläre Protein HMG2, welches an der Modulation der zellulären Transkription und DNA-Reparatur beteiligt ist, zur Chromatin-Dekondensation führt (Postnikov und Bustin, 2010). Für die beiden viralen Proteine IE1 und LANA wäre ein ähnlicher Einfluss auf die Chromatin-Struktur denkbar, da eine globale Chromatin-Dekondensation einen Mechanismus darstellen könnte, durch den Viren eine erhöhte Zugänglichkeit des viralen und/oder zellulären Genoms für die Transkription und andere DNA-basierte Prozesse erreichen. Der Einfluss der LANA-CTD auf die Nukleosom-Nukleosom-Interaktion und die Chromatin-Faltung wurde von Luger und Kollegen untersucht. Entgegen der Erwartungen stellte sich dabei jedoch heraus, dass das LANA-Protein Interaktionen zwischen Nukleosomen stabilisiert und zudem die Ausbildung von zellulärem Heterochromatin fördert (Chodaparambil et al., 2007). Diese Beobachtung widerspricht teilweise anderen Ergebnissen, stellt jedoch einen möglichen Mechanismus dar, über den LANA die Stilllegung weiter Teile des viralen Genoms während der Latenzphase der KSHV-Infektion gewährleistet (Stuber et al., 2007; Chodaparambil et al., 2007). Auch IL-33 und SIR3 fördern die Chromatin-Kompaktierung, indem sie die Selbstassoziation und Oligomerisierung des Nukleosoms in höher geordnete Chromatin-Strukturen verstärken (Roussel et al., 2008; Georgel et al., 2001; McBryant et al., 2008). Laut einer Hypothese von Kalashnikova und Kollegen, entscheiden die Eigenschaften des Volllänge Proteins darüber, ob es nach erfolgter Bindung des entsprechenden Proteins in die saure Tasche zur Chromatin-Kondensation oder -Dekondensation kommt. Selbst-assoziiierende Proteine, wie beispielsweise SIR3 oder LANA, führen zur Bildung von Heterochromatin, während HMG2 die Assoziation des linker-Histons H1 mit dem Nukleosom inhibiert und somit der Kondensation des HMG2-gebundenen Chromatins entgegenwirkt (Kalashnikova et al., 2013). Für das IE1-Protein wurde bisher nicht untersucht, ob die Nukleosom-Interaktion einen positiven oder negativen Effekt auf die Ausbildung höher geordneter Chromatin-Strukturen hat. Kürzlich konnte jedoch eine Teilstruktur des Rhesusaffen CMV IE1-Proteins kristallisiert werden, wobei sich zeigte, dass das virale Protein während der Infektion wahrscheinlich als Dimer vorliegt (Scherer et al., 2012). Somit wäre denkbar, dass IE1 - als selbstassoziiierendes Protein - zur Chromatin-Kondensation (während der latenten Infektion?) beiträgt.

2.2 Einfluss der IE1-Histon-Interaktion auf die virale Transkription

Eine der bisher bekannten Schlüsselfunktionen des IE1-Proteins ist die transkriptionelle Aktivierung viraler E-Gene (Greaves und Mocarski, 1998; Gawn und Greaves, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte nun anhand von transienten Transfektionen und Promotor-Reporter-Versuchen gezeigt werden, dass die Histon-Bindung zumindest teilweise mit den transaktivierenden Eigenschaften des viralen Proteins korreliert (D 2.3). Dabei stellte sich heraus, dass vor allem die Histon-bindenden sauren Abschnitte des IE1-Proteins – nicht aber die CTD – wichtig für die IE1-abhängige Transaktivierung der untersuchten viralen Promotoren sind. Die erhaltenen Ergebnisse werden durch in der Vergangenheit durchgeführte Transkomplementations-Experimente unterstützt. Anhand dieser konnte gezeigt werden, dass ein saurer Bereich (As 421-475; entspricht AD2-AD3) innerhalb des carboxy-terminalen Abschnitts des viralen Proteins für die effiziente Komplementation des Replikationsdefekts IE1-defizienter Viren in humanen Fibroblasten wichtig ist; die CTD sowie die im carboxy-terminalen Bereich auftretenden post-translationalen Modifikationen (Serin-Phosphorylierungen und SUMOylierung) werden dagegen nicht benötigt (Reinhardt et al., 2005). Demnach schien der saure Charakter der carboxy-terminalen Domäne ausschlaggebend, welcher vermutlich die basale Aktivität einer amino-terminal lokalisierten Transaktivator-Domäne verstärkt (Pizzorno et al., 1991; Spengler et al., 2002; Reinhardt et al., 2005). Interessanterweise sind die AD-Motive hinsichtlich ihrer Anzahl, Länge und relativen Position zwischen IE1-Proteinen laboradaptierter und klinischer hCMV-Stämme konserviert. Zudem tritt der saure Charakter des carboxy-terminalen Abschnitts, trotz sehr eingeschränkter globaler Homologie der primären Aminosäuresequenzen, innerhalb der IE1-Proteine verschiedenster Säuger-CMV-Spezies auf (Reinhardt et al., 2005; Krauss et al., 2009). Auch diese Tatsache lässt auf eine wichtige Rolle der sauren Protein-Abschnitte für die CMV-Replikation schließen.

Der Mechanismus, welcher der Transaktivierung viraler Promotoren durch die sauren Domänen des IE1 zugrunde liegt, ist jedoch bislang ungeklärt. Zwar sind saure Protein-Bereiche häufig an der Transaktivierungsfunktion regulatorischer Proteine beteiligt (Berk et al., 1998), beispielsweise bei dem HSV-kodierten virion protein 16 (VP16) oder dem *Saccharomyces cerevisiae*-kodierten regulatory protein Gal4 (Gal4) (Cress und Triezenberg, 1991; Gill und Ptashne, 1987); jedoch unterscheidet sich die Struktur der carboxy-terminalen sauren Domänen des IE1 von der klassischer Transaktivierungsdomänen. Demzufolge konnte der Austausch der sauren IE1-Bereiche (As 421-475) durch die weniger saure Transaktivatordomäne von Gal4 den

Replikationsdefekt IE1-defizienter Viren nicht komplementieren (Reinhardt et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass IE1 mit seinen drei sauren carboxy-terminalen Domänen an core-Histone bindet, wobei eine präferentielle Interaktion mit den Histonen H3 und H4 vorliegt (D 1.1 und D 1.2). Derartige Interaktionen sind typisch für Histon-Chaperone, die in der Regel saure Proteine darstellen, präferentiell entweder mit H2A/H2B- oder H3/H4-Dimeren interagieren und zusammen mit chromatin-remodeling-Komplexen an der dynamischen Regulation der Chromatin-Struktur beteiligt sind. Tatsächlich besitzt das hCMV IE1-Protein einige Eigenschaften eines Histon-Chaperons, die neben der Bindung von core-Histonen das Vorhandensein extrem saurer sowie unstrukturierter Protein-Bereiche umfassen (Reinhardt et al., 2005; Park und Luger, 2008; Krauss et al., 2009). Für einige Histon-Chaperone, wie beispielsweise das präferentiell H3/H4-Dimer bindende anti-silencing function 1 (Asf1) oder das sowohl H2A/H2B- als auch H3/H4-Dimere bindende nucleosome assembly protein 1 (NAP1), konnte eine wichtige Rolle bei der De- bzw. Reassemblierung von Nukleosomen während der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription gezeigt werden (Kim et al., 2007; Adkins et al., 2007; Park und Luger, 2008; Kutluay und Triezenberg, 2009). Es wäre also durchaus denkbar, dass die durch die Histon-bindenden sauren Domänen des IE1 vermittelte Transkriptionsaktivierung viraler Gene auf eine dynamische Modulation der viralen Chromatin-Struktur zurückzuführen ist. In der Tat reguliert IE1 die Transkription viraler Gene bekanntermaßen nicht nur durch die Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren (Margolis et al., 1995; Hayhurst et al., 1995; Yurochko et al., 1997; Orphanides et al., 1998), sondern auch auf epigenetischer Ebene des viralen Chromosoms (Nevels et al., 2004a; Zalckvar et al., 2013). Falls das IE1-Protein nun tatsächlich als Histon-Chaperon fungiert, könnte somit die Beteiligung dieses viralen Proteins an der dynamischen Regulation von Nukleosomen entlang des viralen Genoms im Rahmen der lytischen hCMV-Infektion und der damit verbundenen Regulation der Transkription viraler Gene erklärt werden (Zalckvar et al., 2013). Zur Überprüfung dieser Hypothese könnten Genom-weite Untersuchungen der zeitlichen Veränderungen der Nukleosomen-Besetzung an Genomen AD1-AD3-defizienter Viren im Vergleich zu IE1-defizienten Viren und Wildtyp Viren hilfreich sein.

2.3 Bedeutung der IE1-Nukleosom-Interaktion für die hCMV-Infektion

Die in dieser Arbeit vorgestellten Strukturdaten lassen darauf schließen, dass die IE1-CTD spezifisch evolviert ist, um in die saure Tasche des Nukleosoms zu binden (E 1.1). Des Weiteren zeigen Sequenzanalysen der IE1-Proteine verschiedener Primaten-CMV-Spezies, dass die CTD und, in einem noch größeren Maß, das NBM selektiv hoch konservierte Bereiche im IE1-Protein darstellen (D 2.4.4). In Übereinstimmung dazu konnte auch für das IE1-Homolog des Grünen Meerkatzen CMV eine Colokalisation mit Metaphase-Chromosomen nachgewiesen werden (Chang et al., 1995). Demgegenüber scheinen die IE1-Funktionshomologe von Nager CMV-Spezies nicht über funktionelle CTD-Sequenzen zu verfügen (Reinhardt et al., 2005). So zeigt beispielsweise das murine IE1-Funktionshomolog (mIE1) eine sehr geringe Affinität für Nukleosomen (Mücke, 2010; siehe auch Mücke et al., 2014) und assoziiert zudem nicht mit mitotischem Chromatin (Maul und Negorev, 2008; Krauss et al., 2009), obwohl mIE1 in früheren Arbeiten als Histon- und DNA-bindendes Protein beschrieben wurde (Münch et al., 1988, 1992). All diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Bindung des IE1-Proteins in die saure Tasche des Nukleosoms eine charakteristische Eigenschaft orthologer IE1-Proteine von Primaten CMV-Stämmen und somit eine Primaten-spezifische virale Anpassung darstellt. Es ist also anzunehmen, dass die IE1-CTD und somit die IE1-Nukleosom-Interaktion eine wichtige Rolle für die hCMV-Infektion spielt.

