

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hartmut Hengel

Modulation der STAT3-Signaltransduktion durch das Cytomegalovirus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jassin Rashidi Alavijeh

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hartmut Hengel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

„Wir wissen nicht einmal ein millionstel Prozent der Dinge.“

Thomas Alva Edison

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

'Activated' STAT proteins – a paradoxical consequence of inhibited JAK-STAT signalling in cytomegalovirus-infected cells

Mirko Trilling, Vu Thuy Khanh Le, Jassin Rashidi-Alavijeh, Benjamin Katschinski, Jürgen Scheller, Stefan Rose-John, Gabriela Elena Androsiac, Stipan Jonjić, Valeria Poli, Klaus Pfeffer and Hartmut Hengel

Journal of Immunology, 2014, 192(1): 447-58

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	7
ABKÜRZUNGEN.....	8
ZUSAMMENFASSUNG.....	11
SUMMARY.....	12
1. EINLEITUNG.....	14
1.1. Herpesviren.....	14
1.2. Cytomegaloviren.....	15
1.2.1. Klinische Bedeutung des Cytomegalovirus	16
1.2.1.1. CMV-Infektion bei immunkompetenten Patienten	16
1.2.1.2. CMV-Infektion bei immunkompromittierten Patienten	17
1.2.1.3. CMV-Infektion in der Schwangerschaft	18
1.2.2. Therapie	19
1.3. Der Jak-STAT-Signalweg.....	20
1.3.1. Mechanismus und Regulation.....	21
1.3.2. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)	23
1.3.2.1. Embryonale Letalität STAT3-defizienter Mäuse	25
1.3.2.2. Unterscheidung zwischen STAT3 α und STAT3 β	26
1.3.2.3. Die Rolle von STAT3 in unterschiedlichen Krankheitsbildern	27
1.4. Zytokine als Modulatoren der immunologischen Antwort	28
1.4.1. Interleukin-6.....	28
1.4.1.1. IL-6-Signaltransduktion	29
1.4.1.2. IL-6 und CMV.....	30
1.4.2. Interleukin-10.....	31
1.4.2.1. IL-10-Signaltransduktion	32
1.4.2.2. IL-10 und CMV.....	33
1.4.3. Interferone.....	34
2. ERGEBNISSE.....	36
2.1. Modulation von STAT3 durch das murine Cytomegalovirus.....	36
2.1.1. Infektion mit MCMV reduziert die Gesamtmenge von STAT3	36

2.1.2.	Infektion mit MCMV induziert die Phosphorylierung von STAT3.....	37
2.1.3.	Die Modulation von STAT3 durch MCMV erfolgt zeitabhängig.....	40
2.1.4.	Modulation von STAT3 durch MCMV erfolgt dosisabhängig.....	41
2.1.5.	STAT3-Phosphorylierung und –Reduktion ist abhängig von viraler Genexpression.....	43
2.1.6.	Fötale Kälberserum steigert die Y705-Phosphorylierung von STAT3 nach MCMV- Infektion, ist für diese aber nicht essentiell.....	45
2.1.7.	Phosphorylierung von STAT3 betrifft beide Isoformen (STAT3 α und STAT3 β).....	48
2.1.8.	IL-6, IL-10 und Jak2 sind nicht essentiell für die Modulation von STAT3 durch MCMV .	51
2.1.9.	Die Modulation von STAT3 durch MCMV beschränkt sich auf infizierte Zellen	52
2.2.	Inhibition der STAT3-abhängigen Genexpression durch MCMV	55
2.2.1.	Nukleäre Translokation von STAT3 in der Immunfluoreszenzfärbung	55
2.2.2.	Nukleäre Translokation von STAT3 in fraktionierten Zelllysaten	59
2.2.3.	Inhibition der IL-6-induzierten Genexpression durch MCMV	60
2.3.	Replikation von MCMV in STAT3-defizienten Zellen	64
2.3.1.	Geringer Replikationsvorteil in der Zellkultur bei totaler STAT3-Defizienz.....	64
2.3.2.	Selektiver knock-out von STAT3 β führt zu einer Attenuierung der Replikation von MCMV	66
2.4.	Die Modulation von STAT3 durch das humane Cytomegalovirus.....	69
3.	DISKUSSION.....	72
3.1.	Die Infektion mit MCMV führt zu einer Reduktion der STAT3-Gesamtmenge und zu einer Y705-Phosphorylierung von STAT3	72
3.2.	Trotz scheinbarer STAT3-Aktivierung nach MCMV-Infektion wird keine Induktion von STAT3-Zielgenen beobachtet	73
3.3.	Aktuelles Modell der Modulation von STAT3 durch MCMV	74
3.3.1.	Möglicher Mechanismus einer MCMV-bedingten Inhibition der STAT3-Signaltransduktion	77
3.3.2.	Mögliche Ursache der MCMV-bedingten, Zytokin-unabhängigen Phosphorylierung von STAT3	79
3.4.	Potentielle evolutionäre Vorteile für MCMV durch die Inhibition der STAT3- abhängigen Signaltransduktion	80
3.4.1.	Bedeutung von SOCS3 für die Differenzierung zwischen der pro- und anti-inflammatori- schen Antwort durch IL-6 bzw. IL-10	80
3.4.2.	Negative Regulation der STAT1-abhängigen Typ I IFN-Antwort durch die Akkumulation von Y705-phosphoryliertem STAT3	82

3.4.3. Reduktion des STAT3-Gesamtgehalts führt zu einer Inhibition der pro-inflammatorischen Wirkung des nicht-phosphorylierten STAT3	83
3.5. Bedeutung von STAT3β für die Replikation von HCMV	83
3.6. Die Rolle von STAT3 nach Infektion mit HCMV	85
3.6.1. Infektion mit HCMV bewirkt im Infektionsverlauf eine Y705-Phosphorylierung von STAT3	85
3.6.2. Mögliche Mechanismen einer HCMV-induzierten STAT3-Phosphorylierung unter Berücksichtigung der proteasomalen Degradation von Jak1	86
3.6.3. Y705-Phosphorylierung von STAT3 als mögliche Ursache einer Assoziation von HCMV mit unterschiedlichen Karzinomen	88
4. MATERIAL UND METHODEN	90
4.1. Materialien	90
4.1.1. Geräte	90
4.1.2. Kits	91
4.1.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	91
4.1.4. Puffer und Lösungen	93
4.1.5. Zytokine	95
4.1.6. Antikörper	96
4.1.6.1. Ungekoppelte Antikörper	96
4.1.6.2. Gekoppelte Antikörper	96
4.1.7. Zellen	96
4.1.8. Viren	97
4.1.9. Computerprogramme	97
4.2. Methoden	98
4.2.1. Zellkultur	98
4.2.1.1. Cryokonservierung	98
4.2.1.2. Transwell-System	98
4.2.2. Virologische Methoden	99
4.2.2.1. Stock-Präparation	99
4.2.2.1. Titration	100
4.2.2.2. Infektion	100
4.2.2.3. Anfertigung von Wachstumskurven	100
4.2.2.4. Inaktivierung von Viren durch UV-Licht	101
4.2.3. Proteinbiochemische Methoden	101

4.2.3.1.	Herstellung von Proteinlysaten (Gesamtzell-Lysate).....	101
4.2.3.2.	Herstellung von Proteinlysaten (Fraktionierte native Lysate).....	101
4.2.3.3.	Bradford-Bestimmung.....	102
4.2.3.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	102
4.2.3.5.	Westernblot	103
4.2.3.6.	Immunfluoreszenzfärbung (IF)	104
REFERENZEN		105
ANHANG		124

Abbildungsverzeichnis

Einleitung:

- Abb. E1: Übersicht über humanpathogene Herpesviren, deren Zuordnung in die unterschiedlichen Subfamilien sowie beispielhafte Aufzählung einiger typischer Erkrankungen.
- Abb. E2: Schematische Darstellung des Jak-STAT-Signalwegs.

Ergebnisse:

- Abb. 1: Die Infektion mit MCMV reduziert die STAT3-Proteinmenge.
- Abb. 2: Die Infektion mit MCMV induziert die Phosphorylierung von STAT3.
- Abb. 3: MCMV-induzierte Reduktion der STAT3-Gesamtmenge erfolgt zeitabhängig.
- Abb. 4: Die Modulation von STAT3 durch MCMV ist dosisabhängig.
- Abb. 5: Die STAT3-Phosphorylierung und –Reduktion durch MCMV erfordert virale Genexpression.
- Abb. 6: Fötale Kälberserum steigert die Y705-Phosphorylierung von STAT3 nach MCMV-Infektion, ist für diese aber nicht essentiell.
- Abb. 7: Die Phosphorylierung von STAT3 betrifft beide Isoformen.
- Abb. 8: IL-6, IL-10 und Jak2 sind nicht essentiell für die Modulation von STAT3 durch MCMV.
- Abb. 9: Die Modulation von STAT3 durch MCMV beschränkt sich auf infizierte Zellen.
- Abb. 10: Keine Übertragung der MCMV-induzierten Y705-Phosphorylierung von STAT3 durch Mediumtransfer.
- Abb. 11: Immunfluoreszenzfärbung von STAT3 in MCMV-infizierten Zellen.
- Abb. 12: Nukleäre Translokation von STAT3 in der Immunfluoreszenz-färbung.
- Abb. 13: Phosphoryliertes STAT3 transloziert in den Zellkern.
- Abb. 14: MCMV inhibiert die IL-6-Signaltransduktion in einem „Pulse-Chase“-Experiment.
- Abb. 15: Inhibition der IL-6-induzierten Expression von SOCS3 durch MCMV.
- Abb. 16: Geringer Replikationsvorteil in der Zellkultur bei totaler STAT3-Defizienz.
- Abb. 17: Deutlich geringerer cytopathischer Effekt nach MCMV-Infektion von Zellen mit selektivem knock-out von STAT3 β .
- Abb. 18: Selektiver knock-out von STAT3 β führt zu einer Attenuierung der Replikation von MCMV.
- Abb. 19: Inhibition der IL-6- und IFN- γ -induzierten Phosphorylierung von STAT3 bzw. STAT1 durch HCMV in Abhängigkeit von der Infektionsdauer.

Diskussion:

- Abb. D1: Verhältnis zwischen der Menge an Y705-phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem STAT3.
- Abb. D2: Aktuelles Modell der Modulation von STAT3 durch MCMV.
- Abb. D3: SOCS3 reguliert den IL-6-Rezeptor, nicht aber den IL-10-Rezeptor.

Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
APRE	<i>acute phase response element</i>
APRF	<i>acute phase response factor</i>
ATCC	<i>american type culture collection</i> , amerikanische Stammsammlung
BSF-2	<i>B-cell stimulatory factor-2</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CID	<i>cytomegalic inclusion disease</i>
CPE	cytopathischer Effekt infizierter Zellen
d	<i>day(s)</i> , Tage
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2-Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	<i>early</i> , früh
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (+ Na ₂)
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Fc	<i>fragment, crystallizable</i> , kristallisierbares Fragment
FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
gX	virales Glykoprotein X, Nomenklatur mit Großbuchstaben (z.B. gB)
GAF	<i>(IFN) gamma activated factor</i> , IFN- γ -aktivierter Faktor
GAS	<i>(IFN) gamma activated sequence</i> , IFN- γ -aktivierte (Enhancer-)Sequenz
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
gpX	Glykoprotein mit X kDa (z.B. gp130)
h	<i>hour</i> , Stunde
HAT	Histon-Acetyltransferasen
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HEPES	<i>N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV	Herpes-simplex Virus
IE	<i>immediatly early</i> , sofort exprimiertes CMV-Gen
IFN	Interferon
IFNAR	IFN- α -Rezeptorkette
IFNGR	IFN- γ -Rezeptorkette
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	<i>interferon regulatory factor</i> , Interferon-regulatorischer Faktor
ISGF3	<i>interferon stimulated gene factor 3</i> , Interferon-stimulierter Gen Faktor 3

Abkürzungen

ISRE	<i>interferon stimulated response element</i> , Interferon-stimuliertes Enhancer-Element
IU/ml	<i>international units per ml</i> , internationale Einheiten
Jak	Januskinase
k	Kilo (1000)
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
L	<i>late</i> , spät
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LMP	<i>latent membrane protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli (1/10 ³)
μ	Mikro (1/10 ⁶)
M	Molarität, Teilchenmenge pro Volumen
MCMV	Mauscytomegalovirus
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i> , embryonaler Fibroblast der Maus
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätsfaktor
min	Minute
MMP	<i>matrix metalloprotease</i>
mock	“so tun, als ob”: uninfiziert, aber gleich behandelt
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>
n	nano (1/10 ⁹)
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
OSM	Oncostatin M
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAA	Phosphonoessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PIAS	<i>proteins that inhibit activated STATs</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFU	<i>plaque forming units</i> , Plaque-bildende Einheit
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMSF	<i>Phenylmethan-Sulfonylfouride</i>
ppX	Phosphoprotein mit X kDa (z.B. pp89)
PTP	<i>protein-tyrosine phosphatase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RSV	Respiratorisches-Synzitial-Virus
s	Sekunde
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfate
SH2	src-Homologiedomäne 2
SHP	<i>src homology region 2 domain-containing phosphatase</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
Sp1	<i>specificity protein 1</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBST	<i>tris buffered saline with tween</i>
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-like receptor</i>

Abkürzungen

TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)ammoniummethan
TRL/IRL	<i>terminal/internal repeat long</i> , duplizierte Genregionen von HCMV
Tyk	Tyrosinkinase
u.a.	unter anderem
U/ml	<i>units per ml</i> , Einheiten pro ml
UL	<i>unique long</i> , singuläre lange Genregion von HCMV
US	<i>unique short</i> , singuläre kurze Genregion von HCMV
U-STAT	unphosphoryliertes STAT
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	<i>volume per volume</i> , Verdünnungsverhältnis zweier Flüssigkeiten
w/v	<i>weight per volume</i> , Menge pro Volumen Verhältnis bei Lösungen
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Zusammenfassung

Cytomegaloviren sind ubiquitär-verbreitete, prototypische β -Herpesviren, die in immungesunden Individuen meist subklinische Infektionsverläufe zeigen, unter immun-kompromittierenden Bedingungen jedoch aus der Latenz reaktivieren können, um symptomatische und teilweise fatale Infektionsverläufe zu initiieren. Das humane Cytomegalovirus (HCMV) wird häufig über eine intrauterine Infektion vertikal von der Mutter auf den Fötus transmittiert; eine solche kongenitale Infektion kann schwerwiegende Schäden für den Fötus verursachen. Wegen seiner ausgeprägten Wirtsspezifität kann HCMV leider nicht sinnvoll im Kleintiermodell untersucht werden. Diese Lücke wird durch den Einsatz des taxonomisch eng verwandten Mauscytomegalovirus (MCMV) geschlossen.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass Cytomegaloviren den Jak-STAT-Signalweg modulieren und antagonisieren, insbesondere durch Interaktion mit *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) und STAT2. Auf der anderen Seite zeigen publizierte Befunde jedoch, dass die Infektion mit CMV die Sekretion von löslichen, STAT3-aktivierenden Faktoren induziert. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Interaktion zwischen Cytomegaloviren und STAT3 zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit MCMV zu einer nachhaltigen Reduktion der STAT3-Proteingehaltmenge führt. Diese Reduktion erfolgte zeitabhängig. Interessanterweise wurde trotz des reduzierten STAT3-Gesamtgehalts eine verstärkte Y705-Phosphorylierung von STAT3 beobachtet, die normalerweise notwendig und indikativ für eine STAT3-Aktivierung ist. Beide Effekte (Phosphorylierung und Reduktion) waren von der Infektionsdosis und von viraler Genexpression abhängig und in unterschiedlichen Zelllinien nachweisbar. Durch Transwell-Experimente konnte ausgeschlossen werden, dass lösliche Faktoren (z.B. Zytokine) für die Auslösung der beobachteten Effekte ausreichend sind und mit Hilfe entsprechender defizienter Zellen konnte die Unabhängigkeit beider Effekte von IL-6, IL-10 und Jak2 bewiesen werden. Durch Zelllinien, die nur eine der beiden STAT3-Spleiß-Isoformen STAT3 α oder STAT3 β exprimieren, konnten die Befunde auf beide Isoformen ausgeweitet werden. Zudem konnte durch die Anfertigung fraktionierter Lysate nachgewiesen werden, dass das nach MCMV-Infektion vorzufindende, phosphorylierte STAT3 in den Zellkern transloziert.

Obwohl STAT3 nach MCMV-Infektion also phosphoryliert und dementsprechend scheinbar aktiviert vorliegt und auch im Nukleus nachweisbar ist, kommt es interessanterweise nicht zu einer Induktion von Zielgenen wie SOCS3. Selbst die exogene Stimulation dieser Zielgene mit IL-6 kann eine solche Genexpression in MCMV-infizierten Zellen nicht induzieren.

Diese Befunde lassen sich zu folgendem Modell verbinden: MCMV unterbindet – über ein noch unbekanntes Genprodukt – die STAT3-abhängige Genexpression nach erfolgter Phosphorylierung und Translokation in den Nukleus. Diese Blockade verhindert die Induktion der negativen Rückkopplung (z.B. durch Gene wie SOCS3) und führt so zu einer Akkumulation von phosphoryliertem STAT3. Da STAT3 selbst auch ein bekanntes STAT3-Zielgen darstellt, führt diese Blockade außerdem zu einer verminderten STAT3-Gesamtmenge. Durch die MCMV-kodierte Immunevasion kommt es also dazu, dass die Phosphorylierung von einem Kennzeichen für STAT-Aktivierung zu einem Indikator für die virale Inhibition der JAK-STAT-Signaltransduktion wird.

Zusätzlich wurde überprüft, inwieweit sich die für MCMV erhobenen Befunde auf HCMV übertragen lassen. Hierbei wurde gezeigt, dass HCMV spätestens 48 h nach Infektion die Hyper-IL-6- und IFN- γ -bedingte Phosphorylierung von STAT3 bzw. STAT1 inhibiert, während der Gesamtgehalt an STAT3 und STAT1 konstant blieb. Außerdem konnte im Infektionsverlauf eine konstitutive STAT3-Phosphorylierung beobachtet werden.

Summary

Cytomegaloviruses constitute ubiquitously-distributed, prototypic β -herpesviruses, which cause mostly subclinical infections in immunocompetent individuals, but are able to reactivate from latency under immunocompromised conditions and can cause severe and even fatal infections in some cases. The human cytomegalovirus (HCMV) is often transmitted vertically from the mother to the foetus by placental infection; congenital infection can cause severe symptoms in the foetus, i.e. sensorineural hearing loss. Since HCMV is characterized by a high species-specificity, it cannot be used for *in vivo* analysis in small animal models. This gap can be closed by studying the taxonomically related mouse cytomegalovirus (MCMV).

Preliminary work of this working group could show that cytomegaloviruses modulate and antagonize the Jak-STAT-pathway, especially by interacting with *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) and STAT2. But on the other hand, it was shown by published data that CMV-infection induces the secretion of soluble, STAT3-activating factors. The aim of this work was to investigate the interaction between cytomegaloviruses and STAT3.

It could be shown that MCMV infection leads to a selective reduction of overall amounts of STAT3. The decline of STAT3 was time-dependent. Seemingly contradictory, a pronounced increase of Y705-phosphorylated STAT3 was synchronously observed. The Y705-phosphorylation of STAT3 normally indicates the activation of this mediator. Both effects (phosphorylation and reduction) were dependent on the infectious dose, required viral gene expression and occurred in different cell-types. Transwell-experiments excluded a soluble factor being sufficient for STAT3 phosphorylation. With the aid of cell-lines deficient in IL-6, IL-10 or Jak2 it could be shown that both events occur irrespective of these molecules. Taking advantage of cell-lines lacking individual STAT3-splice-isoforms it could be proven that both STAT3 α and STAT3 β are targets of Y705-phosphorylation by MCMV. Additionally, fractional lysates demonstrated that the phosphorylated STAT3 found in MCMV-infected cells translocates into the nucleus.

These findings indicate a substantial shift in the ratio between phosphorylated to non-phosphorylated STAT3, reminiscent of STAT3 activation. Remarkably, although STAT3 became Y705-phosphorylated and translocated into the nucleus in MCMV-infected cells, it did not translate into induction of STAT3 target genes like IRF-1 and SOCS3. Conversely, even IL-6 induced activation of STAT3-dependent gene expression was abolished in MCMV-infected cells.

Together these findings lead to a model in which MCMV blocks – through a gene product which is yet to be found – the STAT3-dependent gene expression after phosphorylation and translocation into the nucleus. This inhibition abrogates the induction of the negative feedback loop (i.e. through genes like SOCS3), thereby accumulating phosphorylated STAT3. Since STAT3 itself is a known target gene of STAT3-signaling, the inhibition also reduces the overall amounts of STAT3. Thus, the MCMV-encoded immune evasion shifts the STAT3-phosphorylation from a hallmark of activation to an indicator of viral inhibition of the Jak-STAT-pathway.

Additionally, it was tested in which extent the data compiled for MCMV could be transferred to HCMV. Here it could be shown that HCMV inhibits the Hyper-IL-6- and IFN- γ -mediated phosphorylation of STAT3 resp. STAT1 at the latest from 48 h post infection. The whole amount of STAT3 and STAT1 was not affected. Besides, a constitutive, cytokine-independent phosphorylation of STAT3 could be observed in the later course of infection.

1. Einleitung

1.1. Herpesviren

Die Herpesviren stellen eine Gruppe von mehr als hundert behüllten DNA-Viren dar, von denen acht humanpathogen sind. Wegen ihrer ausgeprägten Wirtsspezifität kommt es – bis auf wenige Ausnahmen – nicht zu einer Infektion des Menschen mit Viren von einer jeweils anderen Wirtsspezies. Die Herpesviren werden bezüglich ihrer genetischen Homologie, ihrer Replikationseigenschaften sowie ihres Zelltropismus, in drei verschiedene Subfamilien eingeteilt: α -, β - und γ -Herpesviren (s. Abb. E1).