Alle bisherigen Erkenntnisse lassen jedoch darauf schließen, dass dieser äußerste carboxy-terminale Bereich des hCMV-kodierten IE1-Proteins für die lytische Virusinfektion irrelevant ist. So ist die IE1-CTD, im Gegensatz zu den sauren IE1-Protein-Abschnitten, nicht an der Transaktivierung der in dieser Arbeit untersuchten viralen Promotoren beteiligt (D 2.3) und auch für die IE1-vermittelte Reduktion der Nukleosomen-Okkupanz am viralen Genom nicht von Bedeutung (D 2.2). Zudem ist die CTD-vermittelte IE1-Nukleosom-Interaktion weder für die Komplementation des Replikationsdefekts IE1-defizienter Viren notwendig, noch hat die Deletion der IE1-CTD einen negativen Effekt auf die Replikation laboradaptierter oder klinischer hCMV-Stämme in humanen Fibroblasten (D 2.4.3, Reinhardt et al., 2005; Shin et al., 2012; Mücke et al., 2014).

Spannenderweise liefert die vorliegende Arbeit jedoch erstmals Hinweise darauf, dass IE1 und dessen CTD an der Erhaltung viraler Genome in Zellen beteiligt sind, die eine nicht produktive hCMV-Infektion unterstützen. Wie in der Einleitung beschrieben, ermöglicht LANA die Erhaltung viraler Genome während der persistierenden Infektion u.a. durch Anheftung der viralen Episome an die Chromosomen sich teilender Zellen. Auf diese Weise werden die KSHV-Genome von

einer Wirtszelle gleichmäßig auf deren Tochterzellen übertragen, wobei gleichzeitig die nukleäre Lokalisation des viralen Erbguts nach erfolgter Zellteilung gewährleistet wird. Auch das EBNA1-Protein des EBV sowie die early 2 (E2)-Proteine humaner und boviner Papillomviren erfüllen bezüglich der viralen Genomerhaltung während der latenten Phase der Infektion analoge Funktionen zu KSHV LANA (Feeney und Parish, 2009; Ohsaki und Ueda, 2012). Diese Beispiele zeigen, dass γ -Herpesviren und andere persistierende DNA-Viren konservierte Chromatin-basierte Mechanismen entwickelt haben, um die Erhaltung ihrer extrachromosomalen, zirkulären Genome in latent infizierten, proliferierenden Zellen zu gewährleisten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten nun darauf hin, dass IE1 das erste β -Herpesvirus-Protein darstellt, das über einen derartigen Segregations-Mechanismus zur viralen Genompersistenz beiträgt (Abbildung E.3 A). So konnte anhand von Infektionsexperimenten in myeloiden Zellen, die eine latente oder latenzähnliche hCMV-Infektion unterstützen gezeigt werden, dass die Stabilität der Genome IE1- bzw. IE1-CTD-defizienter Viren im Vergleich zu Wildtyp-Viren im Verlauf der Infektion deutlich reduziert ist (D 2.4.7). Zudem konnte in dieser Arbeit mittels Chromosomenpräparationen sowohl aus hCMV-infizierten myeloiden Zellen als auch aus humanen Fibroblasten erstmals eine Assoziation viraler Genome mit zellulärem mitotischem Chromatin gezeigt werden (D 2.4.7 und D 2.4.5). Dabei scheinen IE1 und dessen CTD die Effizienz mit der die virale DNA mit mitotischen Chromosomen assoziiert zu verstärken, wobei die beobachtete Assoziation nicht strikt von der IE1-Nukleosom-Interaktion abhängig ist (D 2.4.5). Bei Fehlen des Volllänge IE1-Proteins ist die Häufigkeit Chromosomen-assoziiertes virales Genom am deutlichsten verringert. Somit sind wahrscheinlich auch Bereiche im IE1-Protein außerhalb der CTD für die Anheftung viraler Genome an das zelluläre Chromatin relevant. In Übereinstimmung dazu konnte in dieser Arbeit mittels ChIP-Analysen gezeigt werden, dass IE1 nicht nur mit dem zellulären sondern auch mit dem viralen Genom interagiert, wobei die zuletzt genannte Wechselwirkung CTD-unabhängig erfolgt (D 2.4.6). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Interaktion von IE1 mit dem viralen Genom über Protein-Abschnitte vermittelt wird, die „stromaufwärts“ der CTD liegen. Interessanterweise konnten Pari und Kollegen in diesem Zusammenhang zeigen, dass IE1 in latent infizierten CD34⁺-Zellen über die sauren Protein-Bereiche an die TR-Region des viralen Episoms bindet (Tarrant-Elorza et al., 2013). So liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die CTD-vermittelte IE1-Nukleosom-Interaktion für die Verankerung des viralen Proteins am zellulären Chromatin verantwortlich ist, saure Bereiche im IE1-Protein dagegen die Bindung an das virale Genom gewährleisten. Zusammen mit der Entdeckung, dass IE1 während der hCMV-Infektion vermutlich als

Dimer vorliegt (Scherer et al., 2012), ergeben sich weitreichende Parallelen zwischen der IE1- und LANA-vermittelten Anheftung der entsprechenden viralen Genome an das mitotische zelluläre Chromatin: Beide virale Proteine binden über CTD-Sequenzen, die am äußersten Carboxy- bzw. Amino-Terminus lokalisiert sind in überaus ähnlicher Weise in die saure Tasche des Nukleosoms und somit an zelluläres Chromatin (E 1.1). Gleichzeitig interagieren beide Proteine über Bereiche außerhalb der CTD mit der TR-Region der entsprechenden viralen Episome. Zudem liegen vermutlich sowohl IE1 als auch LANA in dimerisierter Form in infizierten Zellen vor (Ballestas et al., 1999; Schwam et al., 2000; Barbera et al., 2006; siehe auch Feeney und Parish, 2009; Ohsaki und Ueda, 2012). Ein vorläufiges Modell der IE1-vermittelten Anheftung von hCMV-Genomen an mitotische zelluläre Chromosomen ist in Abbildung E.3 B dargestellt.

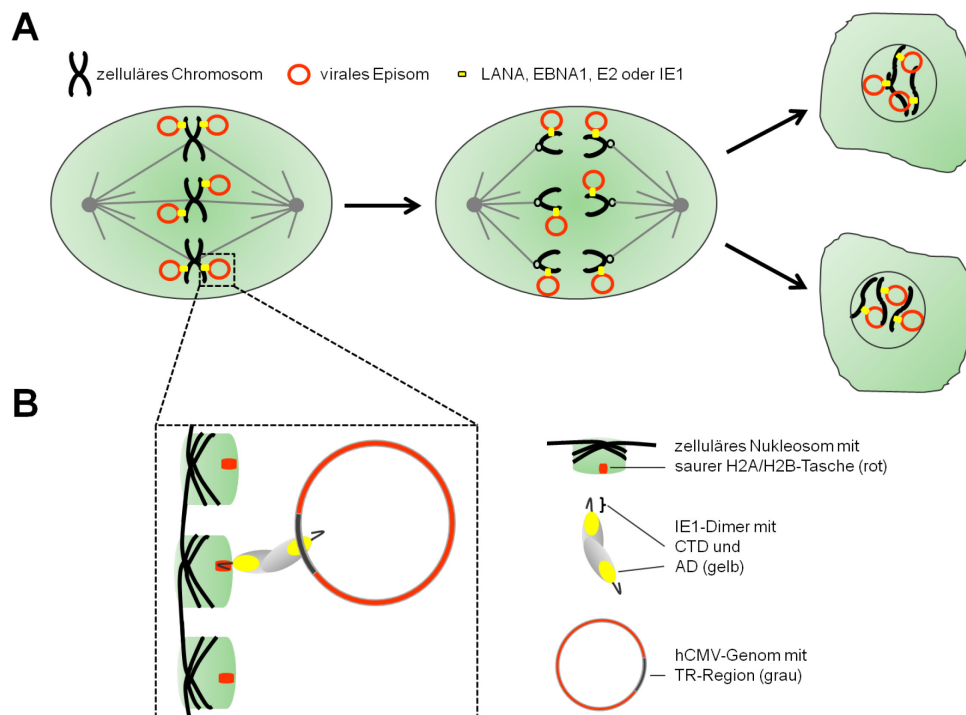


Abbildung E.3: Konservierter Segregations-Mechanismus episomaler Genome persistierender DNA-Viren und vorläufiges Modell der IE1-vermittelten Anheftung des hCMV-Genoms an zelluläre Chromosomen. (A) Die Assoziation viraler Episome der humanen γ -Herpesviren sowie der humanen und bovinen Papillomviren mit zellulären Chromosomen wird über Virus-kodierte Adaptor-Proteine vermittelt. Dadurch wird die gleichmäßige Verteilung der viralen Genome auf die Tochterzellen sowie deren nukleäre Retention nach erfolgter Zellteilung gewährleistet. Auch die Genome des β -Herpesvirus hCMV assoziieren während der Virusinfektion mit zellulärem mitotischem Chromatin. (B) Im Fall des hCMV fungiert wohl u.a. das IE1-Protein als Adaptor-Protein zwischen den Chromosomen der Wirtszelle und dem viralen Episom. Die IE1-vermittelte Anheftung der hCMV-Genome an das mitotische zelluläre Chromatin wird möglicherweise durch die Dimerisierung des viralen Proteins ermöglicht, wobei die carboxy-terminal lokalisierte CTD an jeweils ein Nukleosom der zellulären Chromosomen bindet, während vermutlich weiter amino-terminal gelegene saure Protein-Bereiche (AD) mit der TR-Region des viralen Genoms interagieren.

Im Gegensatz zu LANA, EBNA1 und E2 gilt IE1 zwar als typisch lytisches Genprodukt, jedoch wurde im Mausmodell gezeigt, dass das IE1-Funktionshomolog *in vivo* in

latent mCMV-infizierten Lungenzellen stochastisch, über das infizierte Gewebe verteilt exprimiert wird (Kurz et al., 1999; Grzimek et al., 2001). MCMV etabliert außerdem in Lebersinusoid-Endothelzellen eine latente Infektion. Im Rahmen dieser werden die beiden Transkripte IE1 (hCMV IE1) und IE3 (hCMV IE2) exprimiert, während gleichzeitig mCMV-Transkripte, die für die lytische Infektion essentiell sind, wie beispielsweise die RNA für das major capsid protein oder für gB, nicht gebildet werden (Seckert et al., 2009, 2012). Des Weiteren wurde auch für hCMV eine zumindest transiente IE1-Expression, sowohl in experimentell als auch in natürlich latent infizierten myeloiden Vorläuferzellen, von mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen beobachtet (z.B. Kondo et al., 1996; Goodrum et al., 2002; Cheung et al., 2006; Rossetto et al., 2013). Konsistent mit diesen Beobachtungen, konnte auch in der vorliegenden Arbeit IE1-Expression in latent infizierten KG1- und primären CD34⁺-Zellen nachgewiesen werden (D 2.4.7).

Andere Publikationen jedoch postulieren die vollständige Unterdrückung der MIE-Genexpression während der latenten hCMV-Infektion u.a. aufgrund der Stilllegung des MIEP durch epigenetische Repressionsmechanismen (Reeves et al., 2005a, 2005b; Saffert et al., 2010). Der reprimierte Chromatinstatus am MIEP tritt auch zu Beginn der lytischen hCMV-Infektion als Folge der Assoziation viraler Genome mit den hDaxx-enthaltenden, antiviral wirkenden PML-Körpern auf. In für die lytische hCMV-Infektion permissiven Zellen transloziert jedoch das Tegumentprotein pp71 nach erfolgter Viruspenetration in den Wirtszellkern, induziert den proteasomalen Abbau von hDaxx und hebt so die Inhibierung des MIEP auf (Woodhall et al., 2006; Saffert und Kalejta, 2006; Cantrell und Bresnahan, 2006; Hwang und Kalejta, 2007). In hCMV-infizierten Zellen, die eine latente oder latenzähnliche Infektion unterstützen hingegen akkumuliert pp71 nicht im Kern der Wirtszelle, sondern verbleibt im Cytoplasma, sodass die MIE-Genregion laut Kalejta und Kollegen strikt reprimiert bleibt (Saffert und Kalejta, 2007; Albright und Kalejta, 2013; Qin et al., 2014). Jedoch widerspricht das Modell der vollständigen Reprimierung des MIEP aufgrund der cytoplasmatischen Lokalisation von pp71 der Beobachtung, dass pp71-defiziente Viren zwar einen moi-abhängigen Replikationsdefekt aufweisen, jedoch durchaus MIE-Genexpression zeigen und in der Lage sind den lytischen Infektionszyklus zu durchlaufen (Bresnahan und Shenk, 2000).

Die vielfach beobachtete transiente und sporadisch reaktivierende IE1-Expression in latent CMV-infizierten Zellen spricht vielmehr dafür, dass der MIEP und somit die Transkription der MIE-Genregion in latent infizierten Zellen zwar stark reprimiert ist, diese Reprimierung jedoch stochastischen Schwankungen unterliegt. Prinzipiell können temporäre „desilencing“-Ereignisse während der latenten Infektion, bei der

das virale Genom durch die geschlossene Chromatin-Struktur weitgehend reprimiert vorliegt, an jedem viralen Locus auftreten. Allerdings kommen sporadische Transkriptions-Aktivierungen wohl mit höherer Wahrscheinlichkeit an besonders starken Promotoren, wie dem MIEP, vor. Folglich wurde die MIE-Genregion kürzlich als Hotspot für die Expression Latenz-assoziiierter Transkripte in latent hCMV-infizierten Zellen der myeloiden Linie beschrieben (Seckert et al., 2012; Slobedman et al., 2013).

Die Beobachtung, dass die Chromosomen-Assoziation viraler Genome nicht strikt IE1-abhängig ist (D 2.4.5), lässt darauf schließen, dass neben IE1 vermutlich weitere hCMV-Genprodukte an der Assoziation viraler Genome mit Wirtschromosomen beteiligt sind. Ein möglicher Kandidat hierfür ist das abundante Tegument Protein pp65, das nach derzeitigem Kenntnisstand das einzige hCMV-kodierte Protein neben IE1 darstellt, das mit zellulären Metaphase-Chromosomen assoziiert. Analog zur IE1-CTD ist pp65 außerdem für die lytische Virusreplikation in Zellkultur von untergeordneter Bedeutung (Schmolke et al., 1995; Dal Monte et al., 1996). Interessanterweise weist pp65 zudem eine gewisse Sequenzähnlichkeit zu EBNA1 auf. Die Sequenz-Analogien zwischen diesen beiden viralen Proteinen treten vor allem in der DNA-bindenden Region des EBV-Proteins auf (Dal Monte et al., 1996). Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass das Tegument-Protein pp65 möglicherweise an der Interaktion zwischen dem viralen und dem zellulären Chromatin beteiligt sein könnte, um zusammen mit dem IE1-Protein die lebenslange Persistenz des hCMV im Wirtsorganismus sicherzustellen.

3 Die IE1-CTD als potentieller Pathogenese-Faktor

Die persistierende hCMV-Infektion wird zunehmend mit verschiedenen Entzündungserkrankungen, wie beispielsweise Arteriosklerose oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sowie Tumorerkrankungen, wie dem Glioblastoma multiforme, in Verbindung gebracht (Mitchell et al., 2008; Scheurer et al., 2008; Lawlor und Moss, 2010; Caposio et al., 2011). Arbeiten aus unserer Forschungsgruppe deuten darauf hin, dass IE1 aufgrund seiner Fähigkeit eine Typ II-ähnliche Interferon-Antwort zu induzieren eine Rolle bei hCMV-induzierten entzündlichen Erkrankungen spielen könnte (Knoblach et al., 2011). Daneben wird IE1 antiapoptotisches, mutagenes und onkogenes Potential zugeschrieben, sodass dieses virale Protein eventuell an der Entstehung hCMV-induzierter Tumorerkrankungen beteiligt sein könnte (Zhu et al., 1995; Shen et al., 1997; Castillo und Kowalik, 2002). Mittlerweile sind einige Viren (z.B. EBV, KSHV, humane Papillomviren und Adenoviren) bekannt, die durch die Inhibierung der zellulären DNA-Schadensantwort (DNA damage response, DDR) zur

Instabilität des zellulären Genoms und zur Entstehung bösartiger Tumore beitragen. In diesem Zusammenhang wurden bis dato vor allem Virus-kodierte Proteine identifiziert, die zur Degradierung zellulärer Faktoren führen, die an DDR-Signalwegen beteiligt sind (Weitzman et al., 2010).

Ein wichtiger Mechanismus im Rahmen der DDR ist die Signalweiterleitung durch post-translationale Histon-Modifikationen (z.B. Phosphorylierung oder Ubiquitinierung) an beschädigten DNA-Bereichen. Überraschenderweise wurde in diesem Zusammenhang der nukleosomalen sauren Tasche kürzlich eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der DDR zugeschrieben. So ist die saure Tasche für die RNF168- und RING1B/BMI1-abhängige Ubiquitinierung von Lysin-Resten innerhalb der aminoterminalen (K13/15) bzw. carboxy-terminalen (K118/119) Abschnitte von H2A bzw. H2AX essentiell. Sowohl RNF168 als auch RING1B/BMI1 stellen E3 Ubiquitin-Ligasen dar, die an lädierte DNA-Bereiche rekrutiert werden und an der Aktivierung der DDR beteiligt sind. Interessanterweise inhibierte die Expression der in die saure Tasche bindenden LANA-CTD (GFP-LANA₁₋₃₂) die RNF168- und RING1B/BMI1-abhängige Ubiquitinierung des Histons H2A sowie der Histon-Variante H2AX, was zur Blockierung der DNA-Schadens-Signalweiterleitung führte (Leung et al., 2014). Da die IE1- und LANA-CTDs in äußerst ähnlicher Weise in die saure Tasche des Nukleosoms binden (E 1.1), ist es wahrscheinlich, dass auch die CTD-vermittelte IE1-Nukleosom-Interaktion mit der zellulären DDR interferiert. Die Modulation dieses für die Zelle essentiellen Signalwegs durch die beiden viralen Proteine könnte also mit der Entstehung KSHV- bzw. hCMV-induzierter Tumore oder anderer pathologischer Prozesse in Zusammenhang stehen, die im Rahmen einer persistierenden Infektion auftreten.

Die Aufklärung möglicher Auswirkungen der IE1-CTD-Nukleosom-Interaktion auf molekulare Prozesse der Wirtszelle sowie die genauere Charakterisierung der IE1-Funktion für die persistierende hCMV-Infektion könnten langfristig helfen, die Biologie und Pathogenese dieses opportunistischen Krankheitserregers besser zu erfassen und so einen wichtigen Beitrag zur Prävention und/oder Therapie von hCMV-assoziierten Krankheiten leisten.

F Anhang

1 Literaturverzeichnis

Adkins, M.W., Williams, S.K., Linger, J., and Tyler, J.K. (2007). Chromatin Disassembly from the PHO5 Promoter Is Essential for the Recruitment of the General Transcription Machinery and Coactivators. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 6372–6382.

Adler, B., Scrivano, L., Ruzsics, Z., Rupp, B., Sinzger, C., and Koszinowski, U. (2006). Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. *J. Gen. Virol.* *87*, 2451–2460.

Ahn, J.H., Brignole, E.J., 3rd, and Hayward, G.S. (1998). 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*, 4899–4913.

Albright, E.R., and Kalejta, R.F. (2013). Myeloblastic cell lines mimic some but not all aspects of human cytomegalovirus experimental latency defined in primary CD34+ cell populations. *J. Virol.* *87*, 9802–9812.

Altmann, M., Pich, D., Ruiss, R., Wang, J., Sugden, B., and Hammerschmidt, W. (2006). Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 14188–14193.

Andrews, A.J., and Luger, K. (2011). Nucleosome structure(s) and stability: variations on a theme. *Annu. Rev. Biophys.* *40*, 99–117.

Armache, K.-J., Garlick, J.D., Canzio, D., Narlikar, G.J., and Kingston, R.E. (2011). Structural Basis of Silencing: Sir3 BAH Domain in Complex with a Nucleosome at 3.0 Å Resolution. *Science* *334*, 977–982.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., and Struhl, K. (1988). *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons).