Allgemeine Bezeichnung	Systematische Bezeichnung	Abkürzung	Subfamilie	Typische Erkrankungen (z.B.)
Herpes-simplex-Virus 1	Humanes Herpesvirus 1	HSV-1, HHV-1	α	Herpes labialis
Herpes-simplex-Virus 2	Humanes Herpesvirus 2	HSV-2, HHV,2	α	Herpes genitalis
Varizella-Zoster-Virus	Humanes Herpesvirus 3	VZV, HHV-3	α	Varizellen („Windpocken“), Herpes zoster („Gürtelrose“)
Epstein-Barr-Virus	Humanes Herpesvirus 4	EBV, HHV-4	γ	Infektiöse Mononukleose („Pfeiffer’sches Drüsenfieber“)
Cytomegalovirus	Humanes Herpesvirus 5	CMV, HHV-5	β	Pneumonie, Retinitis, Kolitis
Humanes Herpesvirus 6	Humanes Herpesvirus 6	HHV-6	β	Exanthema subitum („Dreitagefieber“)
Humanes Herpesvirus 7	Humanes Herpesvirus 7	HHV-7	β	unklar
Humanes Herpesvirus 8	Humanes Herpesvirus 7	HHV-8	γ	Kaposi-Sarkom

Abb. E1: Übersicht über humanpathogene Herpesviren, deren Zuordnung in die unterschiedlichen Subfamilien sowie beispielhafte Aufzählung einiger typischer Erkrankungen.

Herpesviren bilden relativ große Virionen (ca. 130-250 nm). Sie besitzen ein relativ großes, doppelsträngiges und nicht-segmentiertes DNA-Genom (ca. 125-240 kbp). Die DNA liegt extrazellulär in linearer Form vor, wird aber nach Infektion in eine zirkuläre Form überführt, die dann als Episom in der Zelle vorzufinden ist (McVoy und Adler, 1994; Mocarski Jr, 2007). Das Genom befindet sich in einem ikosaedrischem Kapsid. Das Kapsid ist seinerseits von einer Lipid-Doppelmembran umschlossen; diese stammt von der ehemaligen Wirtszelle ab, beinhaltet aber auch virale Glykoproteine, die für die Bindung des Virions an die

Einleitung

Zelloberfläche und somit für die Infektion von entscheidender Bedeutung sind. Zu diesen zählen beispielsweise die Glykoproteine B (gB) und H (gH), die unter den Herpesviren hochgradig konserviert sind (Pereira, 1994; Chowdary et al., 2010). Zwischen dem Kapsid und der Lipid-Doppelmembran befindet sich eine als Tegument bezeichnete Proteinmatrix, die u.a. für die Replikation benötigte (Phospho-)Proteine beinhaltet (Davison, 2007).

Charakteristisch für Herpesviren ist, dass sie nach der Primärinfektion lebenslang im infizierten Wirt persistieren. Der primäre Infekt wird durch das Immunsystem kontrolliert, sodass schließlich ein Zustand der Latenz erreicht wird, indem das Virusgenom in spezifischen Wirtszellen persistiert. Die Persistenz der viralen DNA erfolgt meist in episomaler Form, doch ist für bestimmte Herpesviren auch beschrieben, dass sie ihre DNA in das Wirtsgenom integrieren können (Kaufer et al., 2011). Im Stadium der Latenz werden weiterhin einige spezifische, virus-kodierte Transkripte exprimiert (z.B. virales IL-10 (Jenkins et al., 2008a) oder das cytomegalovirale Protein UL138 (Le et al., 2011)), ohne dass es zur Ausbildung infektiöser Partikel kommt. In bestimmten Situationen – beispielsweise Immunsuppression, Stress oder unter hormonellem Einfluss – kann es dann zu einer Reaktivierung kommen, indem das Virus wieder produktiv repliziert; dieses Stadium kann in Abhängigkeit vom Immunstatus des Patienten subklinisch verlaufen oder aber bei immun-komprimierten Patienten eine schwerwiegende klinische Erkrankung hervorrufen (Baichwal und Sugden, 1988; Garcia-Blanco und Cullen, 1991).

1.2. Cytomegaloviren

Die Zeichen der Cytomegalovirus-Infektion wurden erstmalig 1881 durch den Pathologen Hugo Ribbert beschrieben (Ho, 2008). Da der Erreger in der Folge vermehrt in Speicheldrüsen nachgewiesen werden konnte, wurde er als „Speicheldrüsenvirus“ bezeichnet (Rowe et al., 1956; Smith, 1956; Ho, 2008). Aufgrund des durch dieses Virus hervorgerufenen, charakteristischen cytopathischen Effekts mit Zellvergrößerung und dem Auftreten von Einschlusskörperchen kam es im Jahre 1960 zu der Bezeichnung des *cytomegalic inclusion disease* (CID) (Weller et al., 1960), aus dem sich die Namensgebung des Cytomegalovirus ableitete.

Bei dem Cytomegalovirus handelt es sich um ein prototypisches β -Herpesvirus. Es besitzt ein großes, doppelsträngiges DNA-Genom mit ca. 230 kbp und mehr als 200 offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORF). Das Genom des humanen Cytomegalovirus besteht aus einem

langen (*long*, *L*) und einem kurzen (*short*, *S*) Segment, wobei beide Abschnitte je ein einmaliges Segment (*unique*, U_L bzw. U_S) besitzen, die von repetitiven Genomsequenzen flankiert werden; dabei werden die internen Sequenzen als *internal repeats* (IR_L bzw. IR_S) und die endständigen als *terminal repeats* (TR_L bzw. TR_S) bezeichnet (Tamashiro et al., 1984; Davison et al., 2003).

Die virale Genexpression erfolgt strikt koordiniert, sodass die viralen Gene in drei Gruppen eingeteilt werden können: Sofort exprimierte (*immediate early*, *IE*), früh exprimierte (*early*) und spät exprimierte (*late*) Gene (Wathen und Stinski, 1982).

Als Herpesvirus ist das Cytomegalovirus durch eine extreme Speziesspezifität gekennzeichnet, sodass jede Spezies *in vivo* nur durch ihr „eigenes“ CMV produktiv infiziert werden kann (Kim und Carp, 1971; Shenk und Stinski, 2008). Daraus ergibt sich die Problematik, dass das humane Cytomegalovirus (HCMV) *in vivo* nicht in einem Tiermodell untersucht werden kann. Aus diesem Grund hat das Mauscytomegalovirus (MCMV) für die experimentelle Forschung einen hohen Stellenwert: Dieser CMV-Vertreter weist vergleichbare Pathogenitätsmechanismen, ein kolineares Genom und viele homologe Proteine mit HCMV auf, sodass die Infektion von Labormäusen mit MCMV ein geeignetes Tiermodell für die Erforschung von HCMV darstellt (Krpmotic et al., 2003). Trotzdem ist der Vergleich von über MCMV erworbenen Kenntnissen mit HCMV wegen der klinischen Relevanz dieses Virus von essentieller Bedeutung.

1.2.1. Klinische Bedeutung des Cytomegalovirus

Die Seroprävalenz der CMV-Infektion hängt von sozioökonomischen Faktoren und der ethnischen Herkunft ab, wobei sich der Anteil der Infizierten umgekehrt proportional zu dem sozioökonomischen Status verhält (Staras et al., 2006; Enders et al., 2012). Für Deutschland ermittelten Hecker und Mitarbeiter (Hecker et al., 2004) eine Seroprävalenzrate von 45,8%, in Entwicklungsländern werden bei Erwachsenen Werte bis zu 100% erreicht.

1.2.1.1. CMV-Infektion bei immunkompetenten Patienten

Die Übertragung von CMV erfolgt über nahezu alle Körpersekrete, vorzugsweise über Speichel, Cervixsekret und Samenflüssigkeit, aber auch über Blutprodukte und Urin. Eine

Einleitung

wichtige Infektionsquelle stellt auch die Muttermilch dar, da viele Mütter in der Stillzeit reaktivieren und die Neugeborenen in diesem Zeitraum infizieren. Klinisch bedeutsam ist v.a. die transplazentare Infektion des Embryos bzw. Feten in der Schwangerschaft, da diese schwerwiegende Folgen für das Kind haben kann (s.u.).

Die Primärinfektion erfolgt bei immunkompetenten Patienten zumeist asymptomatisch. In den Fällen, in denen die Infektion symptomatisch verläuft, kommt es nach einer Inkubationszeit von vier bis acht Wochen zu einem mit der Mononukleose vergleichbaren Erkrankungsbild, typischerweise mit Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen, Lymphknotenschwellung, Splenomegalie und einer mit Transaminasenanstieg einhergehendem Hepatitis; seltener sind auch Thrombozytopenien und hämolytische Anämien zu beobachten (Pomeroy und Englund, 1987; Just-Nubling et al., 2003). Normalerweise verläuft die Krankheit bei immunkompetenten selbstheilend, sodass keine antiviralen Medikamente verabreicht werden müssen. In Einzelfällen wurden aber auch bei scheinbar immunkompetenten Patienten lebensbedrohliche Verläufe beschrieben (Rafailidis et al., 2008).

In Folge der Primärinfektion tritt – wie bei allen Herpesviren – das Stadium der Latenz ein; das Virus persistiert lebenslang im menschlichen Organismus, sodass eine sterile Immunität nie erreicht werden kann. Alternierend kommt es bei Stress oder Immunsuppression zu Phasen intermittierender Reaktivierung, in denen das Virus ausgeschieden wird und die betroffene Person dementsprechend wieder infektiös ist. Bei Immunkompetenz verläuft die Reaktivierung zumeist asymptomatisch. Bei immunsupprimierten Patienten hingegen kann die Reaktivierung schwerwiegende Erkrankungen auslösen (s.u.).

1.2.1.2. CMV-Infektion bei immunkompromittierten Patienten

Im Gegensatz zu der meist asymptomatischen Reaktivierung bei immunkompetenten Personen führt die CMV-Reaktivierung bei immunkompromittierten Patienten häufig zum Auftreten lebensbedrohlicher Krankheitsbilder, die trotz Behandlung für eine hohe Rate an Todesfällen verantwortlich sind (Pomeroy und Englund, 1987).

Zu diesen Patienten zählen HIV-Patienten im Stadium AIDS, bei denen die CMV-Reaktivierung schwerwiegende Infektionen verursachen kann. Typisch für dieses Patientenkollektiv ist die CMV-Retinitis mit nachfolgendem Visusverlust, die auch zu den AIDS-definierenden Erkrankungen zählt (Pertel et al., 1992; Thomson et al., 1998). Die Reakti-

vierung kann aber auch weitere Organsysteme betreffen und beispielsweise eine Pneumonie, Hepatitis oder Kolitis hervorrufen (Pomeroy und Englund, 1987).

Auch eine iatrogene Immunsuppression kann zum Auftreten von gravierenden CMV-Infektionen führen. Dies trifft v.a. bei Patienten mit Organtransplantation zu: Während es bei seropositiven Empfängern eines Organtransplantats typischerweise zu einer CMV-Reaktivierung kommt, ist bei seronegativen Empfängern eines Organs von einem seropositiven Spender häufig eine Primärinfektion zu beobachten. Im weiteren Verlauf kann es zum Auftreten einer Transplantationsvaskulitis mit Abstoßungsreaktion kommen (Evans et al., 2000); typisch sind auch Hepatitiden und lebensbedrohliche interstitielle CMV-Pneumonien (Forman und Zaia, 1994).

Außerdem ist bekannt, dass die iatrogene Immunsuppression mit Kortikosteroiden schwere Krankheitsverläufe hervorrufen und z.B. Pneumonien und Ösophagitiden auslösen kann (Wiest et al., 1989; Weile et al., 2009). Auch unter einer Therapie mit monoklonalen anti-TNF- α Antikörpern (Mizuta und Schuster, 2005; Sari et al., 2008) und dem monoklonalen anti-CD20 Antikörper Rituximab (Hasegawa et al., 2009; Vallet et al., 2011) wurden schwerwiegende CMV-Infektionen beobachtet

1.2.1.3. CMV-Infektion in der Schwangerschaft

Das Cytomegalovirus kann prä- und perinatale Infektionen verursachen; dabei stellt die CMV-Infektion die häufigste angeborene Virusinfektion dar. Es wird davon ausgegangen, dass etwa 0,2% - 2,2 % aller Neugeborenen von einer kongenitalen CMV-Infektion betroffen sind (Stagno et al., 1986).

Die pränatale CMV-Infektion kann einerseits durch eine Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft verursacht werden, andererseits aber auch durch die Reaktivierung einer latenten Infektion oder durch eine Superinfektion mit einem neuen Virusstamm. Dabei wurde ursprünglich davon ausgegangen, dass die beobachteten kongenitalen CMV-Infektionen nahezu ausschließlich auf Primärinfektionen der Mutter zurückzuführen sind und es im Falle einer Reaktivierung nur selten zu symptomatischen Infektionen kommt, da der Fetus durch die diaplazentar übertragenen, mütterlichen Antikörper geschützt sein sollte (Stagno et al., 1982; Fowler et al., 1992). Diese Auffassung wurde in den letzten Jahren allerdings weitgehend revidiert, sodass davon auszugehen ist, dass ein deutlich größerer Anteil der sympto-

matischen kongenitalen CMV-Infektionen auf rezurrenente Infektionen seropositiver Mutter zurückzuführen ist, als bisher angenommen (Boppana et al., 1999; Ross et al., 2006).

Die pränatale CMV-Infektion kann sehr unterschiedlich verlaufen, wobei der Schweregrad der Symptomatik u.a. von dem Zeitpunkt der Infektion abhängt; die gravierendsten Folgen können durch eine Infektion im ersten Trimenon verursacht werden, da die Organogenese in diesem Stadium noch nicht abgeschlossen ist (Ludwig und Hengel, 2009). Typische kongenitale Manifestationen sind Hepatosplenomegalie, Ikterus, Pneumonie und Thrombozytopenie mit hämorrhagischer Diathese; teilweise kann eine solche Infektion auch zum Spontanabort führen. Häufig ist auch eine Beteiligung des zentralnervösen Systems (ZNS) beispielsweise in Form von Hörverlust, geistiger Retardierung, zerebraler Verkalkungen und Sehstörungen (Boppana et al., 1992; Ludwig und Hengel, 2009). Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die CMV-Infektion in den meisten Fällen asymptomatisch verläuft; etwa 10% - 15% der Neugeborenen zeigen Symptome. Von den bei Geburt asymptomatischen Neugeborenen entwickeln wiederum etwa 5% - 15% im Verlauf zentralnervöse Symptome, zumeist im Sinne eines Hörverlusts (Reynolds et al., 1974; Hanshaw et al., 1976; Stagno et al., 1986; Ross et al., 2006).

1.2.2. Therapie

Es existieren nur wenige Medikamente, die für eine therapeutische Intervention bei einer CMV-Infektion zugelassen sind. Zudem sind diese Medikamente meist durch starke Nebenwirkungen gekennzeichnet. Das einzige CMV-wirksame Virostatikum, das relativ gut verträglich ist, ist Aciclovir (Zovirax®); dieses wird allerdings wegen seiner geringen Wirksamkeit nur noch selten bei CMV-Infektion eingesetzt. Aciclovir wird hauptsächlich gegen Infektionen mit dem Herpes-simplex Virus verwendet.

Das am häufigsten bei CMV-Infektionen eingesetzte Medikament ist Ganciclovir (Cymeven®). Ganciclovir stellt ein *Prodrug* dar: Durch die CMV-spezifische Kinase pUL97 entsteht Ganciclovir-5'-Monophosphat, aus dem wiederum durch zelluläre Kinasen das aktive Ganciclovirtriphosphat entsteht. Diese Substanz kompetitiert mit Deoxyguanosintriphosphat (GTP) um den Einbau durch die virale DNA-Polymerase pUL54, wodurch diese gehemmt und ein Kettenabbruch herbeigeführt wird. Dabei kann es durch langfristige Verwendung dieses Medikaments zu der Ausbildung von Mutationen in der Kinase pUL97 und der DNA-Polymerase pUL54 kommen, was zu der Entstehung von Resistenzen führen kann (Chou,

Einleitung

2001). Zu beachten ist bei der Gabe von Ganciclovir v.a. die Myelotoxizität mit häufig auftretender reversibler Neutropenie (Crumpacker, 1996).

Als Reservemedikament kann Foscarnet (Foscavir®) verwendet werden. Dieses Virostatikum hemmt die DNA-Polymerase nichtkompetitiv und unabhängig von viralen Kinasen, somit kann es auch bei einer bestehenden UL97-Mutation eingesetzt werden. Allerdings besteht auch hier die Möglichkeit, dass nach langfristiger Foscarnet-Therapie durch UL54-Mutationen Resistenzen entstehen. Foscarnet wirkt weniger myelotoxisch als Ganciclovir, zeigt stattdessen aber eine deutlich stärkere Nephrotoxizität (Wagstaff und Bryson, 1994).

Eine Alternative zu den genannten Virostatika ist Cidofovir (Vistide®) (Berenguer und Mallolas, 2000), ein stark wirksames Nukleotidmonophosphat, das über zelluläre Kinasen zu einem Nukleotidtriphosphat phosphoryliert wird und in der Folge die virale DNA-Polymerase pUL54 kompetitiv inhibiert. Auch hier kann eine langfristige Nutzung zu der Ausbildung von Resistenzen führen. Cidofovir zeigt eine starke Nephrotoxizität (Lalezari et al., 1997).

Eine Sonderrolle in der CMV-Therapie nehmen CMV-Hyperimmunglobuline (Cytotect®) ein. Diese wurden im Rahmen von klinischen Studien bei Verdacht auf eine frische Infektion in der Frühschwangerschaft verabreicht und sollen den Übergang des Virus auf den Fetus verhindern (Nigro et al., 2005; Nigro et al., 2012). Auch wenn die Ergebnisse dieser Studien kontrovers diskutiert werden (Duff, 2005; Revello, 2005), könnte es sich bei Cytotect® um eine vielversprechende Substanz zur Prävention einer kongenitalen CMV-Infektion handeln. Cytotect® wird teilweise auch für die passive Immunisierung bei Transplantationspatienten eingesetzt (Solidoro et al., 2011).

1.3. Der Jak-STAT-Signalweg

Der Jak-STAT-Signalweg wird von vielen unterschiedlichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren für die Signaltransduktion verwendet; es handelt sich um einen Mechanismus, um die extrazelluläre Konzentration eines Liganden (typischerweise eines Zytokins) zu perzipieren und in eine adäquate Reaktion in Form einer veränderten Genexpression zu übertragen (Darnell et al., 1994). Es handelt sich dabei um einen phylogenetisch sehr alten Mechanismus, der beispielsweise auch in *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden kann (Liongue et al., 2012).

1.3.1. Mechanismus und Regulation

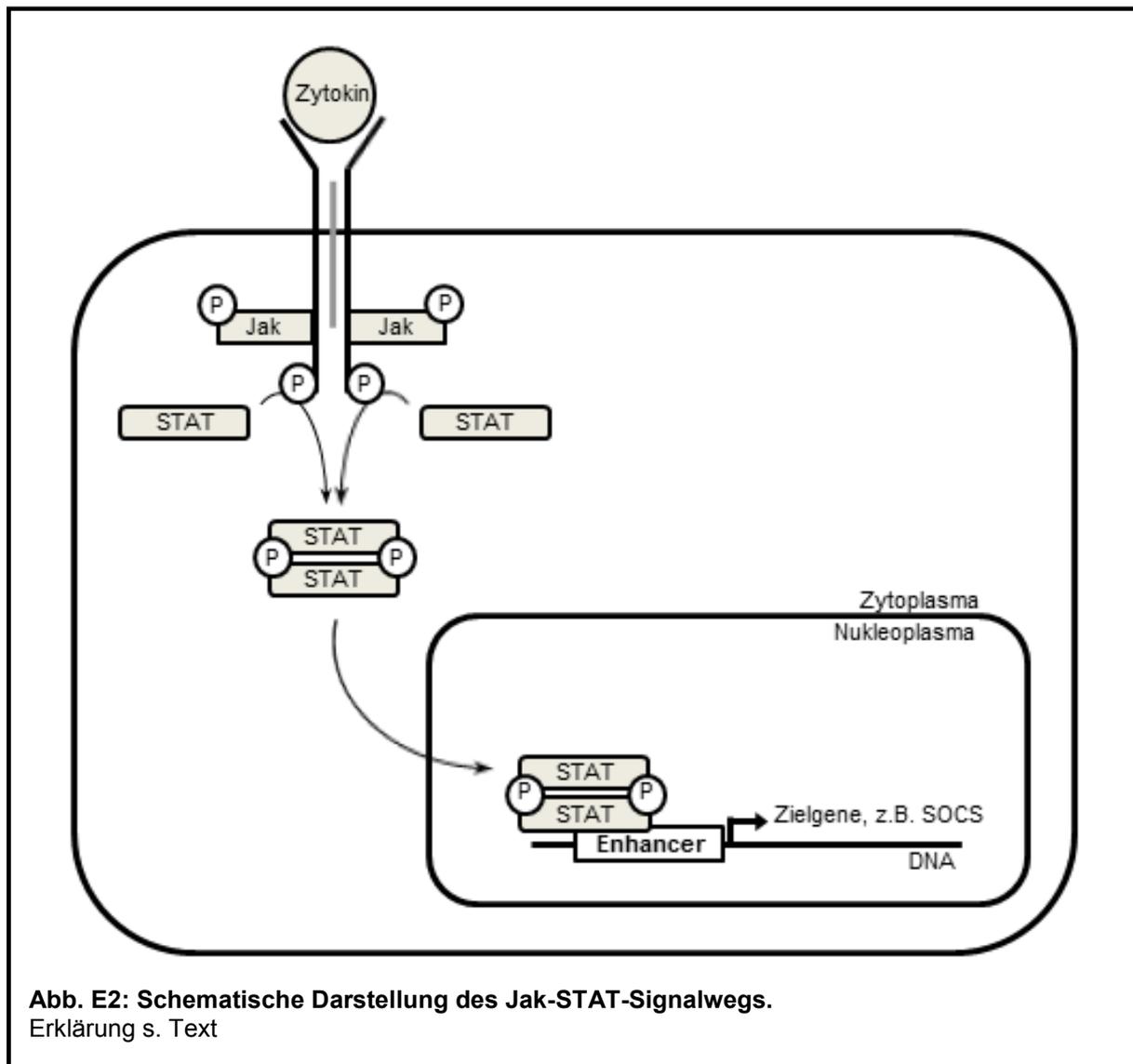
Die Bindung des Liganden an den entsprechenden Transmembranrezeptor führt dazu, dass die mit dem Rezeptor prä-assoziierten Januskinasen (Jak) die Phosphorylierung des jeweils anderen Jak (Transphosphorylierung; (Harrison, 2012)) sowie des Tyrosinrests der Rezeptoren induzieren. Dies führt zu einer Rekrutierung von *signal transducer and activator of transcription* (STAT-) Proteinen, die – wie der Name schon sagt – eine duale Rolle ausführen: Einerseits transduzieren sie das am Rezeptor empfangene Signal in den Zellkern, andererseits aktivieren sie die Transkription bestimmter Zielgene. Durch die Phosphorylierung eines Tyrosinrests werden die STAT-Proteine aktiviert. Das phosphorylierte Tyrosin der STAT-Proteine interagiert mit der reziproken src-Homologiedomäne 2 (SH2) eines zweiten STAT-Proteins, wodurch es zur Bildung von Homo- oder Heterodimeren kommt. Diese translozieren in den Nukleus und binden an die Enhancer der entsprechenden Zytokin-responsiven Gene. Durch die *coiled-coiled* Domäne des STAT-Dimers werden die unterschiedlichen Komponenten des Transkriptionskomplexes rekrutiert und nachfolgend die Transkription der entsprechenden Zielgene induziert (Aaronson und Horvath, 2002; Murray, 2007). Eine schematische Übersicht über den Jak-STAT-Signalweg wird in Abbildung E1 dargestellt.