Ballestas, M.E., and Kaye, K.M. (2001). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mediates episome persistence through cis-acting terminal repeat (TR) sequence and specifically binds TR DNA. *J. Virol.* *75*, 3250–3258.

Ballestas, M.E., Chatis, P.A., and Kaye, K.M. (1999). Efficient Persistence of Extrachromosomal KSHV DNA Mediated by Latency-Associated Nuclear Antigen. *Science* *284*, 641–644.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* *21*, 381–395.

Barbera, A.J., Ballestas, M.E., and Kaye, K.M. (2004). The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 N terminus is essential for chromosome association, DNA replication, and episome persistence. *J. Virol.* *78*, 294–301.

Barbera, A.J., Chodaparambil, J.V., Kelley-Clarke, B., Joukov, V., Walter, J.C., Luger, K., and Kaye, K.M. (2006). The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science* *311*, 856–861.

Bego, M., Maciejewski, J., Khaiboullina, S., Pari, G., and St Jeor, S. (2005). Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *J. Virol.* *79*, 11022–11034.

Bego, M.G., Keyes, L.R., Maciejewski, J., and St Jeor, S.C. (2011). Human cytomegalovirus latency-associated protein LUNA is expressed during HCMV infections in vivo. *Arch. Virol.* *156*, 1847–1851.

Bell, O., Tiwari, V.K., Thomä, N.H., and Schübeler, D. (2011). Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 554–564.

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Clark, K., Lipman, D.J., Ostell, J., and Sayers, E.W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Res.* *40*, D48–53.

- Berk, A.J., Boyer, T.G., Kapanidis, A.N., Ebright, R.H., Kobayashi, N.N., Horn, P.J., Sullivan, S.M., Koop, R., Surby, M.A., and Triezenberg, S.J. (1998). Mechanisms of viral activators. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *63*, 243–252.
- Bernhardt, K. (2010). Modifikation des Zytomegalievirus-Chromatins durch das virale immediate early 1-Protein. Bachelorarbeit. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Universität Regensburg.
- Bernhardt, K. (2012). Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Chromatin-Interaktion des humanen Cytomegalievirus IE1-Proteins. Masterarbeit. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Universität Regensburg.
- Bernstein, D.I. (2011). Vaccines for cytomegalovirus. *Infect. Disord. Drug Targets* *11*, 514–525.
- Bevan, I.S., Daw, R.A., Day, P.J., Ala, F.A., and Walker, M.R. (1991). Polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus infection in a blood donor population. *Br. J. Haematol.* *78*, 94–99.
- Bloom, D.C., and Kwiatkowski, D.L. (2011). HSV-1 Latency and the Roles of the LATs. In *Alphaherpesviruses: Molecular Virology*, S.K. Weller, ed. (Horizon Scientific Press).
- Boeckh, M., and Geballe, A.P. (2011). Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J. Clin. Invest.* *121*, 1673–1680.
- Bolovan-Fritts, C.A., Mocarski, E.S., and Wiedeman, J.A. (1999). Peripheral Blood CD14+ Cells From Healthy Subjects Carry a Circular Conformation of Latent Cytomegalovirus Genome. *Blood* *93*, 394–398.
- Bresnahan, W.A., and Shenk, T.E. (2000). UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 14506–14511.
- Britt, W. (2008). Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *325*, 417–470.
- Brünger, A.T. (2007). Version 1.2 of the Crystallography and NMR system. *Nat. Protoc.* *2*, 2728–2733.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *54*, 905–921.
- Cantrell, S.R., and Bresnahan, W.A. (2006). Human cytomegalovirus (HCMV) UL82 gene product (pp71) relieves hDaxx-mediated repression of HCMV replication. *J. Virol.* *80*, 6188–6191.
- Caposio, P., Orloff, S.L., and Streblow, D.N. (2011). The role of cytomegalovirus in angiogenesis. *Virus Res.* *157*, 204–211.
- Castillo, J.P., and Kowalik, T.F. (2002). Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene* *290*, 19–34.
- Chang, Y.-N., Jeang, K.-T., Lietman, T., and Hayward, G.S. (1995). Structural Organization of the Spliced Immediate-Early Gene Complex that Encodes the Major Acidic Nuclear (IE1) and Transactivator (IE2) Proteins of African Green Monkey Cytomegalovirus. *J. Biomed. Sci.* *2*, 105–130.
- Cheung, A.K.L., Abendroth, A., Cunningham, A.L., and Slobedman, B. (2006). Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Blood* *108*, 3691–3699.
- Cheung, A.K.L., Gottlieb, D.J., Plachter, B., Pepperl-Klindworth, S., Avdic, S., Cunningham, A.L., Abendroth, A., and Slobedman, B. (2009). The role of the human cytomegalovirus UL111A gene in down-regulating CD4+ T-cell recognition of latently infected cells: implications for virus elimination during latency. *Blood* *114*, 4128–4137.
- Chodaparambil, J.V., Barbera, A.J., Lu, X., Kaye, K.M., Hansen, J.C., and Luger, K. (2007). A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 1105–1107.
- Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 273–304.
- Compton, T., Nepomuceno, R.R., and Nowlin, D.M. (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* *191*, 387–395.

- Cotter, M.A., 2nd, Subramanian, C., and Robertson, E.S. (2001). The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen binds to specific sequences at the left end of the viral genome through its carboxy-terminus. *Virology* 291, 241–259.
- Cress, W.D., and Triezenberg, S.J. (1991). Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. *Science* 251, 87–90.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., and Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190.
- Cuevas-Bennett, C., and Shenk, T. (2008). Dynamic histone H3 acetylation and methylation at human cytomegalovirus promoters during replication in fibroblasts. *J. Virol.* 82, 9525–9536.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 319, 1097–1113.
- Decker, L.L., Shankar, P., Khan, G., Freeman, R.B., Dezube, B.J., Lieberman, J., and Thorley-Lawson, D.A. (1996). The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is present as an intact latent genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients. *J. Exp. Med.* 184, 283–288.
- Deutsch, M.J., Ott, E., Papior, P., and Schepers, A. (2010). The latent origin of replication of Epstein-Barr virus directs viral genomes to active regions of the nucleus. *J. Virol.* 84, 2533–2546.
- Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K., and Richmond, T.J. (2003). Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J. Mol. Biol.* 327, 85–96.
- Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* 24, 1253–1265.
- Drew, W.L. (1992a). Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 14, 608–615.
- Drew, W.L. (1992b). Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 204–210.
- Enders, G., Daiminger, A., Lindemann, L., Knotek, F., Bäder, U., Exler, S., and Enders, M. (2012). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in pregnant women, bone marrow donors and adolescents in Germany, 1996–2010. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 201, 303–309.
- Everett, R.D., and Chelbi-Alix, M.K. (2007). PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89, 819–830.
- Falkner, F.G., and Moss, B. (1988). Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J. Virol.* 62, 1849–1854.
- Fan, J.Y., Rangasamy, D., Luger, K., and Tremethick, D.J. (2004). H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 α -mediated chromatin fiber folding. *Mol. Cell* 16, 655–661.
- Feeney, K.M., and Parish, J.L. (2009). Targeting mitotic chromosomes: a conserved mechanism to ensure viral genome persistence. *Proc. Biol. Sci.* 276, 1535–1544.
- Fink, A. (2012). Funktionelle Charakterisierung der Chromatin-Bindedomäne des Cytomegalievirus IE1-Proteins. Masterarbeit. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Universität Regensburg.
- Freed, D.C., Tang, Q., Tang, A., Li, F., He, X., Huang, Z., Meng, W., Xia, L., Finnefrock, A.C., Durr, E., et al. (2013). Pentameric complex of viral glycoprotein H is the primary target for potent neutralization by a human cytomegalovirus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E4997–5005.
- Garber, A.C., Hu, J., and Renne, R. (2002). Latency-associated nuclear antigen (LANA) cooperatively binds to two sites within the terminal repeat, and both sites contribute to the ability of LANA to suppress transcription and to facilitate DNA replication. *J. Biol. Chem.* 277, 27401–27411.
- Gardella, T., Medveczky, P., Sairenji, T., and Mulder, C. (1984). Detection of circular and linear herpesvirus DNA molecules in mammalian cells by gel electrophoresis. *J. Virol.* 50, 248–254.

- Gawn, J.M., and Greaves, R.F. (2002). Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a broad block to viral delayed-early gene expression. *J. Virol.* *76*, 4441–4455.
- Georgel, P.T., Palacios DeBeer, M.A., Pietz, G., Fox, C.A., and Hansen, J.C. (2001). Sir3-dependent assembly of supramolecular chromatin structures in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 8584–8589.
- Gill, G., and Ptashne, M. (1987). Mutants of GAL4 protein altered in an activation function. *Cell* *51*, 121–126.
- Goldberg, A.D., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* *128*, 635–638.
- Goodrum, F., Jordan, C.T., Terhune, S.S., High, K., and Shenk, T. (2004). Differential outcomes of human cytomegalovirus infection in primitive hematopoietic cell subpopulations. *Blood* *104*, 687–695.
- Goodrum, F., Reeves, M., Sinclair, J., High, K., and Shenk, T. (2007). Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro. *Blood* *110*, 937–945.
- Goodrum, F., Caviness, K., and Zagallo, P. (2012). Human cytomegalovirus persistence. *Cell. Microbiol.* *14*, 644–655.
- Goodrum, F.D., Jordan, C.T., High, K., and Shenk, T. (2002). Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: A model for latency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 16255–16260.
- Graham, F.L., and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* *52*, 456–467.
- Grant, S.G., Jesse, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 4645–4649.
- Greaves, R.F., and Mocarski, E.S. (1998). Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J. Virol.* *72*, 366–379.
- Green, M.R., and Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York:).
- Gronwald, W., Brunner, K., Kirchhöfer, R., Nasser, A., Trenner, J., Ganslmeier, B., Riepl, H., Ried, A., Scheiber, J., Elsner, R., et al. (2004). AUREMOL, a New Program for the Automated Structure Elucidation of Biological Macromolecules. *Bruker Rep* *154/155*, 11–14.
- Groves, I.J., Reeves, M.B., and Sinclair, J.H. (2009). Lytic infection of permissive cells with human cytomegalovirus is regulated by an intrinsic “pre-immediate-early” repression of viral gene expression mediated by histone post-translational modification. *J. Gen. Virol.* *90*, 2364–2374.
- Grzimek, N.K., Dreis, D., Schmalz, S., and Reddehase, M.J. (2001). Random, asynchronous, and asymmetric transcriptional activity of enhancer-flanking major immediate-early genes ie1/3 and ie2 during murine cytomegalovirus latency in the lungs. *J. Virol.* *75*, 2692–2705.
- Guan, K.L., and Dixon, J.E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal. Biochem.* *192*, 262–267.
- Hahn, G., Jores, R., and Mocarski, E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 3937–3942.
- Hahn, G., Khan, H., Baldanti, F., Koszinowski, U.H., Revello, M.G., and Gerna, G. (2002). The human cytomegalovirus ribonucleotide reductase homolog UL45 is dispensable for growth in endothelial cells, as determined by a BAC-cloned clinical isolate of human cytomegalovirus with preserved wild-type characteristics. *J. Virol.* *76*, 9551–9555.
- Hahn, G., Revello, M.G., Patrone, M., Percivalle, E., Campanini, G., Sarasini, A., Wagner, M., Gallina, A., Milanese, G., Koszinowski, U., et al. (2004). Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J. Virol.* *78*, 10023–10033.
- Hargett, D., and Shenk, T.E. (2010). Experimental human cytomegalovirus latency in CD14+ monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 20039–20044.