Bei der Beschreibung der Jak-STAT-Signaltransduktion gilt es allerdings zu berücksichtigen, dass es sich hierbei um die kanonische Version dieses Signalwegs handelt, der einige Vereinfachungen aufweist. Zu diesen zählt, dass die STAT-Proteine in unphosphoryliertem Zustand als Monomere dargestellt werden, die erst in Folge der Phosphorylierung dimerisieren. In den letzten Jahren verdichten sich aber deutliche Hinweise, dass die STAT-Proteine auch ohne Tyrosin-Phosphorylierung schon als Homodimere im Zytoplasma vorliegen. Demnach induziert die Phosphorylierung der Tyrosinreste nicht eine Dimerisierung der STAT-Proteine, sondern induziert eine Konformationsveränderung, die mit einer Aktivierung einhergeht (Braunstein et al., 2003; Mertens et al., 2006; Mohr et al., 2012).

Mammalier haben jeweils vier verschiedene Jak-Proteine (Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2) sowie sieben unterschiedliche STAT-Gene (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6), wobei in dieser Arbeit STAT3 von besonderem Interesse ist. Zusätzlich existieren von einigen STATs unterschiedliche Spleiß-Isoformen, wie z.B. die STAT3-Isoformen STAT3 α und STAT3 β (s.u.). Durch diese Diversität wird bewerkstelligt, dass die Zellreaktion bzw. das induzierte Genexpressionsprofil je nach Ligand und Zelltyp variieren kann. Zudem wird der Jak-STAT-Signalweg durch viele weitere Faktoren beeinflusst. Beispielsweise führt die Phosphorylierung der Serin-Phosphorylierungsstelle der STAT-

Einleitung

Proteine, die u.a. durch MAP-Kinasen bewerkstelligt wird, zu einer Aktivierung der Transaktivierungsdomäne und somit meist zu einer Verstärkung der Veränderung des Genexpressionsprofils (Decker und Kovarik, 2000). Die STAT-induzierte Transkription hängt zusätzlich von vielen weiteren Co-Faktoren ab, die mit den STAT-Proteinen interagieren und somit ihre Aktivität beeinflussen, wie z.B. Nmi, p300/CBP und Sp1 (Shuai, 2000).

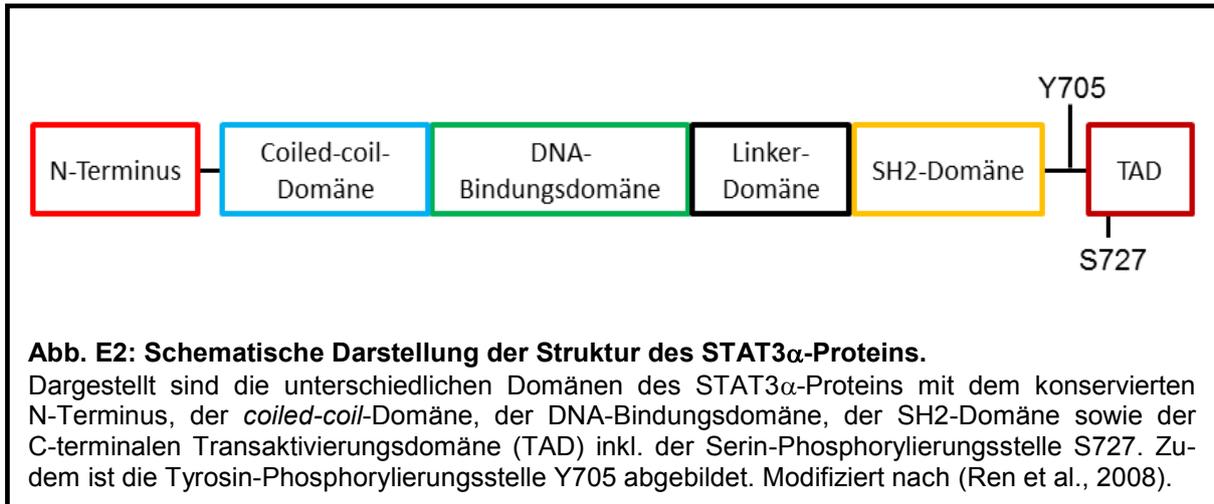


Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivität der Jak-STAT-Signaltransduktion spielen die negativen Regulatoren dieses Signalwegs. Zu diesen zählen beispielsweise die zytoplasmatischen Tyrosin-Phosphatasen SHP1, SHP2 und PTP1B, die den Jak-STAT-Signalweg durch Dephosphorylierung inhibieren können (You et al., 1999), oder aber auch die Proteine der PIAS-Familie (*proteins that inhibit activated STATs*), welche u.a. an aktivierte STAT-Dimere binden und so deren DNA-Bindungsaktivität inhibieren (Chung et

al., 1997; Greenhalgh und Hilton, 2001). Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist die Familie der SOCS-Proteine (*suppressors of cytokine signaling*): Im Gegensatz zu den PIAS-Proteinen, die konstitutiv exprimiert werden, werden die Proteine der SOCS-Familie nur kurzfristig nach Stimulation durch das entsprechende Zytokin exprimiert, sodass die negative Regulation durch SOCS-Proteine den Mechanismus einer klassischen negativen Rückkopplung darstellen. Es ist bekannt, dass SOCS-Proteine die Phosphorylierung bzw. Aktivierung der STAT-Proteine durch unterschiedliche Mechanismen inhibieren; beispielsweise können SOCS-Proteine ihre Wirkung durch Blockierung der Tyrosinreste der Zytokinrezeptoren oder aber durch direkte Bindung an Jak-Proteine entfalten (Kile und Alexander, 2001). Bei diesen Prozessen spielt die SH2-Domäne der SOCS-Proteine eine entscheidende Rolle (Levy und Darnell, 2002).

1.3.2. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)

STAT3 wurde zuerst als Mediator der IL-6-Signaltransduktion beschrieben und wegen der Rolle von IL-6 in der Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion anfangs als *acute phase response factor* (APRF) bezeichnet (Akira et al., 1994; Lutticken et al., 1994; Zhong et al., 1994). Strukturell besteht es u.a. aus einem konserviertem N-Terminus, einer C-terminalen Transaktivationsdomäne inkl. der Serin-Phosphorylierungsstelle S727, der für die Rekrutierung an den Rezeptor und Dimerisierung zuständigen SH2-Domäne und der DNA-Bindungsdomäne, die eine starke Ähnlichkeit mit dem GAS-Bindungs-Element von STAT1 hat (Levy und Lee, 2002). Die Aktivierung von STAT3 wird hauptsächlich über die Phosphorylierung des Tyrosinrests Y705 bewerkstelligt (Becker et al., 1998; Chen et al., 1998). Auch die Phosphorylierung des Serinrests S727 hat einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von STAT3 (Decker und Kovarik, 2000).



Die Y705-Phosphorylierung erfolgt in den meisten Fällen durch Rezeptor-assoziierte Janus kinasen, kann aber auch direkt über Rezeptorkinasen erfolgen: Für die Zytokine *epidermal growth factor* (EGF) und *platelet-derived growth factor* (PDGF) ist beschrieben, dass die durch sie induzierte STAT3-Phosphorylierung nicht durch Januskinasen, sondern durch die intrinsische Tyrosin-Kinase-Funktion des Rezeptors (EGFR bzw. PDGFR) bewerkstelligt wird – obwohl sowohl EGFR als auch PDGFR mit Januskinasen assoziiert sind (Zhong et al., 1994; Vignais et al., 1996). Dies ist v.a. unter dem Gesichtspunkt interessant, dass der PDGFR- α über eine Interaktion mit dem viralen Glykoprotein gB als *entry*-Rezeptor für die HCMV-Infektion beschrieben wurde (Soroceanu et al., 2008). Auch der EGFR wurde bereits als *entry*-Rezeptor für die HCMV-Infektion beschrieben wurde, wobei zu erwähnen ist, dass diese Daten kontrovers diskutiert werden (Wang et al., 2003; Isaacson, et al., 2007).

Wie bereits erwähnt, existieren sieben unterschiedliche STAT-Proteine, die in verschiedene Signaltransduktionswege involviert sind und denen unterschiedliche Bedeutungen zugeordnet werden. Die Funktion von STAT1 und STAT2 wird beispielsweise v.a. der antiviralen Antwort durch Interferone zugeschrieben. Bei STAT3 hingegen handelt es sich um einen funktionell sehr heterogenen Mediator, der an der Signaltransduktion vieler und teilweise gegenläufiger Zellfunktionen beteiligt ist (Akira, 2000; Levy und Lee, 2002).

Beispielsweise ist STAT3 sowohl Mediator der IL-6- als auch der IL-10-Signaltransduktion. Dabei handelt es sich bei IL-6 um ein v.a. pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin, dass im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion die Produktion verschiedener Akut-Phase-Proteine stimuliert und somit an der Infektabwehr beteiligt ist (Heinrich et al., 1990). IL-10 hingegen ist ein Zytokin, das über unterschiedliche Mechanismen vornehmlich anti-inflammatorisch wirkt (Moore et al., 2001) (s.u.).

Einleitung

Des Weiteren ist STAT3 auch über Zytokine wie LIF (Boeuf et al., 1997), PDGF (Vignais und Gilman, 1999), EGF (Zhong et al., 1994; Yue et al., 2011), G-CSF (McLemore et al., 2001), IL-11 oder auch IL-6 (Jenkins et al., 2007) an der Zell-Differenzierung und am Zellwachstum beteiligt und induziert zudem die Expression anti-apoptotischer Gene (Regis et al., 2008; Liu et al., 2010). Auf der anderen Seite ist STAT3 auch ein essentieller Mediator der Apoptosereaktion (Abell et al., 2005).

Zudem ist auch bekannt, dass STAT3 nicht nur durch den kanonischen Jak-STAT-Signalweg transduziert, sondern alternativ auch als unphosphoryliertes STAT3 (U-STAT3) durch Bindung an NF- κ B einen Transkriptionskomplex bildet, der die Expression unterschiedlicher Gene induziert; zu diesen zählen viele pro-inflammatorische Gene, wie z.B. IFN- β und RANTES (Yang et al., 2007; Yang und Stark, 2008).

1.3.2.1. Embryonale Letalität STAT3-defizienter Mäuse

Die ausgeprägte Heterogenität der Funktionen, in denen STAT3 involviert ist, verdeutlicht sich auch in der Tatsache, dass die Generierung STAT3-defizienter Mäuse zu einer embryonalen Letalität führt – im Gegensatz zu den meisten anderen STAT-Proteinen (Akira, 1999). Dabei kommt es zwischen Tag 6,5 und 7,5 zur Degeneration der STAT3-defizienten Embryonen, was verdeutlicht, dass STAT3 eine essentielle Rolle im frühen Abschnitt der Embryogenese spielt (Takeda et al., 1997). Wegen der embryonalen Letalität der STAT3-defizienten Embryonen wurde die Funktion von STAT3 in unterschiedlichen Geweben mit Hilfe des Cre-*loxP*-Rekombinationssystems untersucht (Akira, 2000; Levy und Lee, 2002). Dabei konnte beispielweise gezeigt werden, dass die spezifische Deletion von STAT3 in T-Lymphozyten zu einer Inhibition der IL-6-induzierten T-Zell-Proliferation führt. Mäuse mit spezifischer Deletion von STAT3 in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zeigten eine Hypersuszeptibilität gegenüber Endotoxin, die sich in einer erhöhten Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und dem gehäuften Auftreten eines endotoxischen Schocks bei entsprechender Stimulation äußert; dies ist u.a. damit zu begründen, dass die Wirkung von IL-10 in den STAT3-defizienten Makrophagen deutlich eingeschränkt ist (Takeda et al., 1999). Die Behandlung STAT3-defizienter muriner embryonaler Fibroblasten mit IL-6 führt zum Auftreten einer IFN- γ -artigen Immunantwort, was vorzugsweise damit zu begründen ist, dass das Fehlen von STAT3 die Rekrutierung und Aktivierung von STAT1 zur Folge hat (Costa-Pereira et al., 2002).

1.3.2.2. Unterscheidung zwischen STAT3 α und STAT3 β

Bisher sind vier verschiedene STAT3-Isoformen beschrieben worden (α , β , γ , δ). Bei STAT3 α und STAT3 β handelt es sich um zwei Isoformen, die durch alternatives Spleißen eines Primärtranskripts generiert werden. Dabei ist STAT3 α das sogenannte „full-length“ STAT3, während es sich bei STAT3 β um eine verkürzte Variante dieses Proteins handelt, bei dem die 55 C-terminalen Aminosäuren der Transaktivierungsdomäne – inkl. der S727-Phosphorylierungsstelle – durch ein STAT3 β -spezifisches, sieben Aminosäuren umfassendes Ende ersetzt werden. Diese Verkürzung wird durch einen alternativen Spleißvorgang mit daraus resultierendem *frameshift* hervorgerufen (s. Abb. 7) (Schaefer et al., 1995).

Über STAT3 γ und STAT3 δ ist hingegen bisher wenig bekannt. STAT3 γ wird posttranslational durch limitierte Proteolyse von STAT3 α in Granulozyten generiert (Kato et al., 2004). Auch STAT3 δ scheint in Granulozyten eine Rolle zu spielen (Hevehan et al., 2002).

Wegen der Verkürzung der Transaktivierungsdomäne und des Fehlens der Serin S727-Phosphorylierungsstelle wurde STAT3 β in der Vergangenheit als dominant-negative Variante des STAT3 angesehen (Caldenhoven et al., 1996). Diese Ansicht musste jedoch revidiert werden: Einerseits wurde beobachtet, dass die Substitution von STAT3 β die embryonale Letalität von STAT3-defizienten Mäusen kompensiert; andererseits konnte auch gezeigt werden, dass STAT3 β Homo- und Heterodimere ausbildet und die Aktivität bestimmter spezifischer Gene induzieren kann. Aus diesen Gründen wird derzeit davon ausgegangen, dass sowohl STAT3 α als auch STAT3 β an der STAT3-Signaltransduktion beteiligt sind und jeweils neben überlappenden auch über exklusive Funktionen verfügen (Maritano et al., 2004).

Die Funktion und Regulation von STAT3 β ist weiterhin nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Tyrosin Y705 in STAT3 β phosphoryliert wird, um eine Dimerisierung auszulösen, wobei die Dimere eine stärkere DNA-Bindungsaktivität aufweisen als entsprechende STAT3 α -Dimere (Park et al., 2000). Mit Hilfe STAT3 β -defizienter Mäuse konnten einige zusätzliche Informationen zu der Rolle von STAT3 β erforscht werden. So konnten (Yoo et al., 2002) zeigen, dass STAT3 β -defiziente Mäuse eine Hypersuszeptibilität gegenüber Lipopolysaccharid (LPS) zeigen und nach LPS-Injektion gehäuft mit letal endendem endotoxischem Schock reagieren. In einer Arbeit von Maritano und Mitarbeitern

wurde gezeigt, dass STAT3 β -defiziente peritoneale Makrophagen mit einer signifikant höheren Sekretion von IL-6 und TNF- α auf die Behandlung mit LPS reagieren, andererseits aber deutlich weniger IL-10 sezernieren (Maritano et al., 2004). Diese Daten führen zu der Annahme, dass STAT3 β vermutlich eine immunregulatorische und anti-inflammatorische Funktion hat.

1.3.2.3. Die Rolle von STAT3 in unterschiedlichen Krankheitsbildern

STAT3 ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und wirkt in diesem Zusammenhang v.a. als anti-apoptotisches Protein, das die Zellproliferation stimuliert. So zählen beispielsweise die anti-apoptotischen Proteine Bcl-x (Catlett-Falcone et al., 1999), Mcl-1 (Epling-Burnette et al., 2001) und Survivin (Aoki et al., 2003) zu den Zielgenen von aktiviertem STAT3. Auf der anderen Seite wird die Expression von einigen pro-apoptotischen Proteinen, wie beispielsweise p53, durch STAT3 inhibiert (Niu et al., 2005). Aus diesem Grund gilt STAT3 als Onkogen. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Rolle von STAT3 im Rahmen der Angiogenese: Für die Entwicklung und das Wachstum eines neoplastischen Geschehens ist es von essentieller Bedeutung, dass dieses über eine Neovaskularisierung mit einer nutritiven Blutversorgung ausgestattet ist (Hanahan und Weinberg, 2011). Dabei wird die Angiogenese v.a. durch das Zytokin VEGF stimuliert (Plate et al., 1992; Grunstein et al., 1999; Lorenzon et al., 2011). Da aktiviertes STAT3 die Transkription von VEGF stimuliert (Niu et al., 2002b; Wei et al., 2003a; Wei et al., 2003b), spielt STAT3 auch eine wichtige Rolle für die Blutversorgung der Karzinome.

Aus diesen Angaben folgernd ist es wenig überraschend, dass konstitutiv aktiviertes STAT3 sowohl in einer Vielzahl von soliden also auch hämatologischen Tumoren nachgewiesen werden kann, wie z.B. dem Prostatakarzinom (Ni et al., 2000), dem Mammakarzinom (Burke et al., 2001; Garcia et al., 2001), dem malignen Melanom (Niu et al., 2002a) und der akuten myeloischen Leukämie (Schuringa et al., 2000; Redell et al., 2011). Die konstitutive Aktivierung von STAT3 ist in den bisher bekannten Beispielen aber nicht auf Mutationen zurückzuführen, sondern auf eine Dysregulation unterschiedlicher Signaltransduktionswege – beispielsweise des IL-6- oder des EGF-Signalwegs (Darnell, 2002).

Außerdem spielt konstitutiv-aktiviertes STAT3 auch eine wichtige Rolle in chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis (Liu und Pope, 2003) oder dem Morbus Crohn (Lovato et al., 2003).

Das seltene Hyper-IgE-Syndrom, das im englischen Sprachgebrauch in Anlehnung an die von Hautgeschwüren geplagte biblische Figur des Hiob *Job's disease* genannt wird, wird häufig durch Mutationen im STAT3-Gen verursacht. Im Gegensatz zu den vorher genannten Erkrankungen handelt es sich hierbei aber meist um eine Funktionseinschränkung des STAT3-Proteins. Die Patienten sind durch wiederkehrende Staphylokokken-Abszesse in der Haut, Hautekzeme, Pneumonien und – dem Namen entsprechend – hohe IgE-Titer gekennzeichnet (Holland et al., 2007; Renner et al., 2007). Somit scheint STAT3 für die Abwehr der Staphylokokken eine wichtige Rolle zu spielen. Da STAT3 entscheidend an der Differenzierung von T_h17-Zellen beteiligt ist und T_h17-Zellen eine wichtige Rolle in der Abwehr bakterieller Erreger spielen, könnte hier durchaus ein möglicher Kausalzusammenhang bestehen (Minegishi und Karasuyama, 2009).

1.4. Zytokine als Modulatoren der immunologischen Antwort

Für die interzelluläre Signalübertragung spielen Zytokine eine entscheidende Rolle. Sie sind in eine Vielzahl von zellulären Vorgängen involviert, wie z.B. dem Wachstum und der Zellproliferation, der Apoptose, der Differenzierung und der Immun-Antwort auf infektiöse Erreger. Bei Zytokinen handelt es sich häufig um glykolisierte Polypeptide, die von vielen unterschiedlichen Zelltypen auf entsprechende Reize hin sezerniert werden und auf den Zielzellen, die den jeweiligen Rezeptor exprimieren, ihre Wirkungen ausüben. Dies geschieht zumeist in auto-, para- und endokriner Weise. Das Signal der Zytokin-Rezeptor-Interaktion wird über unterschiedliche Signalwege – z.B. Jak-STAT-Signalwege – in den Zellkern übermittelt und induziert in der Folge die Transkription unterschiedlicher Zielgene. Zu den Zytokinen zählen u.a. die Gruppen der Interleukine und der Interferone (Heinrich et al., 1998).

1.4.1. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) zählt einerseits zu der Gruppe der Interleukine, ist aber andererseits auch prototypisch für die Familie der IL-6-artigen Zytokine, die dadurch charakterisiert ist, dass alle Mitglieder ihr Signal über einen gp130-haltigen Rezeptor (s.u.) übermitteln; zu dieser Familie gehören z.B. auch der *leukemia inhibitory factor* (LIF) und Oncostatin M (OSM). Die

Einleitung

Sekretion von IL-6 wird u.a. durch IL-1 und LPS stimuliert. Bei IL-6 handelt sich um ein pleiotropes Zytokin, das an der Regulierung unterschiedlicher zellulärer Abläufe beteiligt ist, wie z.B. dem Zellwachstum, der Differenzierung sowie der Regulation inflammatorischer Vorgänge (Kishimoto et al., 1995).

IL-6 wurde als dasjenige Zytokin beschrieben, das die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen induziert; aus diesem Grund wurde es anfangs als *B-cell stimulatory factor-2* (BSF-2) bezeichnet (Hirano et al., 1986). In der Folge konnten aber viele weitere Funktionen dieses Zytokins erforscht werden. So ist z.B. bekannt, dass IL-6 ein wichtiger Regulator der pro-inflammatorischen Akute-Phase-Reaktion ist, die Produktion vieler Akute-Phase-Proteine durch Hepatozyten induziert und als Pyrogen an der Fieberregulation beteiligt ist. Zudem ist IL-6 an der Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten und der Reifung von Megakaryozyten beteiligt (Heinrich et al., 1990; Kishimoto et al., 1995).

Wegen seiner zumeist pro-inflammatorischen Eigenschaften ist IL-6 auch mit dem Auftreten einiger chronisch-entzündlicher Krankheiten assoziiert, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder dem Morbus Crohn (Yoshizaki et al., 1998; Atreya et al., 2000). Dieser Zusammenhang wird für therapeutische Zwecke ausgenutzt, beispielsweise mit der Applikation von Tocilizumab, einem monoklonalen Antikörper, der sich gegen den IL-6-Rezeptor (IL-6R) richtet (Genovese et al., 2008).

1.4.1.1. IL-6-Signaltransduktion

IL-6 entfaltet seine Wirkung durch die Bindung an einen Rezeptor-Komplex, bestehend aus dem Zytokin-bindenden IL-6-Rezeptor (IL-6R, gp80) sowie einer an der Signaltransduktion beteiligten gp130-Untereinheit. Die Signaltransduktion von IL-6 kann über unterschiedliche Signalwege verlaufen, wie z.B. über die Aktivierung des MAPK-Signalwegs oder des Jak-STAT-Signalwegs. Der Jak-STAT-Signalweg ist bisher am besten beschrieben und wird wegen seiner Relevanz für diese Arbeit im Folgenden genauer dargestellt.

Die Bindung von IL-6 an den IL-6R führt zu einer Homodimerisierung des assoziierten gp130, was zu einer Aktivierung der assoziierten Januskinasen (Jak1, Jak2 und Tyk2) führt. Diese phosphorylieren unterschiedliche Tyrosinreste des Rezeptors, was zu einer Rekrutierung von STAT3 und zu einem geringeren Anteil auch STAT1 führt. Die STAT-Proteine werden durch die Januskinasen phosphoryliert und demzufolge aktiviert. In der

Folge kommt es zu einer Homo- und Heterodimerisierung der STAT-Proteine, die in den Zellkern translozieren und die Transkription unterschiedlicher Zielgene induzieren (Hirano et al., 2000; Heinrich et al., 2003). Zu den Zielgenen von IL-6 zählt u.a. SOCS3, ein Protein, das als klassischer negativer *feedback* Inhibitor an phosphorylierte Tyrosinreste des gp130 bindet und somit die weitere Phosphorylierung von STAT3 inhibiert (Kile und Alexander, 2001). Ein weiteres IL-6-Zielgen ist der *interferon regulatory factor 1* (IRF-1), ein Transkriptionsfaktor, der auch durch IFN- γ induziert wird und an der Steuerung einer Typ I IFN-Antwort beteiligt ist (Taniguchi et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde außerdem das Designer-Zytokin Hyper-IL-6 verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. J. Scheller und Prof. S. Rose-John, Institut für Biochemie, Carl-Albrechts-Universität zu Kiel; vorgestellt in (Peters et al., 1998)). Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein, bestehend aus IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R). Aufgrund dieser Verbindung können auch Zellen stimuliert werden, die nicht über den IL-6R verfügen. Hyper-IL-6 zeigt eine super-agonistische Aktivität.

1.4.1.2. *IL-6 und CMV*

Für viele Viren ist bekannt, dass eine Infektion zu einer verstärkten Sekretion von IL-6 führt (Sehgal et al., 1988). Dies wurde beispielsweise für Infektionen mit dem Epstein-Barr Virus (Tanner et al., 1996; Eliopoulos et al., 1997) oder dem Herpes-simplex Virus (Li et al., 2006) beschrieben. Auch für das Influenza-A-Virus, das Respiratorische-Synzitial-Virus (RSV) (Becker et al., 1991) sowie für das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) (Birn et al., 1990) konnte ein solcher Zusammenhang gezeigt werden.

Auch bei der Infektion von Mäusen mit MCMV konnten vergleichbare Befunde erhoben werden: Im Rahmen der Infektion mit MCMV wird die Sekretion verschiedener Zytokine stimuliert; zu diesen Zytokinen zählt neben TNF, IFN- γ und IL-12 auch IL-6. Die Sekretion von IL-6 ist an der Ausbildung der infektionsbedingten inflammatorischen Reaktion beteiligt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die MCMV-bedingte Induktion von IL-6 eine Stimulation der Sekretion von Glukokortikoiden hervorruft (Ruzek et al., 1997).

Auch für HCMV konnte gezeigt werden, dass die Infektion von unterschiedlichen Zelltypen zu einer Induktion von IL-6 führt. So führt beispielsweise die Infektion von Endothelzellen mit HCMV zu einer verstärkten Sekretion von IL-6 (Almeida et al., 1994); IL-6 hat in diesen Zellen durch die Stimulation von Survivin eine anti-apoptotische Wirkung und induzierte die

Angiogenese (Botto et al., 2011). Auch die Infektion von Stromazellen des Knochenmarks führt zu einer verstärkten IL-6-Sekretion (Lagneaux et al., 1996). Das *immediate early* Gen IE1 scheint an der Entwicklung dieser IL-6-Antwort maßgeblich beteiligt zu sein (Geist und Dai, 1996). Andererseits wurde aber auch berichtet, dass die Infektion mit HCMV trotz Induktion der IL-6-Transkription zu einer Hemmung der IL-6-Sekretion führt; dies wird durch eine Destabilisierung der IL-6-mRNA bewerkstelligt (Gealy et al., 2005).

1.4.2. Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) ist als Zytokin ein wichtiger negativer Regulator der Immunreaktion. Auch wenn IL-10 ein multifunktionales Zytokin ist und auf Proteinebene eng mit den Interferonen verwandt ist, ist es vornehmlich durch seine anti-inflammatorische Wirkungen charakterisiert. Zu diesen zählt z.B. die Inhibition der Aktivierung von Makrophagen, wodurch wiederum die Sekretion von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α gehemmt wird (Bogdan et al., 1991; Fiorentino et al., 1991a). Die Behandlung von antigenpräsentierenden Zellen mit IL-10 führt dazu, dass die IFN- γ -Sekretion unterdrückt wird (Fiorentino et al., 1991b). IL-10 limitiert eine durch LPS ausgelöste inflammatorische Reaktion und schützt den Organismus somit vor dem Auftreten eines endotoxischen Schocks (Moore et al., 2001; Grutz, 2005).

Trotz der ausgeprägten anti-inflammatorischen Wirkungen führt die Sekretion von IL-10 auch zu immunstimulierenden Effekten. So stimuliert die Behandlung mit IL-10 beispielsweise die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen sowie deren Antikörper-Synthese (Rousset et al., 1992); auch die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen wird induziert.

Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von IL-10 in IL-10-defizienten Mäusen zum Auftreten von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen führt (Kuhn et al., 1993). Bei diesen Mäusen konnten verstärkte inflammatorische Reaktionen in der Darmmukosa und in der Submukosa nachgewiesen werden, die u.a. durch eine große Menge an Makrophagen und CD4⁺ T-Lymphozyten im Kolon sowie eine erhöhte Konzentration an inflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α hervorgerufen wird (Rennick et al., 1997; Leach et al., 1999).

Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, dass IL-10 wegen seiner anti-inflammatorischen Eigenschaften zur Therapie von chronisch-entzündlichen Krankheitsprozessen genutzt wird. Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass die Applikation von IL-10 (in

unterschiedlichen Darreichungsformen) eine protektive Wirkung bei Patienten mit Morbus Crohn haben kann (Li und He, 2004; Braat et al., 2006). Auch für die Pathogenese bzw. die Therapie von anderen Erkrankungen – wie z.B. der rheumatoiden Arthritis, dem systemischen Lupus erythematodes und dem Diabetes mellitus – wird IL-10 eine Rolle zugeschrieben (Moore et al., 2001).

Zudem können erhöhte IL-10-Titer bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen, wie z.B. dem Pankreaskarzinom oder dem malignen Melanom, nachgewiesen werden (Fortis et al., 1996). Die Bedeutung dieses IL-10 ist allerdings noch nicht vollständig geklärt und kann in unterschiedlichen Kontexten unterschiedliche Ursachen haben. Das IL-10 kann z.B. im Rahmen der inflammatorischen Anti-Tumor-Reaktion durch die Zellen des Immunsystems produziert werden. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass das IL-10 durch die Tumorzellen sezerniert wird, um die inflammatorische Anti-Tumor-Reaktion zu inhibieren (Moore et al., 2001).

1.4.2.1. IL-10-Signaltransduktion

IL-10 entfaltet seine Wirkung, indem es als Homodimer an den IL-10-Rezeptor (IL-10R) bindet. Der IL-10R stellt ein Tetramer dar, das aus je zwei Ketten der beiden Untereinheiten IL-10R1 und IL-10R2 besteht. Die Bindung des IL-10 an den Rezeptor wird über den extrazellulären Abschnitt des IL-10R1 bewerkstelligt. Durch diese Bindung werden unterschiedliche Signalwege aktiviert, beispielsweise inhibiert IL-10 die Aktivierung von NF- κ B (Moore et al., 2001). Der wichtigste und am besten beschriebene Signalweg ist aber der Jak-STAT-Signalweg; dieser wird im Folgenden genauer dargestellt:

Die Bindung von IL-10 an den IL-10R bewirkt eine Aktivierung der mit dem IL-10R1 bzw. IL-10R2 assoziierten Januskinasen Jak1 und Tyk2, die wiederum Tyrosinreste des IL-10R phosphorylieren. In der Folge kommt es zu einer Rekrutierung von STAT3 und zu einem geringeren Anteil auch STAT1 an den IL-10R. Die STAT-Proteine werden durch die Januskinasen phosphoryliert und somit aktiviert, was zur Folge hat, dass diese homo- oder heterodimerisieren und in den Zellkern translozieren. Hier kommt es zur Bindung der STAT-Dimere an die Enhancer der entsprechenden Zielgene (Donnelly et al., 1999; Moore et al., 2001).

Zu diesen Zielgenen zählt SOCS3. Demzufolge wird die Expression von SOCS3 sowohl durch IL-6 (s.o.) als auch durch IL-10 induziert. Im Unterschied zu IL-6 wird der IL10R aber

nicht durch SOCS3 reguliert (Lang et al., 2003), was damit zu begründen ist, dass SOCS3 nicht an die entsprechenden phosphorylierten Tyrosinreste des IL-10R bindet und somit eine deutlich geringere Affinität zu diesem Rezeptor hat (Yasukawa et al., 2003). Dieser Unterschied spielt eine entscheidende Rolle bei der Generierung der IL-10-induzierten anti-inflammatorischen Reaktion, was daran zu erkennen ist, dass sich die normalerweise pro-inflammatorische IL-6-Antwort in eine anti-inflammatorische Antwort umwandelt, wenn SOCS3-defiziente Zellen mit IL-6 behandelt werden (s. Abschnitt 3.4.1.) (Yasukawa et al., 2003; Murray, 2007).

1.4.2.2. *IL-10 und CMV*

Herpesviren haben unterschiedliche Immunevasionsmechanismen entwickelt, um das Immunsystem ihres Wirts abzuschwächen und eine persistente Infektion in ihrem Wirt zu etablieren (Davis-Poynter und Farrell, 1996; Hengel et al., 1998). Wegen seiner immunmodulatorischen und vornehmlich anti-inflammatorischen Wirkung wird IL-10 von einigen Viren für diese Zwecke ausgenutzt. So ist beispielsweise bekannt, dass das Epstein-Barr Virus (EBV) ein IL-10-Homolog kodiert, das einige Wirkungen von IL-10 imitiert (Moore et al., 1990).

Auch für HCMV konnte ein dem IL-10 homologes Protein nachgewiesen werden, welches als cmvIL-10 bezeichnet wird. Dieses Zytokin wird auf dem ORF UL111a kodiert. cmvIL-10 hat verglichen mit dem humanen IL-10 eine Homologie von nur 27%, kompetitiert aber trotzdem mit diesem um die Bindung an den IL-10R und kann viele anti-inflammatorische Effekte des humanen IL-10 auslösen (Kotenko et al., 2000). So konnte gezeigt werden, dass cmvIL-10 STAT3 aktiviert und die Sekretion von IL-1 α , IL-6 und TNF- α durch LPS-stimulierte Monozyten inhibiert. Auch die Oberflächenexpression der Proteinkomplexe MHC-I und MHC-II wird durch cmvIL-10 gehemmt (Spencer et al., 2002).

Interessanterweise kommt es auch während der latenten Infektion zu der Sekretion eines viralen IL-10, allerdings handelt es sich dabei um ein durch alternatives Spleißen verkürztes IL-10-Homolog, das als *latency-associated* cmvIL-10 (LAcmvIL-10) bezeichnet wird (Jenkins et al., 2008a). Die Funktionen dieses Zytokins gleichen teilweise den Funktionen des cmvIL-10, so konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Behandlung mit LAcmvIL-10 zu einer Inhibition der MHC-II-Oberflächenexpression führt. Allerdings konnten auch eindeutige Unterschiede zum cmvIL-10 beschrieben werden: Beispielsweise induziert

LAcmvIL-10 nicht die Phosphorylierung von STAT3 und inhibiert nicht die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α (Jenkins et al., 2008b).

Im Gegensatz zu HCMV konnte für MCMV bisher kein virales IL-10-Homolog nachgewiesen werden. Dafür konnte aber gezeigt werden, dass MCMV die Wirkung von IL-10 ausnutzt, indem es die Sekretion von IL-10 durch die wirtseigenen Zellen stimuliert. Die Sekretion von IL-10 führt folglich zu einer anti-inflammatorischen Reaktion, so wird z.B. die Oberflächenexpression von MHC-II-Proteinkomplexen inhibiert (Redpath et al., 1999). Die Stimulation von IL-10 hat für die Persistenz von MCMV eine wichtige Bedeutung (Humphreys et al., 2007).

1.4.3. Interferone

Im Rahmen des angeborenen Immunsystems kommt es nach Erkennung eines infektiösen Erregers zu der Ausschüttung von Interferonen (IFN). Diese Gruppe der Zytokine ist v.a. durch seine antiviralen Eigenschaften charakterisiert, hat aber gleichzeitig auch andere wichtige Funktionen, wie beispielsweise die Tumorkontrolle. Interferone wirken auf auto- und parakrine Weise und induzieren in der Zielzelle die Expression bestimmter Zielgene, sodass in der Zelle ein antiviraler Zustand hervorgerufen wird. Zu den Effektorgenen der Interferone zählen beispielsweise die dsRNA-abhängige Proteinkinase R (PKR), die Mx-Proteine und die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS). Auch die Oberflächenexpression der Proteinkomplexe MHC-I und MHC-II wird durch Interferone stimuliert (Katze et al., 2002).

Die Interferone werden in drei Gruppen eingeteilt: Typ-I-IFN, Typ-II-IFN und Typ-III-IFN, wobei über die letztgenannte Gruppe bisher relativ wenig bekannt ist. IFN- α und IFN- β zählen zu der Gruppe der Typ-I-IFN, während IFN- γ den einzigen humanen Vertreter der Gruppe der Typ-II-IFN darstellt. IFN transduzieren ihr Signal hauptsächlich über den Jak-STAT-Signalweg.

IFN- α und IFN- β haben gemeinsam, dass sie beide an denselben Rezeptor binden, nämlich den IFN- α -Rezeptor (IFNAR). Die Bindung an den Rezeptor führt zu einer Aktivierung der assoziierten Januskinasen Jak1 und Tyk2, was wiederum zu einer Phosphorylierung des Rezeptors und der Rekrutierung von STAT1- und STAT2-Proteinen über deren SH2-Domänen führt. STAT1 und STAT2 werden durch die Januskinasen phosphoryliert und heterodimerisieren. In der Folge kommt es durch zusätzliche Bindung des *interferon*

Einleitung

regulatory factor 9 (IRF-9) zu der Ausbildung eines STAT1:STAT2:IRF-9-Heterotrimer, welches als *interferon stimulated gene factor 3* (ISGF3) bezeichnet wird. Dieser Transkriptionskomplex transloziert in den Zellkern, bindet an *interferon stimulated response elements* (ISRE) der DNA, wobei die DNA-Bindung über die DNA-Bindemotive von IRF-9 und STAT1 bewerkstelligt wird. Dies führt zu der Induktion der Transkription unterschiedlicher Zielgene (Platanias, 2005).

IFN- γ hingegen entfaltet seine Wirkung über die Bindung an den IFN- γ -Rezeptor (IFNGR). Die Bindung an den Rezeptor induziert über die assoziierten Januskinasen Jak1 und Jak2 die Phosphorylierung von STAT1 und zu einem geringeren Maße auch STAT3 (Qing und Stark, 2004). Durch Homodimerisierung des aktivierten STAT1 kommt es zur Ausbildung des *gamma activated factor* (GAF), welcher in den Nukleus transloziert, dort an die Zielsequenz der DNA – nämlich der *gamma activated sequence* (GAS) – bindet und die Transkription der entsprechenden Zielgene induziert (Platanias, 2005).

Interferone haben in der Medizin inzwischen auch für die medikamentöse Therapie unterschiedlicher Krankheitsbilder eine wichtige Bedeutung erlangt. So wird IFN- α u.a. für die Behandlung der chronischen Hepatitiden B und C (European Association For The Study Of The Liver, 2012) (Fried et al., 2002) eingesetzt. IFN- β hingegen wird wegen seiner immunmodulierenden Wirkung v.a. Patienten mit multipler Sklerose verabreicht (Ebers et al., 1998).

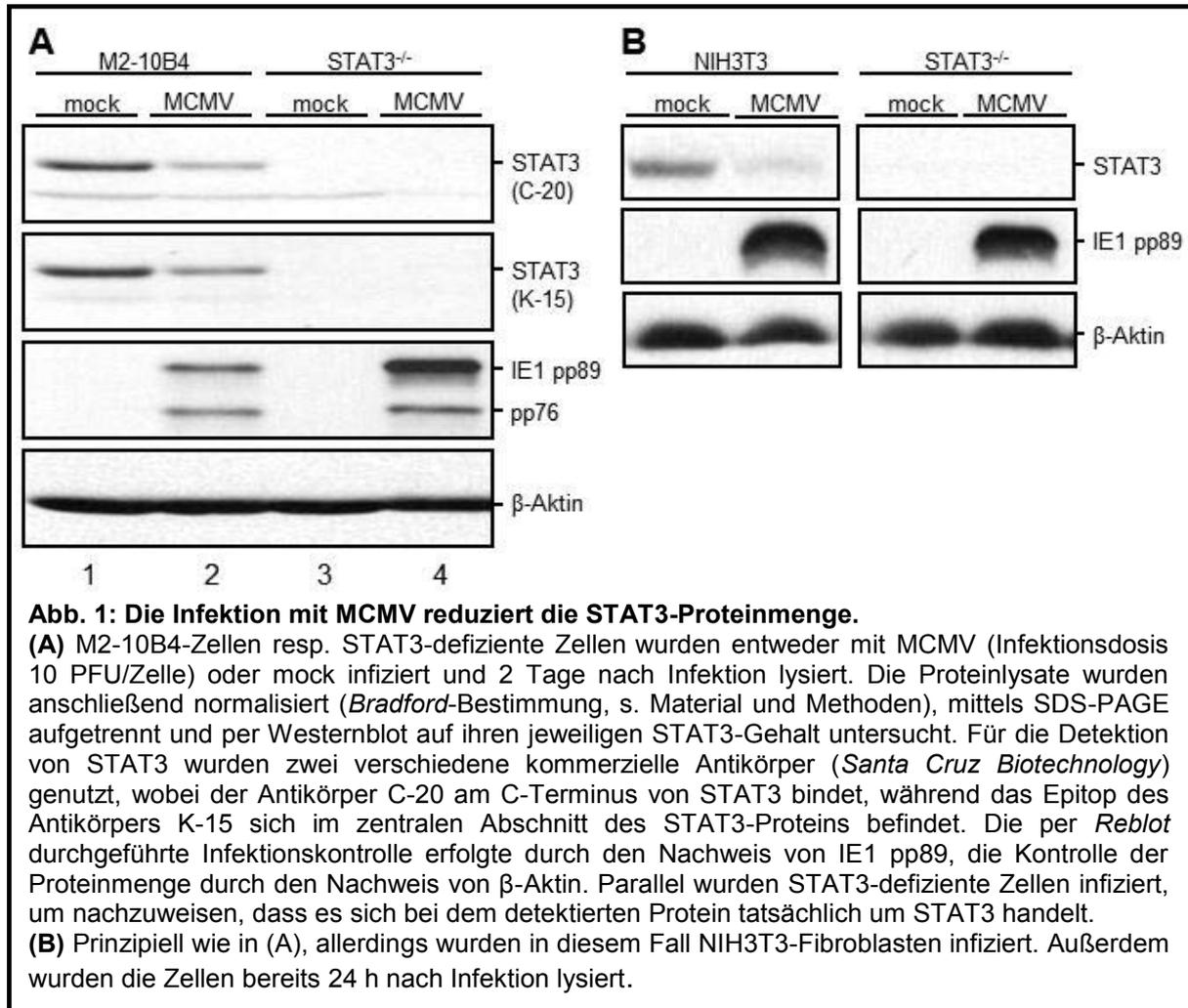
2. Ergebnisse

2.1. Modulation von STAT3 durch das murine Cytomegalovirus

2.1.1. Infektion mit MCMV reduziert die Gesamtmenge von STAT3

Im Rahmen von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass MCMV die STAT2-Proteinmenge posttranskriptional reduziert (Zimmermann et al., 2005; Trilling et al., 2011). Um zu untersuchen, ob MCMV einen ähnlichen Effekt auf das STAT2-homologe Protein STAT3 ausübt, wurden MCMV-permissive, M2-10B4-Mesenchymzellen der Maus mit MCMV infiziert (Abb. 1A). Die Zellen wurden mit einer Infektionsdosis von 10 *plaque forming units* (PFU) pro Zelle (entspricht *multiplicity of infection* [MOI] 10) MCMV infiziert (Virusstamm: MW97.01). Zwei Tage nach Infektion wurden Proteinlysate hergestellt. Mittels Westernblot (s. Material und Methoden) wurde die Menge an STAT3 bestimmt. Die Detektion von STAT3 erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen α -STAT3 Antikörper (Santa Cruz; C-20), welcher am C-Terminus des Proteins bindet; dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion des STAT3-Signals nach Infektion mit MCMV (Abb. 1). Um auszuschließen, dass es sich bei dem reduzierten Signal um eine Maskierung des Proteins oder um eine Abspaltung des C-Terminus handelt, wurde zusätzlich ein weiterer α -STAT3 Antikörper verwendet (Santa Cruz; K-15), der ein im zentralen Abschnitt des STAT3-Proteins befindliches Epitop erkennt. Auch mit diesem Antikörper war eine deutliche Reduktion des STAT3-Signals nach Infektion mit MCMV festzustellen (Abb. 1A). Parallel wurden STAT3-defiziente Maus-Fibroblasten infiziert, um nachzuweisen, dass es sich bei dem in M2-10B4-Zellen detektierten Protein tatsächlich um STAT3 handelt. Somit konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit MCMV in M2-10B4-Zellen zu einer Reduktion der STAT3-Proteinmenge führt.