- Hayhurst, G.P., Bryant, L.A., Caswell, R.C., Walker, S.M., and Sinclair, J.H. (1995). CCAAT box-dependent activation of the TATA-less human DNA polymerase alpha promoter by the human cytomegalovirus 72-kilodalton major immediate-early protein. *J. Virol.* *69*, 182–188.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* *77*, 51–59.
- Hu, J., Garber, A.C., and Renne, R. (2002). The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus supports latent DNA replication in dividing cells. *J. Virol.* *76*, 11677–11687.
- Huh, Y.H., Kim, Y.E., Kim, E.T., Park, J.J., Song, M.J., Zhu, H., Hayward, G.S., and Ahn, J.-H. (2008). Binding STAT2 by the acidic domain of human cytomegalovirus IE1 promotes viral growth and is negatively regulated by SUMO. *J. Virol.* *82*, 10444–10454.
- Hume, D.A., Ross, I.L., Himes, S.R., Sasmono, R.T., Wells, C.A., and Ravasi, T. (2002). The mononuclear phagocyte system revisited. *J. Leukoc. Biol.* *72*, 621–627.
- Hwang, J., and Kalejta, R.F. (2007). Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. *Virology* *367*, 334–338.
- Ibanez, C.E., Schrier, R., Ghazal, P., Wiley, C., and Nelson, J.A. (1991). Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J. Virol.* *65*, 6581–6588.
- Ioudinkova, E., Arcangeletti, M.C., Rynditch, A., De Conto, F., Motta, F., Covan, S., Pinaridi, F., Razin, S.V., and Chezzi, C. (2006). Control of human cytomegalovirus gene expression by differential histone modifications during lytic and latent infection of a monocytic cell line. *Gene* *384*, 120–128.
- Jacobs, J.P., Jones, C.M., and Baille, J.P. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* *227*, 168–170.
- Jenkins, C., Garcia, W., Godwin, M.J., Spencer, J.V., Stern, J.L., Abendroth, A., and Slobedman, B. (2008). Immunomodulatory properties of a viral homolog of human interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection. *J. Virol.* *82*, 3736–3750.
- Kalashnikova, A.A., Porter-Goff, M.E., Muthurajan, U.M., Luger, K., and Hansen, J.C. (2013). The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. *J. R. Soc. Interface R. Soc.* *10*, 20121022.
- Kalejta, R.F. (2008). Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *72*, 249–265.
- Kan, P.-Y., Caterino, T.L., and Hayes, J.J. (2009). The H4 tail domain participates in intra- and internucleosome interactions with protein and DNA during folding and oligomerization of nucleosome arrays. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 538–546.
- Kaplan, N., Hughes, T.R., Lieb, J.D., Widom, J., and Segal, E. (2010). Contribution of histone sequence preferences to nucleosome organization: proposed definitions and methodology. *Genome Biol.* *11*, 140.
- Kapoor, P., and Frappier, L. (2003). EBNA1 partitions Epstein-Barr virus plasmids in yeast cells by attaching to human EBNA1-binding protein 2 on mitotic chromosomes. *J. Virol.* *77*, 6946–6956.
- Kapoor, P., Shire, K., and Frappier, L. (2001). Reconstitution of Epstein-Barr virus-based plasmid partitioning in budding yeast. *EMBO J.* *20*, 222–230.
- Kato, H., van Ingen, H., Zhou, B.-R., Feng, H., Bustin, M., Kay, L.E., and Bai, Y. (2011). Architecture of the high mobility group nucleosomal protein 2-nucleosome complex as revealed by methyl-based NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 12283–12288.
- Khaiboullina, S.F., Maciejewski, J.P., Crapnell, K., Spallone, P.A., Dean Stock, A., Pari, G.S., Zanjani, E.D., and Jeor, S.S. (2004). Human cytomegalovirus persists in myeloid progenitors and is passed to the myeloid progeny in a latent form. *Br. J. Haematol.* *126*, 410–417.
- Kim, H.-J., Seol, J.-H., Han, J.-W., Youn, H.-D., and Cho, E.-J. (2007). Histone chaperones regulate histone exchange during transcription. *EMBO J.* *26*, 4467–4474.
- Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2013). *Fields Virology* (Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins).

- Knoblach, T. (2010). Das Cytomegalievirus IE1-Protein als Regulator des humanen Transkriptoms und Zielstruktur RNAi-basierter Therapiestrategien. Dissertation. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Universität Regensburg.
- Knoblach, T., Grandel, B., Seiler, J., Nevels, M., and Paulus, C. (2011). Human cytomegalovirus IE1 protein elicits a type II interferon-like host cell response that depends on activated STAT1 but not interferon- γ . *PLoS Pathog.* *7*, e1002016.
- Koeffler, H.P., and Golde, D.W. (1978). Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* *200*, 1153–1154.
- Kondo, K., Kaneshima, H., and Mocarski, E.S. (1994). Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 11879–11883.
- Kondo, K., Xu, J., and Mocarski, E.S. (1996). Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 11137–11142.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* *184*, 868–871.
- Koshland, D.E. (1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *44*, 98–104.
- Krauss, S. (2007). Molekulare Mechanismen der Interferon-Resistenz humaner Zytomegalieviren. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Universität Regensburg.
- Krauss, S., Kaps, J., Czech, N., Paulus, C., and Nevels, M. (2009). Physical requirements and functional consequences of complex formation between the cytomegalovirus IE1 protein and human STAT2. *J. Virol.* *83*, 12854–12870.
- Kurath, S., Halwachs-Baumann, G., Müller, W., and Resch, B. (2010). Transmission of cytomegalovirus via breast milk to the prematurely born infant: a systematic review. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *16*, 1172–1178.
- Kurz, S.K., Rapp, M., Steffens, H.P., Grzimek, N.K., Schmalz, S., and Reddehase, M.J. (1999). Focal transcriptional activity of murine cytomegalovirus during latency in the lungs. *J. Virol.* *73*, 482–494.
- Kutluay, S.B., and Triezenberg, S.J. (2009). Role of chromatin during herpesvirus infections. *Biochim. Biophys. Acta* *1790*, 456–466.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lafemina, R.L., Pizzorno, M.C., Mosca, J.D., and Hayward, G.S. (1989). Expression of the acidic nuclear immediate-early protein (IE1) of human cytomegalovirus in stable cell lines and its preferential association with metaphase chromosomes. *Virology* *172*, 584–600.
- Lawlor, G., and Moss, A.C. (2010). Cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: pathogen or innocent bystander? *Inflamm. Bowel Dis.* *16*, 1620–1627.
- Lee, H.-R., Kim, D.-J., Lee, J.-M., Choi, C.Y., Ahn, B.-Y., Hayward, G.S., and Ahn, J.-H. (2004). Ability of the human cytomegalovirus IE1 protein to modulate sumoylation of PML correlates with its functional activities in transcriptional regulation and infectivity in cultured fibroblast cells. *J. Virol.* *78*, 6527–6542.
- Leung, J.W., Agarwal, P., Canny, M.D., Gong, F., Robison, A.D., Finkelstein, I.J., Durocher, D., and Miller, K.M. (2014). Nucleosome Acidic Patch Promotes RNF168- and RING1B/BMI1-Dependent H2AX and H2A Ubiquitination and DNA Damage Signaling. *PLoS Genet.* *10*, e1004178.
- Lieberman, P.M. (2006). Chromatin regulation of virus infection. *Trends Microbiol.* *14*, 132–140.
- Lindner, S.E., and Sugden, B. (2007). The plasmid replicon of Epstein-Barr virus: mechanistic insights into efficient, licensed, extrachromosomal replication in human cells. *Plasmid* *58*, 1–12.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251–260.
- Luger, K., Dechassa, M.L., and Tremethick, D.J. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 436–447.