Ein erwähnenswerter Nebenbefund ist die Stärke des Signals des Infektionskontrollproteins IE1 pp89 und seines Prozessierungsproduktes pp76. Dieses ist in den STAT3-defizienten Zellen stärker als in den M2-10B4-Zellen (Vergleich Spur 2 und Spur 8); ähnliche Befunde konnten auch in anderen Experimenten beobachtet werden (s. z.B. Abb. 2C). Diese Ergebnisse zeigen, dass MCMV in STAT3-defizienten Zellen mehr pp89 exprimiert, was womöglich darauf zurückzuführen ist, dass das Virus in diesen Zellen besser bzw. schneller replizieren kann als in Zellen mit normalem STAT3-Gehalt (Näheres s. Abschnitt 1.3.1.).



Die Reduktion der STAT3-Proteinmenge nach Infektion mit MCMV konnte auch in anderen MCMV-permissiven Zelllinien beobachtet werden, wie beispielsweise in murinen NIH3T3-Fibroblasten (Abb. 1B). In diesem Fall wurden die Zellen mit derselben Infektionsdosis infiziert (10 PFU/Zelle), die Proteinlysate aber schon 24 h nach Infektion hergestellt. Wie erwartet, führte auch die MCMV-Infektion in Fibroblasten zu einer Reduktion der STAT3-Proteinmenge.

2.1.2. Infektion mit MCMV induziert die Phosphorylierung von STAT3

Die Aktivierung von STAT3 erfolgt über die Phosphorylierung des Tyrosin Y705. In Folge der Phosphorylierung interagiert das phosphorylierte Tyrosin mit einer src-Homologiedomäne 2 (SH2) eines weiteren Proteins – zumeist eines weiteren STAT3-Proteins – und es kommt somit zu einer Dimerisierung. Das antiparallel angeordnete STAT3-Dimer transloziert

Ergebnisse

in den Nukleus, bindet an eine spezielle DNA-Bindungssequenz und induziert die Transkription der jeweiligen Zielgene (Näheres s. Einleitung) (Murray, 2007). Demzufolge ist die Phosphorylierung des Tyrosin Y705 eine notwendige Voraussetzung und Indikator der Aktivierung von STAT3 im kanonischen Jak-STAT-Signalweg.

In Folge einer CMV-Infektion kommt es zu einer Sekretion unterschiedlicher Zytokine, wie beispielsweise IL-6 (Ruzek et al., 1997), IL-10 (Redpath et al., 1999) oder Typ I IFN (Fodil-Cornu und Vidal, 2008), welche wiederum Y705-Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3 induzieren. Nach Infektion mit MCMV wird die STAT3-Menge zwar nachhaltig reduziert, es ist jedoch weiterhin STAT3 vorhanden (s. o.). Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit STAT3 nach Infektion der Zellen mit MCMV phosphoryliert wird.

Zu diesem Zweck wurden M2-10B4-Zellen mit MCMV (Infektionsdosis 10 PFU/Zelle) infiziert (Abb. 2A). Als Positivkontrolle für eine STAT3-Phosphorylierung diente eine 30-minütige Behandlung der Zellen mit Hyper-IL-6 (10 ng/ml). 2 Tage nach der MCMV-Infektion wurden Proteinlysate hergestellt und mittels Westernblot auf ihren jeweiligen Gehalt an Y705-phosphoryliertem STAT3 sowie der Gesamtmenge an STAT3 untersucht. Interessanterweise zeigte sich nach MCMV-Infektion eine Zunahme des Y705-phosphorylierten STAT3, trotz der Reduktion des STAT3-Gehalts (s. o.). Auch sieht man, dass die beobachtete Reduktion des STAT3-Gehalts nicht durch eine Maskierung der Detektion im Westernblot in Folge der Y705-Phosphorylierung hervorgerufen wird, sondern dass es sich um eine echte Reduktion der Gesamtmenge handelt. Dies ist daran zu erkennen, dass die Reduktion im Falle der Y705-Phosphorylierung nach Behandlung mit Hyper-IL-6 ausbleibt (Abb. 2A, Spur 3 und Abb. 2C, Spur 3). Somit reduziert eine Infektion der hier untersuchten Zellen mit MCMV einerseits die Gesamtmenge an STAT3, erhöht aber gleichzeitig den absoluten Anteil an Y705-phosphoryliertem STAT3.

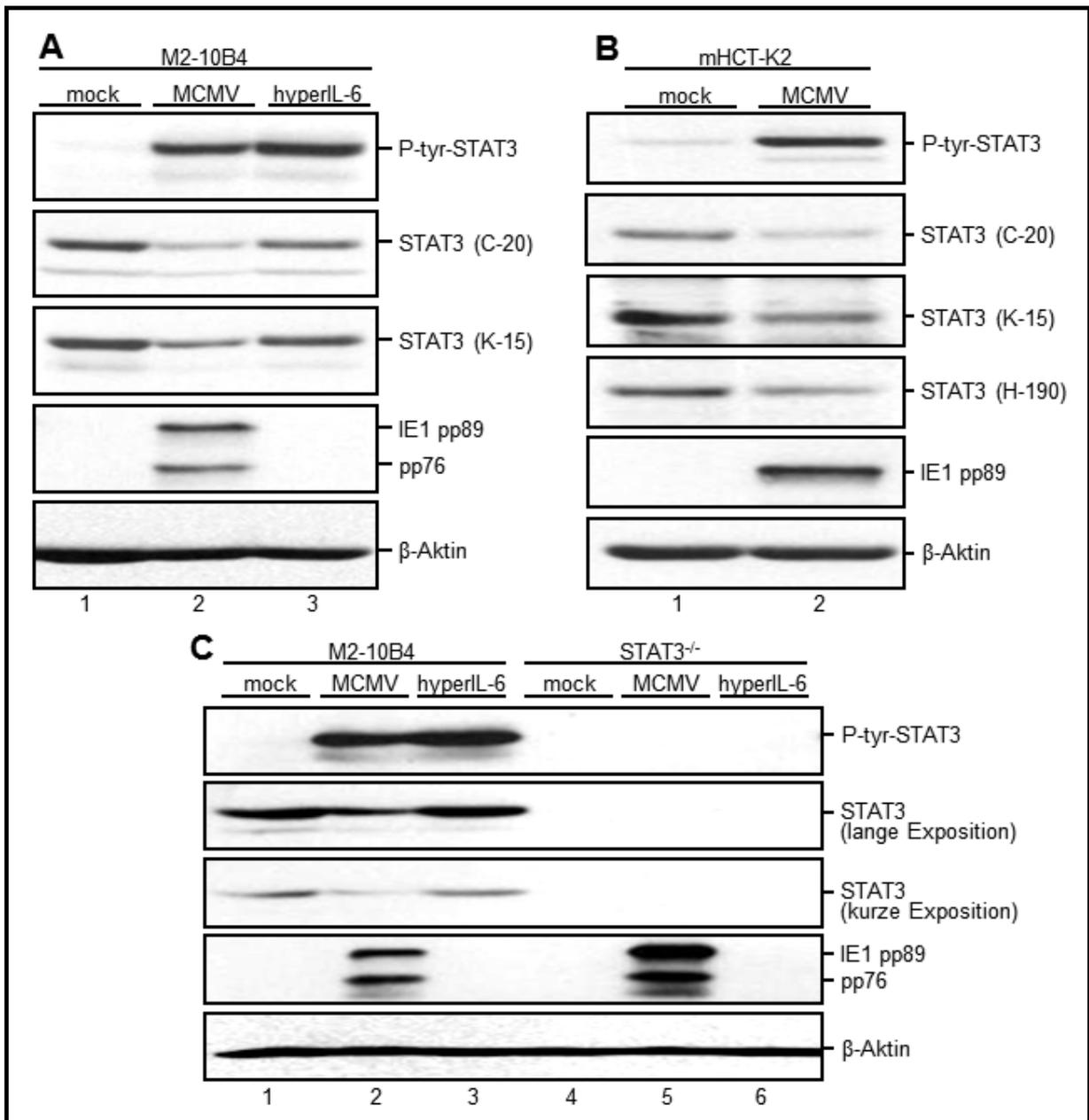


Abb. 2: Die Infektion mit MCMV induziert die Phosphorylierung von STAT3.

(A) M2-10B4 Mausstromazellen wurden mit MCMV (10 PFU/Zelle) infiziert und 2 Tage nach Infektion lysiert. Zusätzlich wurden mock-infizierte Zellen für 30 min mit Hyper-IL-6 (10 ng/ml) behandelt und zeitgleich mit den infizierten Zellen lysiert. Die Proteinlysate wurden normalisiert (*Bradford*-Bestimmung). Mittels Westernblot wurde die Phosphorylierung von STAT3 (P-tyr-705) sowie die Gesamtmenge an STAT3 mit spezifischen, kommerziell erworbenen Antikörpern untersucht. Alle Proteine wurden mit den angegebenen Antikörpern sequentiell auf einer Membran detektiert.

(B) Prinzipiell wie in (A), allerdings wurde die murine Hepatomazelllinie mHCT-K2 verwendet und mit einer Infektionsdosis von 3 PFU/Zelle infiziert. In diesem Experiment wurden die angegebenen STAT3-Antikörper parallel auf verschiedenen Membranen verwendet.

(C) Wie in (A), nur wurden die Zellen mit einer höheren Infektionsdosis infiziert (25 PFU/Zelle). Parallel wurden STAT3-defiziente Zellen als Kontrolle infiziert bzw. mit Hyper-IL-6 (10 ng/ml; 30 min) behandelt.

Im Rahmen der angeborenen Infektabwehr spielt die Akute-Phase-Reaktion eine entscheidende Rolle. Dabei kommt es über die Sekretion von Zytokinen wie IL-6 – und somit auch

der Aktivierung von STAT3 – zur Produktion zahlreicher Akut-Phase-Proteine durch die Leber (Heinrich et al., 1990). Zur genaueren Analyse der Reaktion von Leberzellen auf die Infektion mit MCMV wurden deshalb murine mHTC-K2-Hepatomazellen mit einer Infektionsdosis von 3 PFU/Zelle infiziert (Abb. 2B). Um auszuschließen, dass es sich bei der Reduktion der STAT3-Proteinmenge um ein durch mehrfaches Benutzen derselben Membran mittels *Reblot*-Puffer hervorgerufenen Verlust der Proteine handelt, wurden bei diesem Experiment alle STAT3-spezifischen Antikörper auf verschiedenen Membranen detektiert. Außerdem wurden für die Detektion des STAT3-Gesamtgehalts drei verschiedene Antikörper eingesetzt: Neben den α -STAT3 C-20 und α -STAT3 K-15 (s.o.) wurde zusätzlich der α -STAT3 H-190-Antikörper (Santa Cruz) verwendet, welcher ein Epitop erkennt, das sich im Bereich der Aminosäuren 50 bis 240 befindet und somit zusätzliche Evidenz dafür liefert, dass es sich nicht um eine Maskierung des STAT3-Proteins, sondern um eine tatsächliche Reduktion der Proteinmenge handelt. Da mit allen Antikörpern vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden, konnte für die folgenden Experimente zumeist nur ein Antikörper zur Detektion des Gesamt-STAT3 verwendet werden.

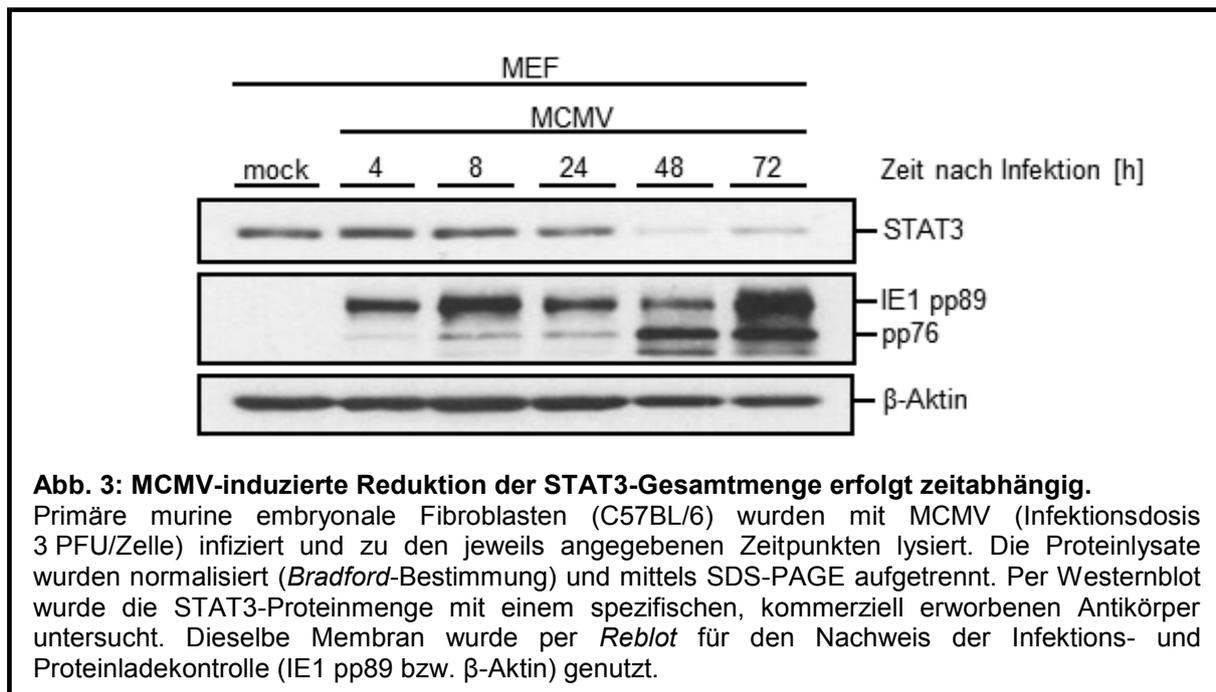
Abbildung 2C zeigt einen ähnlichen, auf M2-10B4-Zellen erzielten Befund, mit dem Unterschied, dass die Zellen mit einer deutlich höheren Infektionsdosis infiziert wurden (25 PFU/Zelle). In diesem Experiment wurden parallel STAT3-defiziente Zellen infiziert bzw. mit Hyper-IL-6 behandelt, sodass auch im Falle des Y705-phosphoryliertem STAT3 sichergestellt werden konnte, dass es sich bei der detektierten Bande tatsächlich um STAT3 handelt. Auffallend ist auch bei diesem Experiment die schon in Abbildung 1A beobachtete Zunahme der Stärke der Infektionskontrolle IE1 pp89 in den STAT3-defizienten Zellen (Spur 6) im Vergleich zu den M2-10B4-Zellen (Spur 3) (Näheres s. Abschnitt 1.3.1.).

2.1.3. Die Modulation von STAT3 durch MCMV erfolgt zeitabhängig

In Anbetracht der differenzierten Kinetik einer MCMV-Replikation mit ihren verschiedenen Phasen viraler Genexpression war zur genaueren Analyse der STAT3-Reduktion durch MCMV die Zeitabhängigkeit dieses Effekts von besonderem Interesse. Zu diesem Zweck wurden primäre murine embryonale Fibroblasten (MEF) in der dritten Passage mit einer Infektionsdosis von 3 PFU/Zelle infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion (max. 72 h) Proteinlysate hergestellt (Abb. 3). Dabei stellte sich heraus, dass die Reduktion mit einer gewissen Verzögerung abläuft und 8 h nach Infektion noch keine

Ergebnisse

quantitativen Unterschiede im Westernblot zu beobachten sind. 48 h nach MCMV-Infektion war der STAT3-Verlust am ausgeprägtesten.



2.1.4. Modulation von STAT3 durch MCMV erfolgt dosisabhängig

Um die Dosis-Wirkungs-Beziehung der durch die MCMV-Infektion hervorgerufenen Modulation von STAT3 zu untersuchen, wurden verschiedene Infektionen mit variierender Infektionsdosis durchgeführt. Primäre MEF (C57BL/6) wurden in der dritten Passage mit unterschiedlichen Infektionsdosen infiziert (0,05 - 5 PFU/Zelle). Da in der zuvor durchgeführten Kinetik gezeigt wurde (s. Abb. 3), dass die STAT3-Reduktion 48 h nach Infektion am ausgeprägtesten in Erscheinung tritt, wurden die Proteinlysate zu diesem Zeitpunkt hergestellt (Abb. 4A). Mittels Westernblot wurde die Gesamtmenge an STAT3 bestimmt. Bei Betrachtung der Spuren 1-3 ist eine Dosis-Wirkungs-Beziehung mit Abnahme der Proteinmenge bei steigender Viruslast feststellbar. Bei höheren Virusdosen sind keine Unterschiede mehr im STAT3-Gehalt zu erkennen. Vermutlich ist der Grund hierfür, dass sich die initial applizierte Infektionsdosis nach 2 Tagen in Folge der viralen Replikation ausgeglichen hat, was an den Infektionskontrollen (IE1 pp89) ablesbar ist. Um die Dosis-Wirkungs-Beziehung genauer darzustellen, könnte man in Zukunft ein Experiment durchführen, bei dem man – nach Infektion mit MCMV – neutralisierende Antikörper

Ergebnisse

appliziert, um die nach Replikation entstehenden Viren zu neutralisieren und die Virusverbreitung zu verhindern.

In einer zweiten MOI-Titration mit vergleichbarem Versuchsaufbau wurde der Zusammenhang zwischen der Infektionsdosis und der durch MCMV hervorgerufenen Y705-Phosphorylierung von STAT3 analysiert (Abb. 4B), wobei die Proteinlysate bei diesem Experiment bereits einen Tag nach Infektion hergestellt wurden. Wie nach der zuvor durchgeführten Kinetik erwartet, konnte man zu diesem Zeitpunkt nach Infektion nur eine leichte Reduktion der STAT3-Proteinmenge feststellen, sodass trotz unterschiedlicher Infektionsdosen ein nahezu konstanter STAT3-Gehalt in den Zellen zu erkennen war. Im Falle der Phosphorylierung hingegen wurde eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachtet, da mit steigender Infektionsdosis und dementsprechend steigendem IE1 pp89 auch größere Mengen an Y705-phosphoryliertem STAT3 detektiert wurden.