- Macias, M.P., and Stinski, M.F. (1993). 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*, 707–711.
- Makde, R.D., England, J.R., Yennawar, H.P., and Tan, S. (2010). Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. *Nature* *467*, 562–566.
- Malm, G., and Engman, M.-L. (2007). Congenital cytomegalovirus infections. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* *12*, 154–159.
- Margolis, M.J., Pajovic, S., Wong, E.L., Wade, M., Jupp, R., Nelson, J.A., and Azizkhan, J.C. (1995). Interaction of the 72-kilodalton human cytomegalovirus IE1 gene product with E2F1 coincides with E2F-dependent activation of dihydrofolate reductase transcription. *J. Virol.* *69*, 7759–7767.
- Maul, G.G., and Negorev, D. (2008). Differences between mouse and human cytomegalovirus interactions with their respective hosts at immediate early times of the replication cycle. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* *197*, 241–249.
- McBryant, S.J., Krause, C., Woodcock, C.L., and Hansen, J.C. (2008). The silent information regulator 3 protein, SIR3p, binds to chromatin fibers and assembles a hypercondensed chromatin architecture in the presence of salt. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3563–3572.
- McGraw, B.R., and Marinus, M.G. (1980). Isolation and characterization of Dam⁺ revertants and suppressor mutations that modify secondary phenotypes of dam-3 strains of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* *MGG 178*, 309–315.
- McVoy, M.A., and Adler, S.P. (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* *68*, 1040–1051.
- Meier, J.L., and Stinski, M.F. (2013). Major immediate-early enhancers and its gene products. *Cytomegaloviruses Mol. Pathog. Interv.* *1*, 152–173.
- Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P., and Sinclair, J. (1996). Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34⁺ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* *77 (Pt 12)*, 3099–3102.
- Miller, M.S., and Hertel, L. (2009). Onset of human cytomegalovirus replication in fibroblasts requires the presence of an intact vimentin cytoskeleton. *J. Virol.* *83*, 7015–7028.
- Minton, E.J., Tysoe, C., Sinclair, J.H., and Sissons, J.G. (1994). Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J. Virol.* *68*, 4017–4021.
- Mitchell, D.A., Xie, W., Schmittling, R., Learn, C., Friedman, A., McLendon, R.E., and Sampson, J.H. (2008). Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. *Neuro-Oncol.* *10*, 10–18.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S.M., Nau, M.M., Carbone, D., D’Amico, D., Bodner, S., Oie, H.K., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., and Minna, J.D. (1992). p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* *7*, 171–180.
- Mocarski, E.S., Kemble, G.W., Lyle, J.M., and Greaves, R.F. (1996). A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 11321–11326.
- Mocarski, E.S., Shenk, T., Griffith, P.D., and Pass, R.F. (2013). Cytomegaloviruses. In *Fields’ Virology*, D.M. Knipe, and P. Howley, eds. (New York, NY: Raven Press).
- Modrow, S., Falke, D., and Truyen, U. (2010). Herpesviren. In *Molekulare Virologie. Eine Einführung Für Biologen Und Mediziner*, (Spektrum Akademischer Verlag), pp. 544–607.
- Möglich, A., Weinfurter, D., Gronwald, W., Maurer, T., and Kalbitzer, H.R. (2005). PERMOL: restraint-based protein homology modeling using DYANA or CNS. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *21*, 2110–2111.
- Dal Monte, P., Bessia, C., Landini, M.P., and Michelson, S. (1996). Expression of human cytomegalovirus ppUL83 (pp65) in a stable cell line and its association with metaphase chromosomes. *J. Gen. Virol.* *77 (Pt 10)*, 2591–2596.
- Mücke, K. (2010). Untersuchungen zur Interaktion des Cytomegalievirus IE1-Proteins mit humanen Chromatin-Proteinen. Diplomarbeit. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Universität Regensburg.

- Mücke, K., Paulus, C., Bernhardt, K., Gerrer, K., Schön, K., Fink, A., Sauer, E.-M., Asbach-Nitzsche, A., Harwardt, T., Kieninger, B., et al. (2014). Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early 1 Protein Targets Host Chromosomes by Docking to the Acidic Pocket on the Nucleosome Surface. *J. Virol.* *88*, 1228–1248.
- Mulligan, R.C., and Berg, P. (1981). Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 2072–2076.
- Münch, K., Keil, G.M., Messerle, M., and Koszinowski, U.H. (1988). Interaction of the 89K murine cytomegalovirus immediate-early protein with core histones. *Virology* *163*, 405–412.
- Münch, K., Messerle, M., Plachter, B., and Koszinowski, U.H. (1992). An acidic region of the 89K murine cytomegalovirus immediate early protein interacts with DNA. *J. Gen. Virol.* *73* (Pt 3), 499–506.
- Murphy, J.C., Fischle, W., Verdin, E., and Sinclair, J.H. (2002). Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J.* *21*, 1112–1120.
- Nanbo, A., Sugden, A., and Sugden, B. (2007). The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. *EMBO J.* *26*, 4252–4262.
- Nevels, M., Paulus, C., and Shenk, T. (2004a). Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17234–17239.
- Nevels, M., Brune, W., and Shenk, T. (2004b). SUMOylation of the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein facilitates expression of the 86-kilodalton IE2 protein and promotes viral replication. *J. Virol.* *78*, 7803–7812.
- Nitzsche, A. (2010). Epigenetische Organisation des Cytomegalievirus-Genoms. Dissertation. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Universität Regensburg.
- Nitzsche, A., Paulus, C., and Nevels, M. (2008). Temporal dynamics of cytomegalovirus chromatin assembly in productively infected human cells. *J. Virol.* *82*, 11167–11180.
- Nitzsche, A., Steinhäusser, C., Mücke, K., Paulus, C., and Nevels, M. (2012). Histone H3 lysine 4 methylation marks postreplicative human cytomegalovirus chromatin. *J. Virol.* *86*, 9817–9827.
- Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., and Mierendorf, R. (2001). Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *inNovations* 1–3.
- Ohsaki, E., and Ueda, K. (2012). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partitioning, and Maintenance in Latency. *Front. Microbiol.* *3*, 7.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S., and Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* *92*, 105–116.
- Park, Y.-J., and Luger, K. (2008). Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *18*, 282–289.
- Paulus, C., and Nevels, M. (2009). The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins as Antagonists of Intrinsic and Innate Antiviral Host Responses. *Viruses* *1*, 760–779.
- Paulus, C., Krauss, S., and Nevels, M. (2006). A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3840–3845.
- Pawelec, G., Akbar, A., Beverley, P., Caruso, C., Derhovanessian, E., Fülöp, T., Griffiths, P., Grubeck-Loebenstein, B., Hamprecht, K., Jahn, G., et al. (2010). Immunosenescence and Cytomegalovirus: where do we stand after a decade? *Immun. Ageing A* *7*, 13.
- Petrucci, A., Rak, M., Grainger, L., and Goodrum, F. (2009). Characterization of a novel Golgi apparatus-localized latency determinant encoded by human cytomegalovirus. *J. Virol.* *83*, 5615–5629.
- Pizzorno, M.C., Mullen, M.A., Chang, Y.N., and Hayward, G.S. (1991). 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*, 3839–3852.
- Poole, E., McGregor Dallas, S.R., Colston, J., Joseph, R.S.V., and Sinclair, J. (2011). Virally induced changes in cellular microRNAs maintain latency of human cytomegalovirus in CD34⁺ progenitors. *J. Gen. Virol.* *92*, 1539–1549.

- Postnikov, Y., and Bustin, M. (2010). Regulation of chromatin structure and function by HMGN proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 62–68.
- Qin, Q., Lee, S.H., Liang, R., and Kalejta, R.F. (2014). Insertion of myeloid-active elements into the human cytomegalovirus major immediate early promoter is not sufficient to drive its activation upon infection of undifferentiated myeloid cells. *Virology* 448, 125–132.
- Reeves, M., and Sinclair, J. (2008). Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 297–313.
- Reeves, M., Sissons, P., and Sinclair, J. (2005a). Reactivation of human cytomegalovirus in dendritic cells. *Discov. Med.* 5, 170–174.
- Reeves, M.B., MacAry, P.A., Lehner, P.J., Sissons, J.G.P., and Sinclair, J.H. (2005b). Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4140–4145.
- Reinhardt, J., Smith, G.B., Himmelheber, C.T., Azizkhan-Clifford, J., and Mocarski, E.S. (2005). The carboxyl-terminal region of human cytomegalovirus IE1491aa contains an acidic domain that plays a regulatory role and a chromatin-tethering domain that is dispensable during viral replication. *J. Virol.* 79, 225–233.
- Reitsma, J.M., Sato, H., Nevels, M., Terhune, S.S., and Paulus, C. (2013). Human cytomegalovirus IE1 protein disrupts interleukin-6 signaling by sequestering STAT3 in the nucleus. *J. Virol.* 87, 10763–10776.
- Rippe, K., Schrader, A., Riede, P., Strohnner, R., Lehmann, E., and Längst, G. (2007). DNA sequence- and conformation-directed positioning of nucleosomes by chromatin-remodeling complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15635–15640.
- Roizman, B., and Baines, J. (1991). The diversity and unity of herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 14, 63–79.
- Rossetto, C.C., Tarrant-Elorza, M., and Pari, G.S. (2013). Cis and trans acting factors involved in human cytomegalovirus experimental and natural latent infection of CD14 (+) monocytes and CD34 (+) cells. *PLoS Pathog.* 9, e1003366.
- Roussel, L., Erard, M., Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2008). Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* 9, 1006–1012.
- Rubin, R.H. (1990). Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev. Infect. Dis.* 12 Suppl 7, S754–766.
- Ryckman, B.J., Jarvis, M.A., Drummond, D.D., Nelson, J.A., and Johnson, D.C. (2006). Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J. Virol.* 80, 710–722.
- Ryckman, B.J., Chase, M.C., and Johnson, D.C. (2008). HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14118–14123.
- Saffert, R.T., and Kalejta, R.F. (2006). Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J. Virol.* 80, 3863–3871.
- Saffert, R.T., and Kalejta, R.F. (2007). Human cytomegalovirus gene expression is silenced by Daxx-mediated intrinsic immune defense in model latent infections established in vitro. *J. Virol.* 81, 9109–9120.
- Saffert, R.T., and Kalejta, R.F. (2008). Promyelocytic leukemia-nuclear body proteins: herpesvirus enemies, accomplices, or both? *Future Virol.* 3, 265–277.
- Saffert, R.T., Penkert, R.R., and Kalejta, R.F. (2010). Cellular and Viral Control over the Initial Events of Human Cytomegalovirus Experimental Latency in CD34+ Cells. *J. Virol.* 84, 5594–5604.
- Sambucetti, L.C., Cherrington, J.M., Wilkinson, G.W., and Mocarski, E.S. (1989). NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J.* 8, 4251–4258.
- Scherer, M., Klingl, S., Sevvena, M., Muller, Y.A., and Stamminger, T. (2012). Crystallization, preliminary structure determination and functional characterization of the major immediate early protein IE1 of primate cytomegaloviruses.

- Scheurer, M.E., Bondy, M.L., Aldape, K.D., Albrecht, T., and El-Zein, R. (2008). Detection of human cytomegalovirus in different histological types of gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 116, 79–86.
- Schmolke, S., Kern, H.F., Drescher, P., Jahn, G., and Plachter, B. (1995). The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. *J. Virol.* 69, 5959–5968.
- Schrier, R.D., Nelson, J.A., and Oldstone, M.B. (1985). Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science* 230, 1048–1051.
- Schwam, D.R., Luciano, R.L., Mahajan, S.S., Wong, L., and Wilson, A.C. (2000). Carboxy Terminus of Human Herpesvirus 8 Latency-Associated Nuclear Antigen Mediates Dimerization, Transcriptional Repression, and Targeting to Nuclear Bodies. *J. Virol.* 74, 8532–8540.
- Sears, J., Ujihara, M., Wong, S., Ott, C., Middeldorp, J., and Aiyar, A. (2004). The amino terminus of Epstein-Barr Virus (EBV) nuclear antigen 1 contains AT hooks that facilitate the replication and partitioning of latent EBV genomes by tethering them to cellular chromosomes. *J. Virol.* 78, 11487–11505.
- Seckert, C.K., Renzaho, A., Tervo, H.-M., Krause, C., Deegen, P., Kühnapfel, B., Reddehase, M.J., and Grzimek, N.K.A. (2009). Liver sinusoidal endothelial cells are a site of murine cytomegalovirus latency and reactivation. *J. Virol.* 83, 8869–8884.
- Seckert, C.K., Griessler, M., Büttner, J.K., Scheller, S., Simon, C.O., Kropp, K.A., Renzaho, A., Kühnapfel, B., Grzimek, N.K.A., and Reddehase, M.J. (2012). Viral latency drives “memory inflation”: a unifying hypothesis linking two hallmarks of cytomegalovirus infection. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 201, 551–566.
- Segal, E., and Widom, J. (2009). What controls nucleosome positions? *Trends Genet.* 25, 335–343.
- Shen, Y., Zhu, H., and Shen, T. (1997). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate “hit-and-run” oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3341–3345.
- Shio, Y., and Eisenman, R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13225–13230.
- Shin, H.J., Kim, Y.-E., Kim, E.T., and Ahn, J.-H. (2012). The chromatin-tethering domain of human cytomegalovirus immediate-early (IE) 1 mediates associations of IE1, PML and STAT2 with mitotic chromosomes, but is not essential for viral replication. *J. Gen. Virol.* 93, 716–721.
- Sinclair, J. (2008). Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J. Clin. Virol.* 41, 180–185.
- Sinclair, J., and Sissons, P. (1996). Latent and persistent infections of monocytes and macrophages. *Intervirology* 39, 293–301.
- Sindre, H., Tjønnfjord, G.E., Rollag, H., Ranneberg-Nilsen, T., Veiby, O.P., Beck, S., Degré, M., and Hestdal, K. (1996). Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 88, 4526–4533.
- Sinzger, C., and Jahn, G. (1996). Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 39, 302–319.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H., and Jahn, G. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 4), 741–750.
- Sinzger, C., Schmidt, K., Knapp, J., Kahl, M., Beck, R., Waldman, J., Hebart, H., Einsele, H., and Jahn, G. (1999). Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *J. Gen. Virol.* 80, 2867–2877.
- Sinzger, C., Hahn, G., Digel, M., Katona, R., Sampaio, K.L., Messerle, M., Hengel, H., Koszinowski, U., Brune, W., and Adler, B. (2008). Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J. Gen. Virol.* 89, 359–368.
- Sissons, J.G.P., and Carmichael, A.J. (2002). Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. *J. Infect.* 44, 78–83.
- Slobedman, B., and Mocarski, E.S. (1999). Quantitative Analysis of Latent Human Cytomegalovirus. *J. Virol.* 73, 4806–4812.

- Slobedman, B., Avdic, S., and Abendroth, A. (2013). Transcription associated with human cytomegalovirus latency. In *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention*, M.J. Reddehase, ed.
- Smith, M.S., Bentz, G.L., Alexander, J.S., and Yurochko, A.D. (2004). Human Cytomegalovirus Induces Monocyte Differentiation and Migration as a Strategy for Dissemination and Persistence. *J. Virol.* *78*, 4444–4453.
- Söderberg-Nauclér, C., Fish, K.N., and Nelson, J.A. (1997). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* *91*, 119–126.
- Söderberg-Nauclér, C., Streblow, D.N., Fish, K.N., Allan-Yorke, J., Smith, P.P., and Nelson, J.A. (2001). Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent. *J. Virol.* *75*, 7543–7554.
- Spaete, R.R., Gehrz, R.C., and Landini, M.P. (1994). Human cytomegalovirus structural proteins. *J. Gen. Virol.* *75* (Pt 12), 3287–3308.
- Spengler, M.L., Kurapatwinski, K., Black, A.R., and Azizkhan-Clifford, J. (2002). SUMO-1 modification of human cytomegalovirus IE1/IE72. *J. Virol.* *76*, 2990–2996.
- Stagno, S., Reynolds, D.W., Pass, R.F., and Alford, C.A. (1980). Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* *302*, 1073–1076.
- Stanier, P., Taylor, D.L., Kitchen, A.D., Wales, N., Tryhorn, Y., and Tyms, A.S. (1989). Persistence of cytomegalovirus in mononuclear cells in peripheral blood from blood donors. *BMJ* *299*, 897–898.
- Stedman, W., Deng, Z., Lu, F., and Lieberman, P.M. (2004). ORC, MCM, and histone hyperacetylation at the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent replication origin. *J. Virol.* *78*, 12566–12575.
- Stern-Ginossar, N., Weisburd, B., Michalski, A., Le, V.T.K., Hein, M.Y., Huang, S.-X., Ma, M., Shen, B., Qian, S.-B., Hengel, H., et al. (2012). Decoding Human Cytomegalovirus. *Science* *338*, 1088–1093.
- Stinski, M.F. (1978). Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J. Virol.* *26*, 686–701.
- Stuber, G., Mattsson, K., Flaberg, E., Kati, E., Markasz, L., Sheldon, J.A., Klein, G., Schulz, T.F., and Szekely, L. (2007). HHV-8 encoded LANA-1 alters the higher organization of the cell nucleus. *Mol. Cancer* *6*, 28.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* *116*, 51–61.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 264–275.
- Tarrant-Elorza, M., Rossetto, C.C., and Pari, G.S. (2013). The HCMV Terminal Repeat Element Mediates Viral Genome Maintenance during Latency and Interacts with Viral and Cellular Factors.
- Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H., and Hay, R.T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J. Biol. Chem.* *276*, 35368–35374.
- Tavalai, N., and Stamminger, T. (2008). New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection. *Biochim. Biophys. Acta* *1783*, 2207–2221.
- Tavalai, N., and Stamminger, T. (2011). Intrinsic cellular defense mechanisms targeting human cytomegalovirus. *Virus Res.* *157*, 128–133.
- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G., Borysiewicz, L.K., and Sinclair, J.H. (1991). Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* *72* (Pt 9), 2059–2064.
- Terhune, S.S., Schröer, J., and Shenk, T. (2004). RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J. Virol.* *78*, 10390–10398.
- Thorley-Lawson, D.A. (2005). EBV the prototypical human tumor virus—just how bad is it? *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 251–261.

- Tischer, B.K., von Einem, J., Kaufer, B., and Osterrieder, N. (2006). Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *BioTechniques* *40*, 191–197.
- Tischer, B.K., Smith, G.A., and Osterrieder, N. (2010). En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *634*, 421–430.
- Umashankar, M., Petrucelli, A., Cicchini, L., Caposio, P., Kreklywich, C.N., Rak, M., Bughio, F., Goldman, D.C., Hamlin, K.L., Nelson, J.A., et al. (2011). A novel human cytomegalovirus locus modulates cell type-specific outcomes of infection. *PLoS Pathog.* *7*, e1002444.
- Vancíková, Z., and Dvorák, P. (2001). Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individuals--a review. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metab. Disord.* *1*, 179–187.
- Varnum, S.M., Streblow, D.N., Monroe, M.E., Smith, P., Auberry, K.J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D.G., 2nd, Rodland, K., Wiley, S., et al. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.* *78*, 10960–10966.
- Verma, S.C., Choudhuri, T., Kaul, R., and Robertson, E.S. (2006). Latency-associated nuclear antigen (LANA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with origin recognition complexes at the LANA binding sequence within the terminal repeats. *J. Virol.* *80*, 2243–2256.
- Wang, D., and Shenk, T. (2005). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18153–18158.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., and Barton, G.J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *25*, 1189–1191.
- Weitzman, M.D., Lilley, C.E., and Chaurushiya, M.S. (2010). Genomes in Conflict: Maintaining Genome Integrity During Virus Infection. *Annu. Rev. Microbiol.* *64*, 61–81.
- White, K.L., Slobedman, B., and Mocarski, E.S. (2000). Human Cytomegalovirus Latency-Associated Protein pORF94 Is Dispensable for Productive and Latent Infection. *J. Virol.* *74*, 9333–9337.
- Wilkinson, G.W., Kelly, C., Sinclair, J.H., and Rickards, C. (1998). Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J. Gen. Virol.* *79 (Pt 5)*, 1233–1245.
- Woodhall, D.L., Groves, I.J., Reeves, M.B., Wilkinson, G., and Sinclair, J.H. (2006). Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J. Biol. Chem.* *281*, 37652–37660.
- Wu, H., Ceccarelli, D.F., and Frappier, L. (2000). The DNA segregation mechanism of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *EMBO Rep.* *1*, 140–144.
- Yurochko, A.D., Mayo, M.W., Poma, E.E., Baldwin, A.S., Jr, and Huang, E.S. (1997). Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. *J. Virol.* *71*, 4638–4648.
- Zalckvar, E., Paulus, C., Tillo, D., Asbach-Nitzsche, A., Lubling, Y., Winterling, C., Strieder, N., Mücke, K., Goodrum, F., Segal, E., et al. (2013). Nucleosome maps of the human cytomegalovirus genome reveal a temporal switch in chromatin organization linked to a major IE protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 13126–13131.
- Zerboni, L., and Arvin, A.M. (2011). Varicella-zoster Virus Pathogenesis and Latency. In *Alphaherpesviruses: Molecular Virology*, S.K. Weller, ed. (Horizon Scientific Press).
- Zhou, J., Fan, J.Y., Rangasamy, D., and Tremethick, D.J. (2007). The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 1070–1076.
- Zhu, H., Shen, Y., and Shenk, T. (1995). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J. Virol.* *69*, 7960–7970.