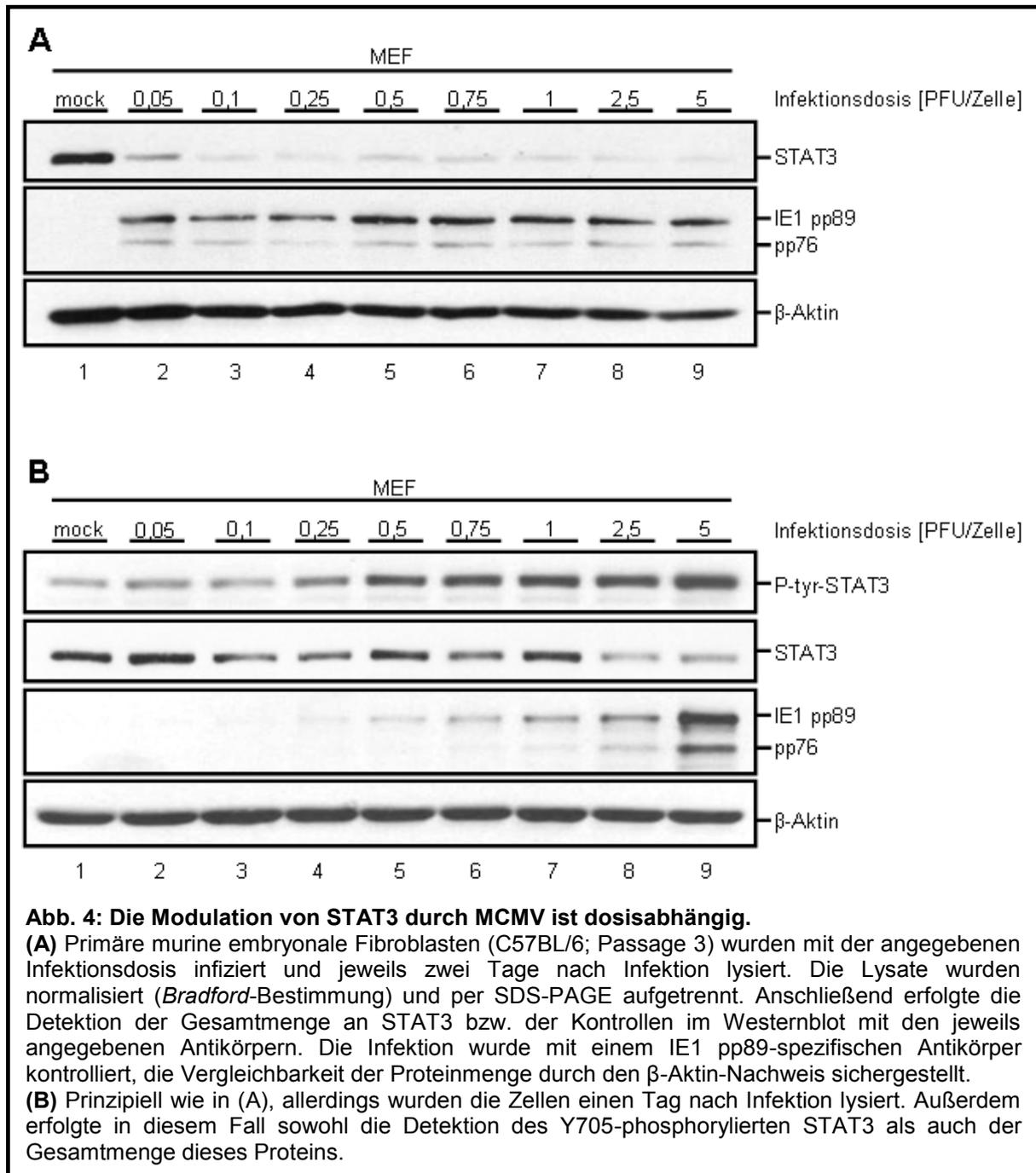
Zusammenfassend konnte also durch die MOI-Titrationsversuche eine positive Korrelation zwischen der Stärke der STAT3-Phosphorylierung bzw. Reduktion und der MCMV-Infektionsdosis aufgezeigt werden: Je mehr Virus inokuliert wurde, desto stärker war die STAT3-Phosphorylierung resp. die Reduktion der STAT3-Gesamtmenge ausgeprägt. Dies untermauert die Vermutung, dass die STAT3-Modulation direkt auf einem MCMV-kodierten Prinzip beruht. Auch wenn keinerlei dahingehende Hinweise bestehen, kann jedoch formal nicht ausgeschlossen werden, dass der gereinigte Virusstock ein unabhängiges STAT3-modulierendes Prinzip enthält. Um dies formal auszuschließen und die MCMV-Spezifität der STAT3-Modulation endgültig nachzuweisen, könnte ein Neutralisationsexperiment mit spezifischen, MCMV-neutralisierenden Antikörpern durchgeführt werden.

Nebenbefundlich zeigte sich in den murinen embryonalen Fibroblasten eine relativ deutliche Basis-Phosphorylierung von STAT3. Die Basis-Phosphorylierung von STAT3 in mock-Zellen ist je nach Zelltyp unterschiedlich stark und hängt u.a. auch von dem verwendeten Medium bzw. den darin enthaltenen Wachstumsfaktoren ab, was auch in den folgenden Experimenten zu beobachten ist.

Außerdem wurde festgestellt, dass sich Y705-Phosphorylierung und Reduktion von STAT3 zeitlich differenzieren lassen; es kommt initial zu einer Phosphorylierung und verzögert zu einer Reduktion, sodass man einen Tag nach Infektion trotz eindeutiger Y705-Phosphorylierung von STAT3 keine Reduktion des STAT3-Signals detektiert (Abb. 4B). Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der Gesamtmenge von STAT3 keine unmittelbare und sofortige Folge der Phosphorylierung ist. Zudem schließt dieser Befund aus, dass es sich bei der beobachteten Reduktion des STAT3-Signals um eine durch Phosphorylierung bedingte

Ergebnisse

Maskierung handelt, da in der frühen Phase zwar die Phosphorylierung nachweisbar ist, die Reduktion jedoch nicht.



2.1.5. STAT3-Phosphorylierung und –Reduktion ist abhängig von viraler Genexpression

Im Rahmen einer Infektion kann es über viele verschiedene, voneinander unabhängige Rezeptoren und Signalkaskaden zu einer Y705-Phosphorylierung bzw. Aktivierung von

Ergebnisse

STAT3 kommen (Heinrich et al., 1998; Ho und Ivashkiv, 2006; Regis et al., 2008). Es ist bekannt, dass es über Interaktionen von Proteinen der viralen Membranhülle mit zellulären Rezeptoren zu einer Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 oder Typ I IFN kommt. Beispielsweise werden Glykoprotein B (gB) und Glykoprotein H (gH) – beides Bestandteile der Membranhülle von HCMV – durch den zellulären, membranständigen Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) erkannt, der wiederum über Mediatoren wie MyD88 oder NF- κ B zu der Sekretion von Typ I IFN oder IL-6 führen und somit die Y705-Phosphorylierung von STAT3 auslösen kann (Boehme et al., 2006). Des Weiteren ist auch bekannt, dass der *platelet-derived growth factor- α receptor* (PDGFR- α) und möglicherweise auch der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) (s.o.) als Rezeptoren für die Infektion mit HCMV fungieren (Soroceanu et al., 2008). Da auch STAT3 in die Signalkaskade dieser Rezeptoren involviert ist (Vignais und Gilman, 1999), könnten hier Zusammenhänge zwischen der Aktivierung von STAT3 und viralen Membranhüllproteinen bestehen.

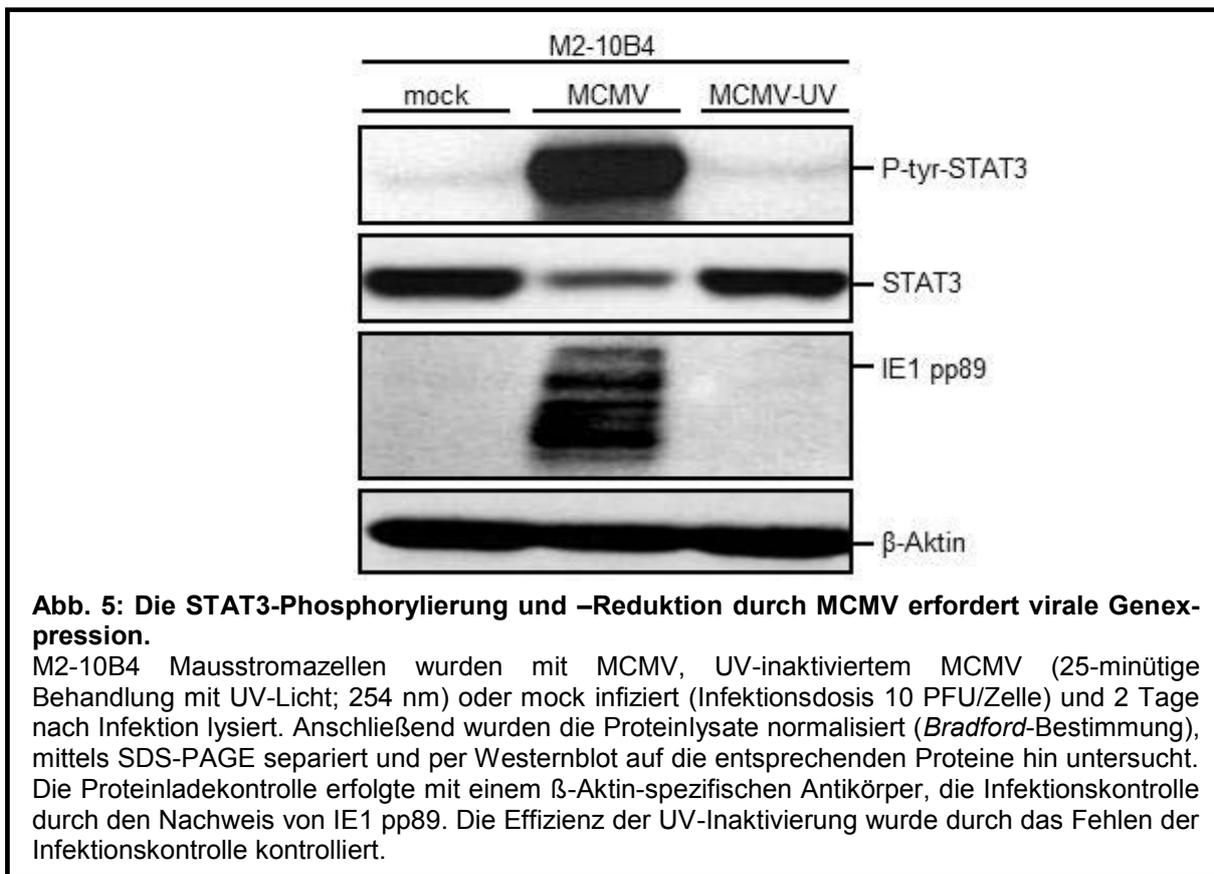
Somit war es denkbar, dass bereits der Kontakt der viralen Membranhülle über bestimmte Mediatoren zu einer Y705-Phosphorylierung von STAT3 führt, sodass die nachfolgende Infektion der Zelle bzw. die virale Genexpression für die erwähnte Modulation von STAT3 durch MCMV nicht essentiell wäre. Um dies zu untersuchen, wurde MCMV durch eine 25-minütige Behandlung mit UV-Licht (254 nm) inaktiviert. Dies bewirkt, dass die virale DNA durch die Induktion zahlreicher Genommutationen zerstört wird, sodass praktisch keine Genexpression mehr erfolgt und das Viruspartikel nicht mehr replikationskompetent ist. In der Folge wurden M2-10B4-Mausstromazellen mit unbehandeltem MCMV (Infektionsdosis 10 PFU/Zelle) und UV-inaktiviertem MCMV infiziert und 2 Tage nach Infektion Proteinlysate hergestellt (Abb. 5). Die Infektion mit den nicht-bestrahlten Viren führte wie erwartet zu einer Y705-Phosphorylierung von STAT3 und zu einer Reduktion der Gesamtmenge; in Zellen, die mit dem UV-inaktivierten Virus „infiziert“ wurden, blieben beide Effekte jedoch aus, die Ergebnisse ähnelten denjenigen der mock-infizierten Zellen.

Die oben gezeigten Experimente legen nahe, dass virale Genexpression für die beobachtete STAT3-Modulation essentiell ist und eine „Infektion“ mit UV-bestrahlten MCMV-*Virionen* dementsprechend nicht für den Effekt hinreichend ist.

Es kann jedoch trotzdem nicht ausgeschlossen werden, dass Proteine oder RNA-Moleküle, die im viralen Partikel enthalten sind, zur STAT3-Modulation beitragen. So wäre es beispielsweise durchaus mit unserem derzeitigen Modell (s. Diskussion) vereinbar, dass Proteine des Partikels eine transiente Y705-Phosphorylierung von STAT3 initiieren, diese

Ergebnisse

Phosphorylierung aber erst in Anwesenheit eines weiteren MCMV-kodierten Prinzips, welches Neosynthese bedarf, signifikant akkumuliert.



2.1.6. Fötale Kälberserum steigert die Y705-Phosphorylierung von STAT3 nach MCMV-Infektion, ist für diese aber nicht essentiell

Es ist bekannt, dass STAT3 auch in Prozesse des Zellwachstums und der -differenzierung entscheidend involviert ist (Levy und Lee, 2002). So ist STAT3 eine Komponente der Signaltransduktion von Zytokinen wie z.B. dem *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Vignais und Gilman, 1999), dem *epidermal growth factor* (EGF) (Zhong et al., 1994) oder dem *leukemia inhibitory factor* (LIF) (Boeuf et al., 1997). Aus diesem Grund war anzunehmen, dass die im fötalen Kälberserum (FKS) vorhandenen Wachstumsfaktoren eine Wirkung auf die MCMV-abhängige Y705-Phosphorylierung von STAT3 haben. Deshalb wurde die Beeinflussung der STAT3-Modulation durch MCMV durch das im Zellkulturmedium vorhandene FKS untersucht.

Ergebnisse

M2-10B4-Mausstromazellen wurden in 10% (v/v)-FKS-haltigem Medium kultiviert und mit MCMV (Infektionsdosis 10 PFU/Zelle) bzw. mock infiziert (Abb. 6A). 6 h nach Infektion wurde das Medium der Zellen ausgetauscht, sodass die Zellen anschließend in Medium mit der jeweils angegebenen FKS-Konzentration kultiviert wurden. 2 Tage nach Infektion wurden Proteinlysate hergestellt und diese per Westernblot untersucht. Dabei wurde eine eindeutige Abhängigkeit der STAT3-Phosphorylierung von der Konzentration an FKS festgestellt. Da die jeweils detektierte Menge an Y705-phosphoryliertem STAT3 mit steigender FKS-Konzentration zunahm, ist von einer verstärkenden Wirkung des FKS bzw. der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren auf die Phosphorylierung von STAT3 durch MCMV auszugehen. Interessanterweise führte die Steigerung der FKS-Konzentration auch zu einer Zunahme der Gesamtmenge an STAT3, und zwar sowohl in den MCMV-infizierten Zellen als auch in den mock-Zellen; dies ist damit zu erklären, dass es sich bei dem STAT3-Gen um ein autoregulatorisches, STAT3-responsives Gen handelt (Ichiba et al., 1998; Dauer et al., 2005) und somit ein Anstieg des Gehalts an aktiviertem, Y705-phosphoryliertem STAT3 auch zu einem Anstieg der Gesamtproteinmenge an STAT3 führt.

Um den oben erwähnten Effekt genauer zu charakterisieren und die Frage zu klären, ob FKS für die MCMV-induzierte Phosphorylierung von STAT3 essentiell ist oder nur eine verstärkende Wirkung auf diesen Effekt hat, wurden M2-10B4-Zellen für einen Tag in sogenanntem „Hungermedium“ – d. h. in Medium, welches kein FKS-enthält – kultiviert und darauffolgend mit MCMV (25 PFU/Zelle) infiziert oder für 30 min mit Hyper-IL-6 (10 ng/ml) behandelt (Abb. 6B). Zum Vergleich wurde dasselbe Prozedere auf Zellen angewandt, die in 10% (v/v)-FKS-haltigem Medium kultiviert worden waren. 2 Tage nach Infektion wurden Proteinlysate hergestellt und diese darauffolgend per Westernblot untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Y705-Phosphorylierung von STAT3 nach Infektion mit MCMV in den „gehungerten“ Zellen zwar schwächer ausgeprägt als in den in 10% FKS-haltigem Medium kultivierten Zellen war, trotzdem aber eindeutig zu erkennen war. Im Falle des Gesamtgehalts an STAT3 war erwartungsgemäß in beiden Ansätzen eine Reduktion nach MCMV-Infektion zu erkennen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass im FKS enthaltene Faktoren – vermutlich Zytokine oder Chemokine – eine verstärkende Wirkung auf die MCMV-induzierte Y705-Phosphorylierung von STAT3 haben, diese aber für diesen Effekt nicht von essentieller Bedeutung sind.

Ergebnisse

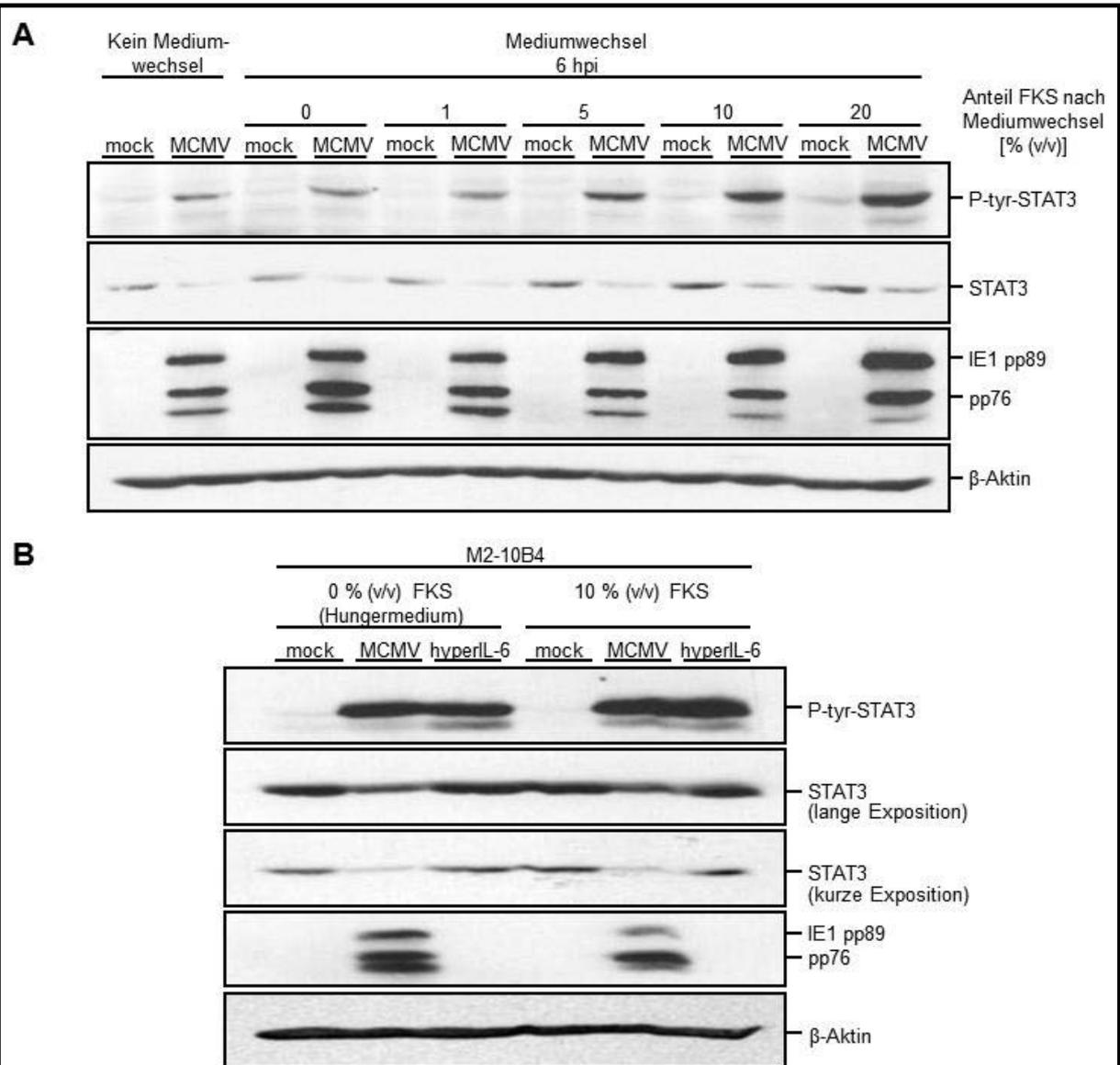


Abb. 6: Fötale Kälberserum steigert die Y705-Phosphorylierung von STAT3 nach MCMV-Infektion, ist für diese aber nicht essentiell.

(A) M2-10B4-Mausstromazellen wurden in 10% (v/v) FKS-haltigem Medium kultiviert und mit MCMV (Infektionsdosis 10 PFU/Zelle) resp. mock infiziert. Sechs Stunden nach Infektion erfolgte ein Mediumwechsel, sodass die Zellen in der Folge jeweils in Medium mit der angegebenen Konzentration an FKS kultiviert wurden. Insgesamt 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen dann lysiert; die Lysate wurden normalisiert (*Bradford*-Bestimmung), per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot auf die angegebenen Proteine hin untersucht. Die Infektion wurde mit einem IE1 pp89-spezifischen Antikörper kontrolliert, die Proteinmenge mit einem β-Aktin-spezifischen Antikörper.

(B) M2-10B4-Zellen wurden für einen Tag mit serumfreiem Medium (0% (v/v) Fötale Kälberserum) oder mit 10% (v/v) FKS-haltigem Medium behandelt. Die Zellen wurden jeweils mit MCMV (Infektionsdosis 25 PFU/Zelle) resp. mock infiziert und 2 Tage nach Infektion lysiert. Parallel wurden Zellen für 30 min mit Hyper-IL-6 (10 ng/ml) behandelt und zeitgleich lysiert. Die Proteinlysate wurden normalisiert (*Bradford*-Bestimmung), per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot auf die angegebenen Proteine hin untersucht.

2.1.7. Phosphorylierung von STAT3 betrifft beide Isoformen (STAT3 α und STAT3 β)

Es wurde beschrieben, dass mindestens zwei unterschiedliche Isoformen von STAT3 existieren, die durch alternative Spleißvorgänge aus einem Primärtranskript entstehen; dabei sind für diese Arbeit v. a. STAT3 α und STAT3 β von Bedeutung (Näheres s. Einleitung). Während STAT3 α (89 kDa) für gewöhnlich als „full-length“ STAT3 bezeichnet wird, ist STAT3 β (80 kDa) dadurch gekennzeichnet, dass ihm die 55 C-terminalen Aminosäuren (inkl. der Ser727-Phosphorylierungsstelle) der Transaktivierungsdomäne fehlen, es dafür aber über ein STAT3 β -spezifisches, 7 Aminosäuren umfassendes C-terminales Ende verfügt. Grund für diese Verkürzung ist ein alternativer Spleißvorgang mit anschließendem *frameshift*, der zu der Entstehung eines Stopp-Codons führt (s. Abb. 7A) (Schaefer et al., 1995).

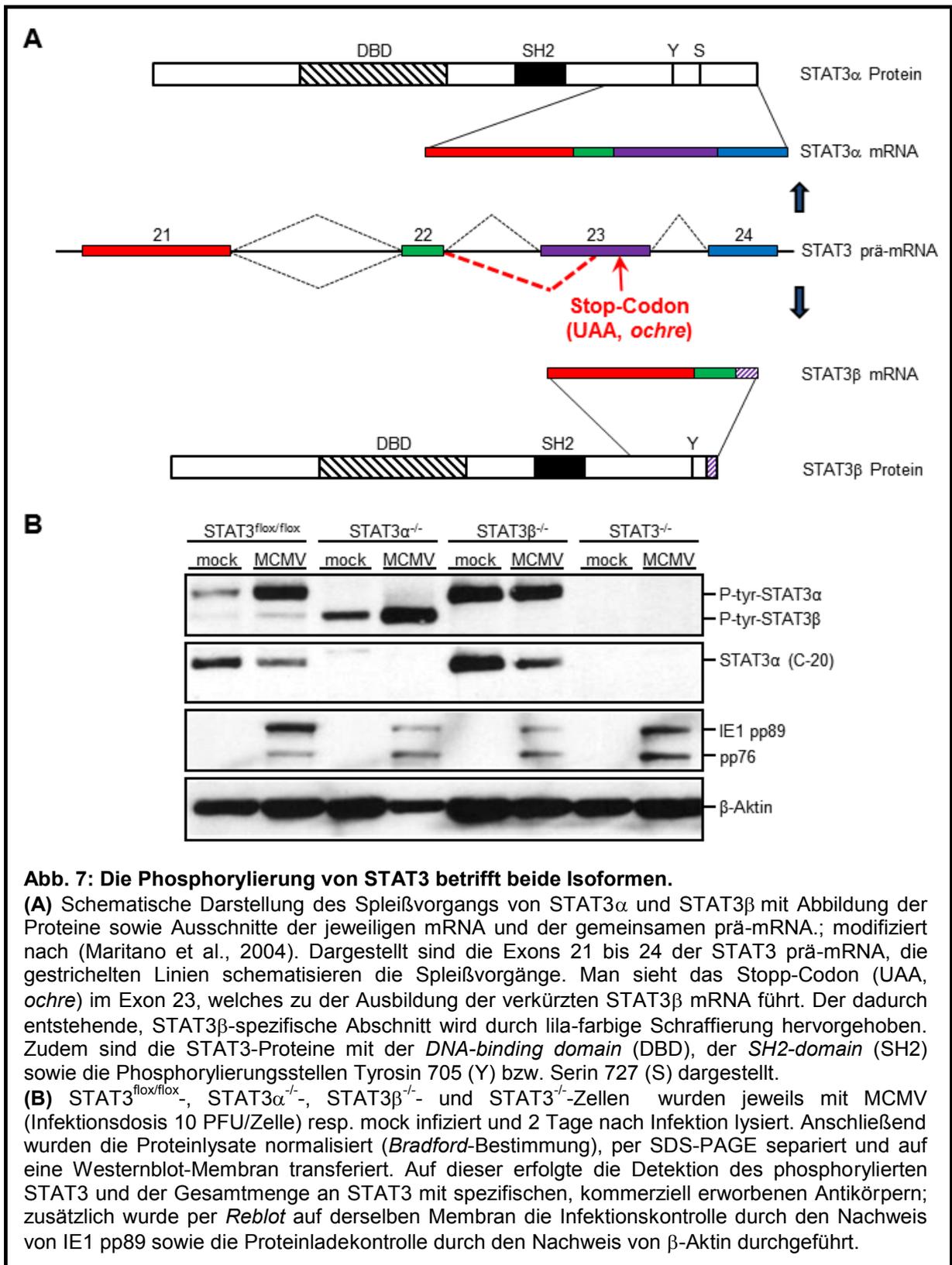
In der Vergangenheit wurde STAT3 β als eine dominant-negative STAT3-Isoform angesehen, was mit der Verkürzung der Transaktivierungsdomäne und dem Fehlen der Ser727-Phosphorylierungsstelle begründet wurde (Caldenhoven et al., 1996). Es wurde aber gezeigt, dass STAT3 β die embryonale Letalität von STAT3-defizienten Mäusen kompensieren kann, sodass die Auffassung von STAT3 β als einer dominant-negativen STAT3-Isoform in den letzten Jahren weitgehend revidiert wurde. Heute wird davon ausgegangen, dass STAT3 α und STAT3 β neben überlappenden jeweils auch über exklusive Funktionen verfügen (s. Einleitung) (Maritano et al., 2004).

Es wurde deshalb untersucht, welche der beiden STAT3-Isoformen von der MCMV-induzierten Y705-Phosphorylierung betroffen ist bzw. ob eventuell sogar beide Isoformen verstärkt phosphoryliert werden. Dazu wurden immortalisierte STAT3^{flox/flox}-, STAT3 α -defiziente-, STAT3 β -defiziente- und STAT3^{-/-}-Fibroblasten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Valeria Poli, Institut für Genetik, Biologie und Biochemie, Universität Turin, Italien; vorgestellt in (Maritano et al., 2004)) mit MCMV infiziert (Infektionsdosis 10 PFU/Zelle); 2 Tage nach Infektion wurden von diesen Zellen Proteinlysate hergestellt. Per Westernblot wurde die Menge des Y705-phosphorylierten STAT3 sowie die Gesamtmenge an STAT3 detektiert (Abb. 7B). In den STAT3^{flox/flox}-Zellen, die Vergleichs-Fibroblasten darstellen, ließ sich wie erwartet der bereits beschriebene Befund reproduzieren, sodass eine MCMV-induzierte Phosphorylierung von STAT3 und eine Abnahme der Gesamtmenge an STAT3 detektiert wurde; wegen der Größe des Proteins muss es sich dabei um die α -Isoform des STAT3 handeln. In den STAT3 α -defizienten Zellen wurde eine kleinere STAT3-Form – STAT3 β – phosphoryliert. Interessanterweise ist auch in den STAT3^{flox/flox}-Zellen eine –

Ergebnisse

allerdings deutlich schwächere – Bande mit derselben Größe zu erkennen, die auch eine verstärkte Phosphorylierung nach Infektion aufweist. Somit induziert MCMV die Phosphorylierung beider STAT3-Isoformen, wobei STAT3 β bei Fehlen von STAT3 α stärker von der Phosphorylierung betroffen ist als in der Vergleichszelle. Aus diesem Grund ist ein Kompetitieren von STAT3 α und STAT3 β um das MCMV-induzierte, phosphorylierende Prinzip denkbar. Zudem ist mit diesem Experiment gezeigt, dass die Ser727-Phosphorylierung und die Transaktivierungsdomäne von STAT3 für die MCMV-abhängige Y705-Phosphorylierung nicht essentiell sind, da diese Abschnitte in der β -Isoform von STAT3 nicht vorhanden sind.

Im Fall der STAT3 β -defizienten Zellen ändert sich der Befund insofern, dass STAT3 α schon in den mock-infizierten Zellen deutlich phosphoryliert ist und nach Infektion keine zusätzliche Phosphorylierung mehr beobachtet wird. Unter Berücksichtigung dieses Befundes ist es denkbar, dass die Phosphorylierung von STAT3 α durch STAT3 β negativ beeinflusst wird, sodass STAT3 α in Abwesenheit von STAT3 β konstitutiv phosphoryliert ist. Es ist allerdings auch bekannt, dass STAT3 an der Onkogenese vieler Tumore beteiligt ist und konstitutiv aktiviertes STAT3 bei einer Vielzahl von humanen Karzinomen nachgewiesen werden kann (Yu und Jove, 2004) – beispielsweise in Zellen des malignen Melanoms (Niu et al., 2002a), des Mammakarzinoms (Garcia et al., 2001) und des Prostatakarzinoms (Ni et al., 2000). Da es sich bei den hier untersuchten immortalisierten Zelllinien auch um autonom und unkontrolliert wachsende Zellen handelt, ist nicht auszuschließen, dass es sich bei diesem Befund um einen im Zuge der Immortalisierung generierten Effekt handelt. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, könnte man ein Komplementationsexperiment durchführen, bei dem man STAT3 β in die STAT3 β -defizienten Zellen transfiziert; sollte die beobachtete konstitutive Phosphorylierung von STAT3 α durch das Fehlen von STAT3 β bedingt sein, würde sich dieser Effekt durch die Komplementation von STAT3 β wieder aufheben lassen.



2.1.8. IL-6, IL-10 und Jak2 sind nicht essentiell für die Modulation von STAT3 durch MCMV

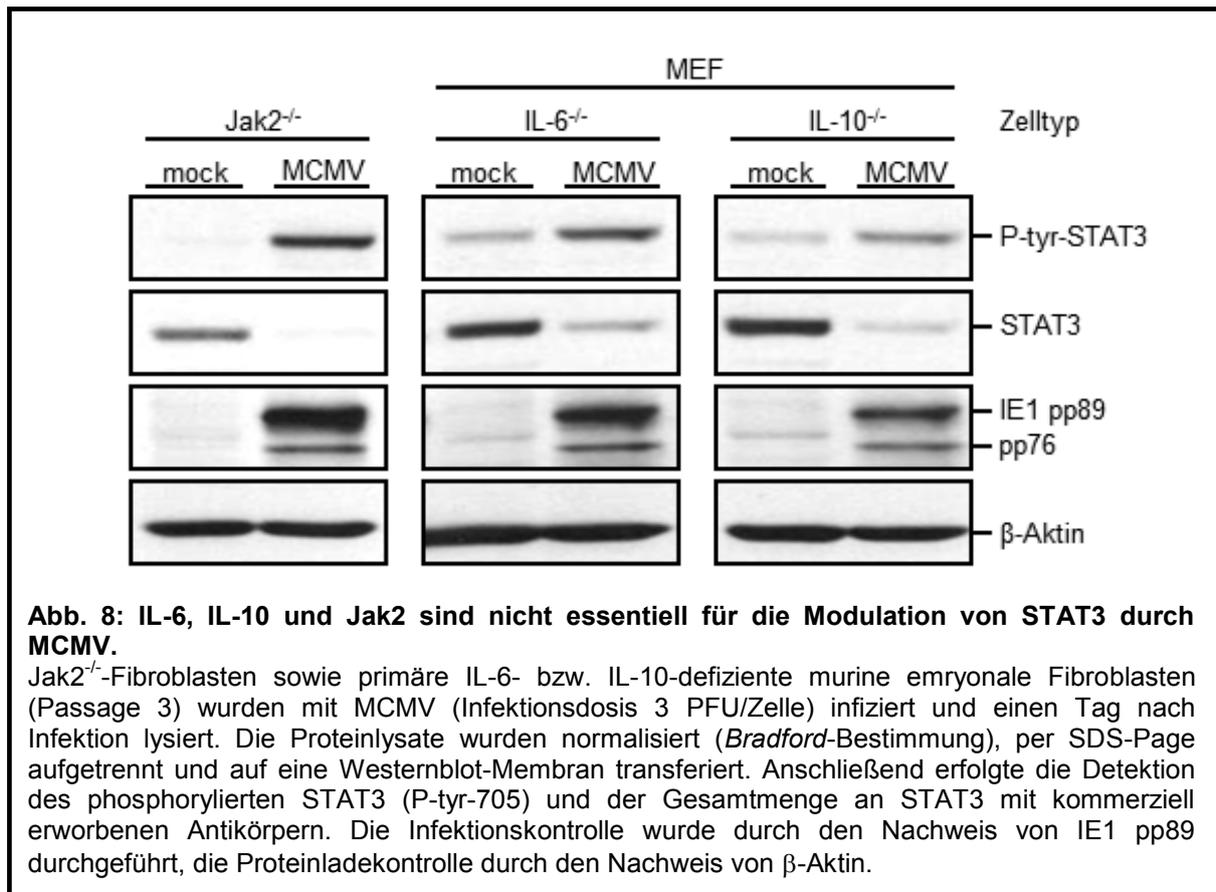
In der Folge wurde die Rolle bestimmter Zytokine und Mediatoren der Signaltransduktion für die Modulation von STAT3 durch MCMV genauer untersucht. Hierbei waren insbesondere die beiden STAT3-aktivierenden Interleukine IL-6 und IL-10 von Bedeutung.

IL-6 ist ein Akut-Phase-Protein, welches inflammatorische Reaktionen beeinflusst und im Rahmen viraler Infektionen verstärkt sezerniert wird (Heinrich et al., 1990; Harker et al., 2011), so auch im Zuge von Infektionen mit HCMV (Lagneaux et al., 1996). IL-10 gilt als immunregulatorisch bzw. vorzugsweise anti-inflammatorisch wirksames Zytokin, dass gerade wegen dieser Eigenschaften ein häufiges Ziel viraler Immunmodulation darstellt (Moore et al., 2001). Beispielsweise exprimiert HCMV ein homologes IL-10 Protein (cmvIL-10) (Kotenko et al., 2000; Raftery et al., 2004; Spencer, 2007) und auch für das Epstein-Barr Virus (HHV-4) ist ein entsprechendes homologes Protein bekannt (ebvIL-10) (Moore et al., 1990). Außerdem wurde beschrieben, dass es in Folge von viralen Infektionen (z.B. mit MCMV) zu einer Induktion des zellulären IL-10 kommt (Redpath et al., 1999). Beiden Interleukinen ist gemeinsam, dass sie eine starke STAT3-Phosphorylierung auslösen, um die Transkription zu modulieren.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der MCMV-induzierten STAT3-Modulation um einen durch Sekretion von IL-6 bzw. IL-10 hervorgerufenen Effekt handelt, wurden IL-6- bzw. IL-10-defiziente primäre murine embryonale Fibroblasten untersucht (Abb. 8). Zusätzlich wurden Jak2-defiziente Zellen in das Experiment aufgenommen, da Jak2 bei der Signaltransduktion von IFN- γ (Kotenko et al., 1995; Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998) eine essentielle Rolle spielt. Die Zellen wurden mit MCMV infiziert (Infektionsdosis 3 PFU/Zelle) und ein Tag nach Infektion erfolgte die Herstellung der Proteinlysate. In der Folge wurde die Y705-Phosphorylierung von STAT3 und der Gesamtgehalt an STAT3 per Westernblot untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass sowohl Y705-Phosphorylierung als auch STAT3-Reduktion in allen drei Zelltypen unverändert nachweisbar sind.

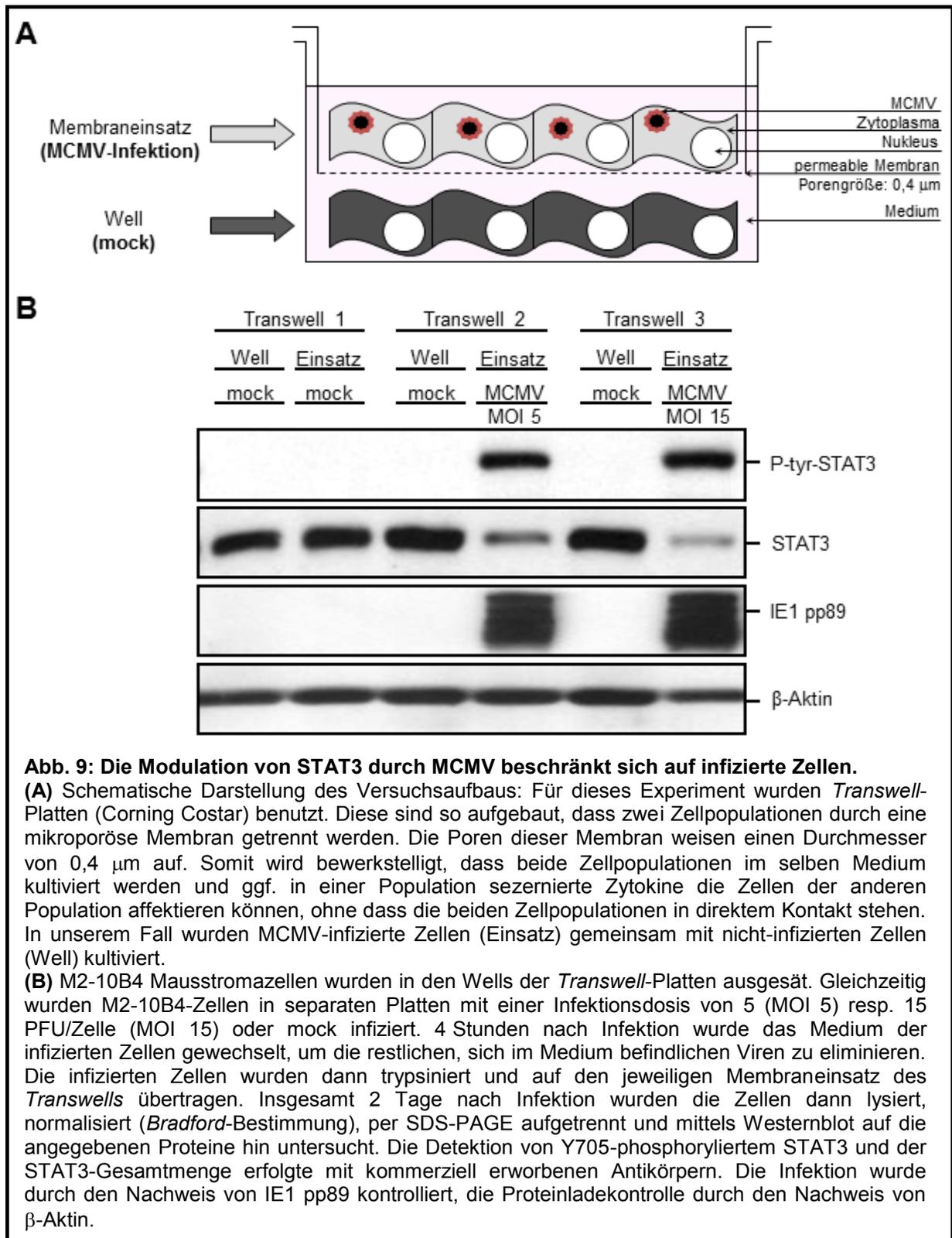
Somit sind weder die Sekretion von IL-6 oder IL-10 noch die Anwesenheit von Jak2 für die MCMV-induzierten STAT3-Phosphorylierung und Reduktion essentiell. Es kann mit diesem Experiment jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass IL-6 und IL-10 beide gemeinsam für die Y705-Phosphorylierung von STAT3 verantwortlich sind und das jeweils verbleibende Interleukin hinreichend ist.

Um dies zu untersuchen, wurden Transwell- und Mediumtransfer-Experimente durchgeführt.



2.1.9. Die Modulation von STAT3 durch MCMV beschränkt sich auf infizierte Zellen

Abgesehen von IL-6 und IL-10 wird STAT3 auch durch viele weitere lösliche Zytokine aktiviert (z. B. IFN- γ , EGF, LIF). Aus diesem Grund bestand die Möglichkeit, dass die durch MCMV hervorgerufenen Effekte durch ein nach Infektion sezerniertes Zytokin hervorgerufen werden; in diesem Fall wäre zu erwarten, dass sich die Y705-Phosphorylierung von STAT3 bzw. die Reduktion des Gesamtgehalts an STAT3 nicht nur in infizierten, sondern auch in uninfizierten Nachbarzellen vorzufinden wäre. Im nächstfolgenden Experiment sollte dieser Sachverhalt untersucht werden.



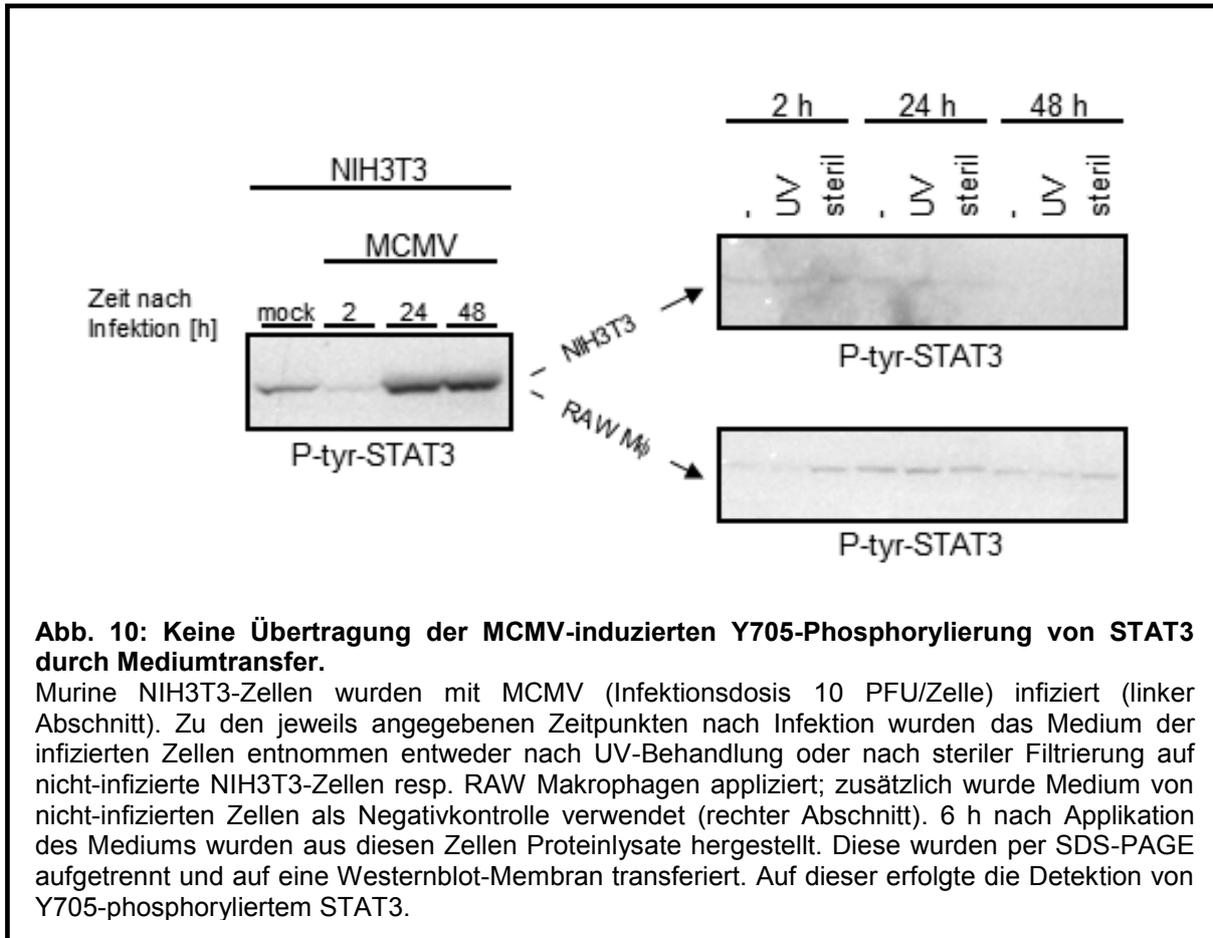
Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 9A dargestellt: Die für dieses Experiment verwendeten *Transwell*-Platten sind so aufgebaut, dass sie aus zwei unterschiedlichen Kompartimenten bestehen (*Well* und Membraneinsatz). In beide Kompartimente werden Zellen ausgesät; diese beiden Zellpopulationen haben keinen direkten Zellkontakt, werden

Ergebnisse

aber trotzdem im selben Medium kultiviert, sodass die evtl. von einer Zellpopulation sezernierten Zytokine die Zellen des anderen Kompartiments affektieren. In dem hier vorgestellten Experiment (Abb. 9B) handelte es sich bei den Zellen im Membraneinsatz um MCMV-infizierte Zellen (Infektionsdosis 5 resp. 15 PFU/Zelle), während die Zellen im *Well* uninfiziert waren; dieser Sachverhalt wurde mit Hilfe von IE1 pp89-spezifische Antikörpern kontrolliert. 2 Tage nach Infektion wurden Proteinlysate hergestellt und diese mittels Westernblot auf den Gehalt an Y705-phosphoryliertem STAT3 sowie den Gesamtgehalt an STAT3 untersucht. Dabei wurden beide MCMV-induzierten Effekte – sowohl Phosphorylierung als auch Reduktion – nur in den infizierten Zellen (d. h. in den Zellen im Membraneinsatz) reproduziert, während die mock-infizierten *bystander*-Zellen keinerlei Veränderung aufzeigten.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde ein Mediumtransfer-Experiment durchgeführt, bei dem das Medium infizierter Zellen auf nicht-infizierte Zellen appliziert wird, um zu untersuchen, ob im Überstand befindliche Substanzen (z.B. Zytokine) dieselben Effekte auf nicht-infizierten Zellen auslösen können (Abb. 10).