2 Abkürzungsverzeichnis

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

AD	acidic domain	Gal4	regulatory protein Gal4
As	Aminosäure	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Asf1	anti-silencing function 1	gB	Glycoprotein B
ATRX	α -thalassemia/mental retardation syndrome X-linked protein	gH	Glykoprotein H
Bacmid	bacterial artificial chromosome	gL	Glykoprotein L
BAH	bromo-associated homology	gO	Glykoprotein O
BMI1	B lymphoma Moloney murine leukemia virus insertion region 1 homolog	GST	Glutathion-S-Transferase
BSA	bovines Serumalbumin	gt	Ziege
Cam	Chloramphenicol	H	Histon
cDNA	copy DNA	HA	Hämagglutinin
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation	HBG	γ -Globin
cmvIL-10	CMV Homolog des humanen Interleukin-10	hCMV	humanes Cytomegalievirus
CoIP	Coimmunpräzipitation	HDAC	Histondeacetylase
CP	crossing point	hDaxx	human death domain-associated protein
CTD	chromatin-tethering domain	HHV	humanes Herpesvirus
CTF1	CAAT-box-binding transcription factor 1	HIRA	histone regulator A
CXCL10	C-X-C Motiv-Ligand 10	HMGN2	high-mobility group nucleosomal 2
DAPI	4,6 Diamidino-2-phenylindol	HPC	hämatopoetische Vorläuferzelle
DDR	DNA damage response	HRP	horseradish peroxidase
dl	deletiert	HSV	Herpes Simplex Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure	IE	immediate early
DNase	Desoxyribonuklease	IF	Immunfluoreszenz
DTT	Dithiothreitol	IgG	Immunglobulin G
E	early	IL-33	Interleukin 33
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	IP	Immunpräzipitation
E2F1	transcription factor E2F1	IR	internal repeat
EBNA1	EBV nukleäres Antigen 1	ISG	Interferon stimuliertes Gen
EBP2	EBNA1 binding protein 2	Kan	Kanamycin
EBV	Epstein-Barr-Virus	KSHV	Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	L	late
EGFP	enhanced green fluorescent protein	LANA	Latenz-assoziiertes nukleäres Antigen
et al.	und andere	LB	Luria-Bertani
FACS	fluorescence-activated cell sorting	LUNA	latent undefined nuclear antigen
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung	m	Maus
FKS	fötales Kälberserum	mCMV	murines Cytomegalievirus
FX	klinisches hCMV-Isolat FIX	MIE	major immediate-early

mIE1	mCMV IE1-Protein	RNase	Ribonuklease
MIEP	major immediate early-Promotor	RNF168	ring finger protein 168
Minus-RT	ohne Reverse Transkriptase	RPL30	ribosomales Protein L30
moi	multiplicity of infection	RPPH1	ribonuclease P RNA component H1
mRNA	messenger RNA	RT	Raumtemperatur
NAP1	nucleosome assembly protein 1	rt	Ratte
NBM	Nukleosom-bindendes Motiv	rv	revertiert
ND10	nuclear domain 10	S/P	Serin/Prolin-reiche Domäne
NEB	New England Biolabs	Sat2	pericentromerische Satelliten-DNA 2
NLS	nukleäres Lokalisationssignal	SDS	Natriumdodecylsulfat
OD	optische Dichte	SIR3	silent information regulator 3
P	Promotor	Sp1	specificity protein 1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	STAT	signal transducer and activator of transcription
PBS	phosphate buffered saline	SV	Simian Virus
PCR	polymerase chain reaktion	T	transkribierter Bereich
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin	TAP1	transporter associated with antigen processing 1
PFU	plaque-forming unit	TB	klinisches hCMV-Isolat TB40/E
PML	promyelocytic leukemia	TetR	Tetracyclin-Repressor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	TN	laboradaptierter hCMV-Stamm Towne
PMT	photomultiplier tube	TNF	Tumornekrosefaktor
pp65	Phosphoprotein 65	TR	terminal repeat
pp71	Phosphoprotein 71	TUBB	Tubulin
q-PCR	quantitative PCR	UL	unique long
q-RT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-PCR	US	unique short
rb	Kaninchen	VP16	virion protein 16
RCC1	regulator of chromosome condensation 1	VZV	Varizella-Zoster-Virus
RING1B	ring finger protein 1B	w/o	leere Vektorkontrolle
RMSD	root-mean-square-deviation	WB	Western Blot
RNA	Ribonukleinsäure	wt	Wildtyp

3 Veröffentlichungen

Posterpräsentationen bei Fachtagungen

Paulus C., Nitzsche A., Winterling C., **Mücke, K.**, Nevels M. A unique state of lytic HCMV chromatin maintained by the viral IE1 protein. European Congress of Virology, Cernobbio/Italy, April 2010.

Asbach-Nitzsche A., Steinhäuser C., **Mücke K.**, Paulus C., Nevels M. Selective epigenetic targeting of replicating human cytomegalovirus genomes. International Herpesvirus Workshop, Calgary/Canada, August 2012.

Mücke K., Bernhardt K., Gerrer K., Hauer E.-M., Nitzsche A., Kieninger B., Kremer W., Kalbitzer HR., Paulus C., Nevels M. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein targets host chromosomes by docking to the acidic pocket on the nucleosomal surface. International Herpesvirus Workshop, Calgary/Canada, August 2012.

Vorträge bei Fachtagungen

Nitzsche A., Steinhäuser C., **Mücke K.**, Paulus C., Nevels M. Selective epigenetic targeting of replicating human cytomegalovirus genomes. Meeting of the German Society for Virology, Essen/Germany, March 2012.

Mücke K., Paulus C., Bernhardt K., Gerrer K., Hauer E.-H., Nitzsche A., Kieninger B., Kremer W., Kalbitzer HR., Nevels M. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein targets the acidic pocket on the nucleosomal surface. Meeting of the German Society for Virology, Essen/Germany, March 2012.

Asbach-Nitzsche A., Steinhäuser C., **Mücke K.**, Paulus C., Nevels M. Selective epigenetic targeting of replicating human cytomegalovirus genomes. International Herpesvirus Workshop, Calgary/Canada, August 2012.

Mücke K., Bernhardt K., Gerrer K., Hauer E.-M., Nitzsche A., Kieninger B., Kremer W., Kalbitzer HR., Paulus C., Nevels M. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein targets host chromosomes by docking to the acidic pocket on the nucleosomal surface. International Herpesvirus Workshop, Calgary/Canada, August 2012.

Artikel in Fachzeitschriften

Nitzsche, A., Steinhäusser, C., **Mücke, K.**, Paulus, C., Nevels, M. (2012). Histone H3 lysine 4 methylation marks postreplicative human cytomegalovirus chromatin. *J. Virol.* *86*, 9817–9827.

Zalckvar, E., Paulus, C., Tillo, D., Asbach-Nitzsche, A., Lubling, Y., Winterling, C., Strieder, N., **Mücke, K.**, Goodrum, F., Segal, E., Nevels M. (2013). Nucleosome maps of the human cytomegalovirus genome reveal a temporal switch in chromatin organization linked to a major IE protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 13126–13131.

Mücke, K.[☉], Paulus, C.[☉], Bernhardt, K., Gerrer, K., Schön, K., Fink, A., Sauer, E.-M., Asbach-Nitzsche, A., Harwardt, T., Kieninger, B., Kremer W., Kalbitzer HR., Nevels M. (2014). Human cytomegalovirus major immediate early 1 protein targets host chromosomes by docking to the acidic pocket on the nucleosome surface. *J. Virol.* *88*, 1228–1248. ☉ = contributed equally

4 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Christina Paulus und Herrn PD Dr. Michael Nevels für die hervorragende und engagierte Betreuung während der gesamten Dauer meiner Doktorarbeit. Eure Begeisterung für die Wissenschaft, eure ständige Bereitschaft zur Diskussion und eure wertvollen Anregungen sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank für eure unermüdliche Hilfsbereitschaft! Besonders möchte ich mich außerdem für den Ansporn, die Unterstützung und die (seelisch-moralischen) Aufmunterungen im Vorfeld der Tagungs- und Instituts-Vorträge bedanken, vor denen ich gehörigen Respekt hatte. Ohne euch hätte ich bestimmt gekniffen.

Bei Herrn PD Dr. Michael Nevels bedanke ich mich zudem für die Erstellung des Dissertationsgutachtens.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner für die bereitwillige Betreuung, das Interesse an meiner Arbeit und die Erstellung des Dissertationsgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf und Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner gilt mein Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer, Herrn Prof. Dr. Werner Kremer und Frau Bärbel Kieninger vom Lehrstuhl für Biophysik der Universität Regensburg danke ich vielmals für die Berechnung der Strukturmodelle und die engagierte, erfolgreiche Zusammenarbeit.

Frau Dr. Andrea Bleckmann vom Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie der Universität Regensburg danke ich vielmals für die Bereitstellung des Leica TCS SP8 Konfokal-Mikroskops, für die kompetente Einweisung und Hilfestellung.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Felicia Goodrum und Herrn Dr. Mahadevaiah Umashankar von der University of Arizona (USA) für die Infektionsexperimente in primären CD34⁺ HPCs.

Bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich herzlich für die große Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Alex und Resi, ihr wart super Laborgefährten! Danke für die Gaudi, die den Laboralltag versüßte, für eure fachliche und moralische Unterstützung und für eure Freundschaft.

Danke Christina für Dein stets offenes Ohr, Deine wertvollen Ratschläge und Dein Verständnis auch im Hinblick auf Labor-fremde Belange.

Vielen Dank Katrin Gerrer und Kathrin Schön für die super Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung im Rahmen eurer Bachelor- bzw. Master-Arbeit. Schön und lustig waren sie, unsere gemeinsamen Kaffeepausen und „Aperol Spritz-Abende“.

Auch bei allen anderen Kolleginnen und Kollegen am Institut möchte ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die schönen Aktivitäten außerhalb der Laborwände bedanken.

Von ganzem Herzen Danke ich meinen Freunden und meiner Familie, ganz besonders meiner Mama, für die unentwegte Unterstützung und das aufgebrachte Verständnis während des gesamten Studiums und der Promotion. Martin, herzlichen Dank für die IT-Unterstützung, Dein Zuhören, Deine aufmunternden Worte und Deine Fürsorge. Danke für einfach alles!