In diesem Fall wurden permissive NIH3T3-Fibroblasten mit MCMV infiziert (Infektionsdosis 10 PFU/ml). Zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde das Medium der infizierten Zellen entnommen und dieses dann – entweder nach UV-Bestrahlung oder nach steriler Filtrierung – auf nicht-infizierte NIH3T3-Zellen oder RAW Makrophagen appliziert; zusätzlich wurde Medium von nicht-infizierten Zellen als Negativkontrolle verwendet. 6 h nach Applikation des Mediums wurden aus diesen Zellen Proteinlysate hergestellt und diese per Westernblot auf ihren Gehalt an Y705-phosphoryliertem STAT3 untersucht. Dabei kann festgestellt werden, dass das transferierte Medium keinen Effekt in Bezug auf die Y705-Phosphorylierung von STAT3 hat – weder mit noch ohne Behandlung mit UV-Licht. Das STAT3-phosphorylierende Prinzip kann nicht mit dem Medium auf nicht-infizierte Zellen übertragen werden.



Die direkte Infektion der Zellen mit MCMV ist somit eine essentielle Voraussetzung für die hier beschriebene Modulation von STAT3, auch wenn eine verstärkende Wirkung von Zytokinen – beispielsweise über ein strikt autokrin wirkendes oder membrangebundenes Zytokin – auf die beschriebenen Effekte weiterhin formal nicht auszuschließen ist.

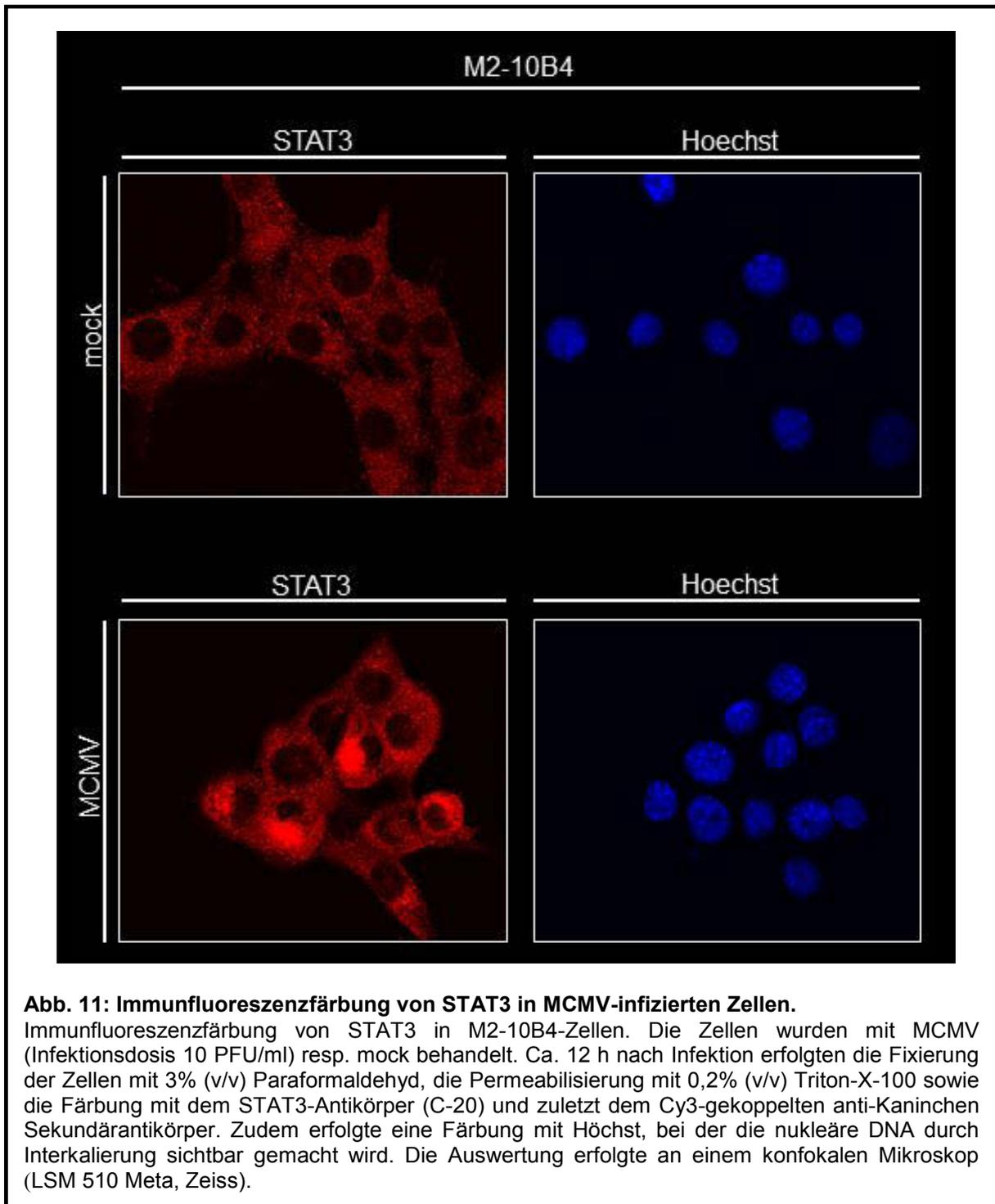
2.2. Inhibition der STAT3-abhängigen Genexpression durch MCMV

2.2.1. Nukleäre Translokation von STAT3 in der Immunfluoreszenzfärbung

Im Rahmen des Jak-STAT-Signalwegs kommt es in Folge der Phosphorylierung bzw. Aktivierung von STAT3 zu einer antiparallelen Dimerisierung der phosphorylierten Proteine und anschließend einer Translokation in den Nukleus, damit das STAT3-Dimer an die jeweilige DNA-Bindungssequenz binden und somit die Transkription bestimmter Zielgene induzieren kann (Murray, 2007). Somit stellte sich die Frage, ob der durch MCMV-Infektion

Ergebnisse

bewirkten Y705-Phosphorylierung von STAT3 eine Translokation der STAT3-Dimere in den Zellkern folgt.



Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt (Abb. 11). Dabei wurden M2-10B4-Mausstromazellen mit MCMV (Infektionsdosis 10 PFU/ml) resp. mock infiziert. 12 h nach Infektion erfolgte die Färbung mit einem STAT3-spezifischen Antikörper (genaues

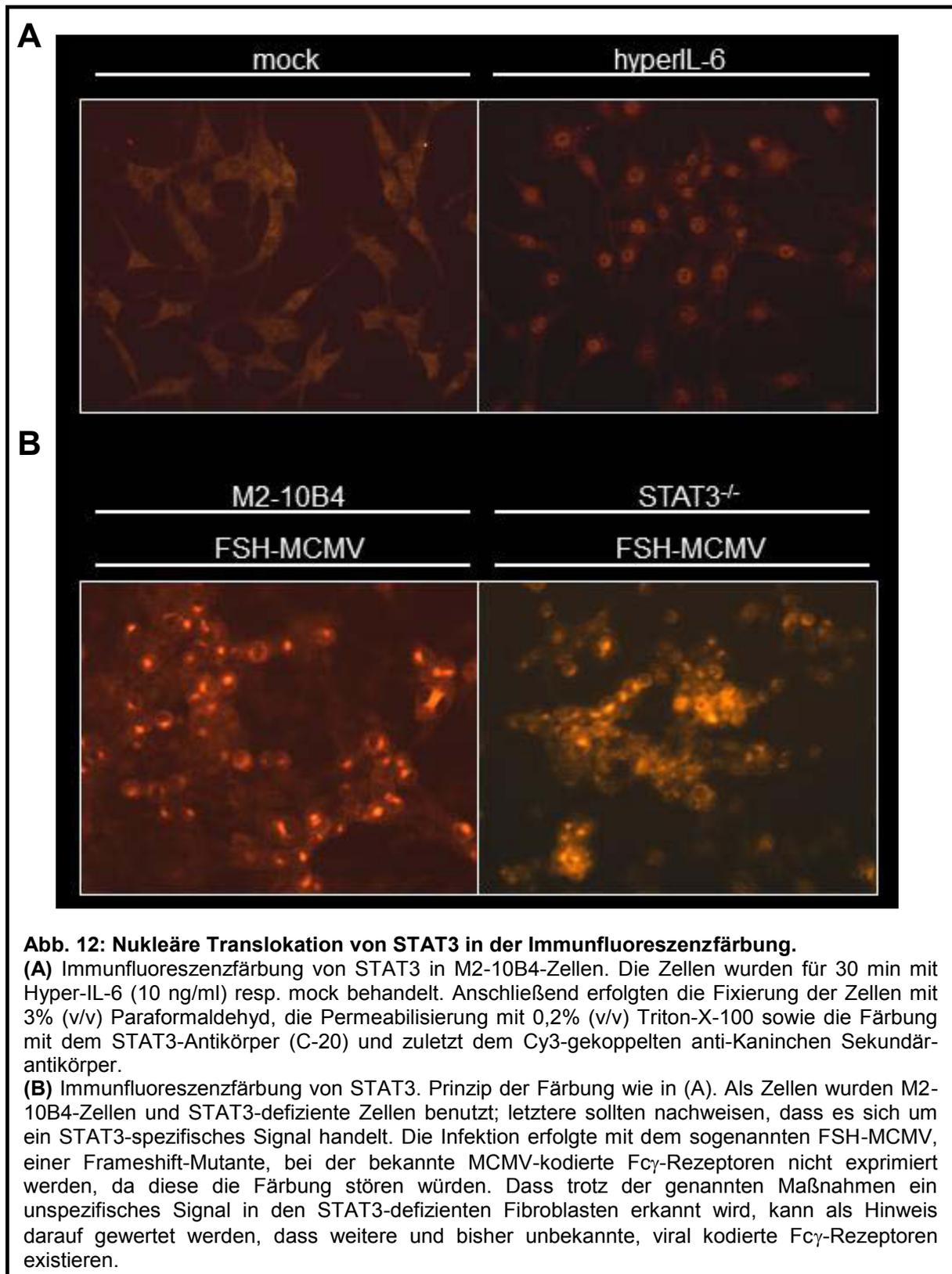
Ergebnisse

Prozedere s. Material und Methoden). Dabei ist zu erkennen, dass STAT3 in den mock-infizierten Zellen ubiquitär vorhanden ist, der Kern aber bei der Färbung nur sehr schwach angefärbt wird. Nach Infektion mit MCMV zeigt sich ein perinukleäres Signal, das auf eine Färbung des Golgi-Apparats hindeutet; der Zellkern ist weiterhin nur schwach angefärbt.

MCMV kodiert bekanntermaßen für den Fc γ -Rezeptor fcr-1/m138 (Thale et al., 1994). Dabei handelt es sich um einen Rezeptor, der den Fc-Teil von IgG-Antikörpern bindet, um möglicherweise spezifische, antikörpervermittelte Reaktionen des Immunsystems auf die virale Infektion – wie beispielsweise der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC*) – zu unterbinden (Budt et al., 2004). Da virus-kodierte Fc γ -Rezeptoren unspezifisch an Antikörper binden und damit zu einem starken, unspezifischen Signal führen, ist es denkbar, dass das in der Immunfluoreszenzmikroskopie generierte Signal durch diese Rezeptoren hervorgerufen wird.

Aus diesem Grund wurden die M2-10B4-Zellen in einem zweiten Experiment mit dem sogenannten FSH-m138-MCMV infiziert, einer *frameshift*-Mutante, bei der der einzige bekannte, MCMV-kodierte Fc γ -Rezeptor (fcr-1/m138) mutiert ist. Zusätzlich wurden STAT3-defiziente Zellen infiziert, um zu kontrollieren, ob es sich bei der Färbung um ein spezifisches Signal handelt.

Bei diesem Experiment wurde in einem ersten Schritt (Abb. 12A) STAT3 in unbehandelten und Hyper-IL-6-behandelten (30 min, 10 ng/ml) M2-10B4 Zellen angefärbt; dabei fungiert Hyper-IL-6 als Positivkontrolle der STAT3-Aktivierung und -Translokation. Es ist auch in diesem Fall zu erkennen, dass STAT3 in den unbehandelten Zellen ubiquitär in der Zelle vorhanden ist, der Kern aber schwächer gefärbt ist. Nach der Inkubation von Hyper-IL-6 kehrt sich dieses Verhältnis um, sodass STAT3 zwar weiterhin auch im Zytoplasma vorzufinden ist, hauptsächlich aber in den Kern transloziert ist.



Im nächsten Schritt (Abb. 12B) galt es, die Lokation von STAT3 nach MCMV-Infektion zu untersuchen. Das nach Infektion mit FSH-m138-MCMV erhaltene Signal zeigt erneut eine perinukleäre Färbung, die auf eine Färbung des Golgi-Apparats hindeuten könnte. Da dieses Signal auch in den STAT3-defizienten Zellen generiert wird, muss es sich um ein

unspezifisches Signal handeln, sodass aus diesem Experiment leider keine Rückschlüsse auf die STAT3-Translokation nach MCMV-Infektion gezogen werden können. Ein solches Experiment könnte in Zukunft möglicherweise mit Hilfe einer Blockierung der Fc-Rezeptoren durchgeführt werden. Der erwähnte Sachverhalt kann aber als deutlicher Hinweis darauf gedeutet werden, dass – abgesehen von dem bekannten Rezeptor fcr-1/m138 – zusätzlich weitere, MCMV-kodierte Fc γ -Rezeptoren existieren. Die Identifikation dieser Proteine bzw. Gene stellt derzeit ein Augenmerk der Arbeitsgruppe dar.

2.2.2. Nukleäre Translokation von STAT3 in fraktionierten Zelllysaten

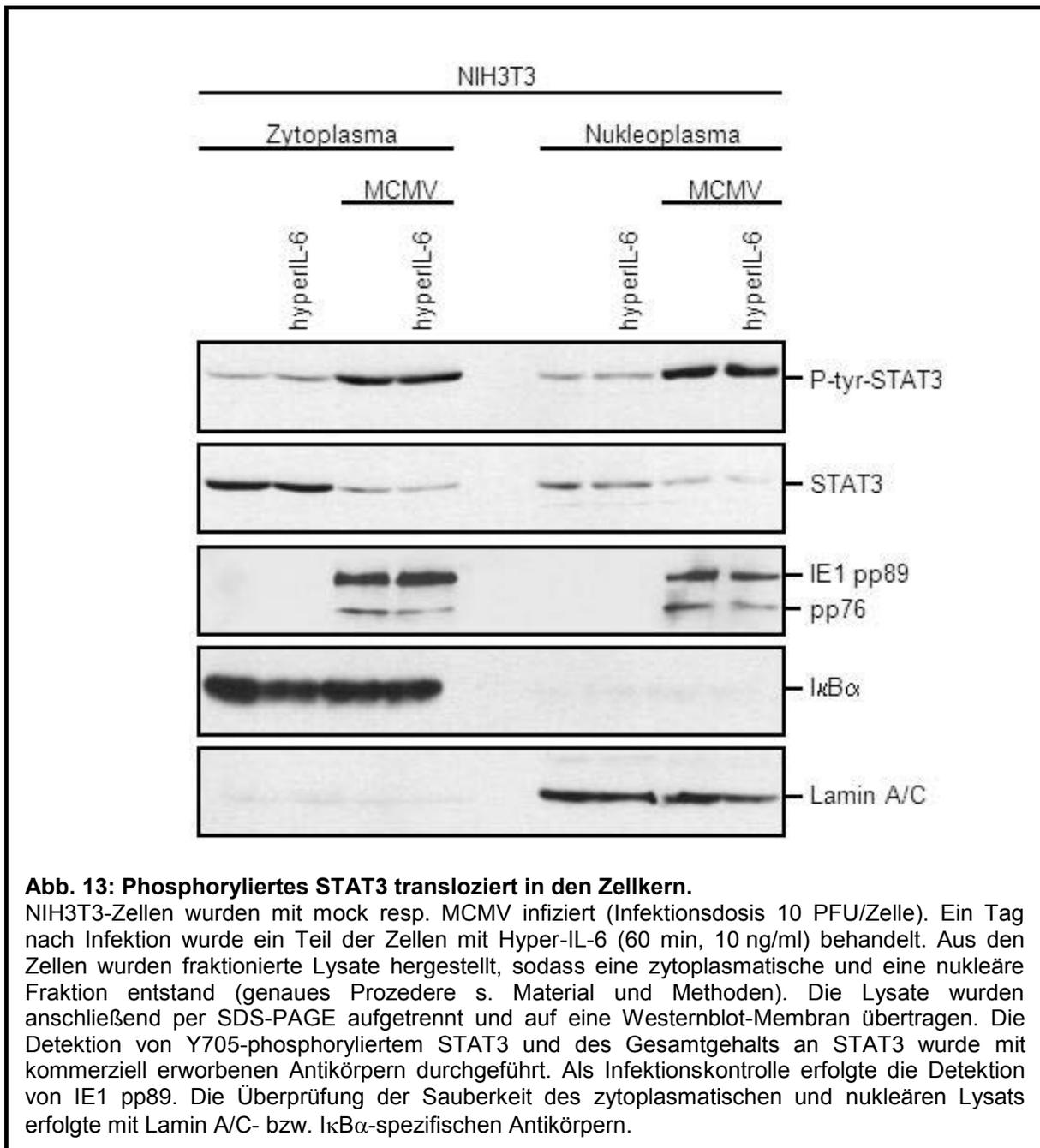
Wegen der MCMV-kodierten Fc γ -Rezeptoren war es in dem oben gezeigten Experiment nicht möglich, eine potentielle nukleäre Translokation des nach Infektion phosphorylierten STAT3 mittels Immunfluoreszenzfärbung nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde ein alternatives Verfahren für die Beantwortung dieser Frage herangezogen; es erfolgte die Herstellung von fraktionierten Zelllysaten, in deren Ergebnis eine zytoplasmatische und nukleoplasmatische Fraktion generiert wurde.

Dabei wurden NIH3T3-Zellen mit MCMV infiziert (Infektionsdosis 10 PFU/Zelle). Ein Tag nach Infektion wurde ein Teil der Zellen mit Hyper-IL-6 (60 min, 20 ng/ml) behandelt. In der Folge erfolgte die Herstellung der fraktionierten Lysate, die dann per Westernblot auf die entsprechenden Proteine hin untersucht wurden (Abb. 13).

In der zytoplasmatischen Fraktion zeigte sich wie erwartet die bereits beschriebene Modulation von STAT3 durch MCMV im Sinne einer Induktion der Y705-Phosphorylierung sowie einer Reduktion des Gesamtgehalts an STAT3. Interessanterweise konnten diese Effekte auch in dem nukleoplasmatischen Lysat beobachtet werden, sodass auch im Nukleus die Menge an Y705-phosphorylierten STAT3 nach MCMV-Infektion zunimmt, während der Gesamtgehalt an STAT3 abnimmt. Die durchgeführten Kontrollen (nukleäres Lamin A/C bzw. zytoplasmatisches I κ B α) beweisen die Sauberkeit der jeweiligen Fraktion.

Die Behandlung der Zellen mit hyperIL-6 führte in diesem Experiment nicht zu der bisher beobachteten Zunahme der Y705-Phosphorylierung von STAT3. Dies ist vermutlich damit zu begründen, dass der Effekt der Behandlung mit hyperIL-6 aufgrund der langen Behandlungsdauer bereits beendet ist.

Die Zunahme der Menge an Y705-phosphoryliertem STAT3 im Nukleus beweist, dass das phosphorylierte STAT3 nach Infektion mit MCMV in den Nukleus transloziert.



2.2.3. Inhibition der IL-6-induzierten Genexpression durch MCMV

Bisher wurde gezeigt, dass STAT3 nach Infektion der Zelle mit MCMV Y705-phosphoryliert wird und in den Zellkern transloziert; zudem wurde durch Experimente in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass dimerisiertes STAT3 in infizierten Zellen an DNA binden kann (Dr. Mirko Trilling, unveröffentlichte Daten). In der Folge war es von Interesse, ob dieses phosphorylierte STAT3 nun – als Konsequenz der erwähnten Vorgänge – die Transkription bekannter STAT3-Zielgene induziert. In diesem Fall erfolgte der Nachweis der

Ergebnisse

STAT3-Zielgene IRF-1 und SOCS3 (Dauer et al., 2005). Bei SOCS3 handelt es sich um ein Protein, das die negative Rückkopplung der STAT3-Signaltransduktion reguliert.

Zu diesem Zweck führten wir ein *Pulse-Chase*-Experiment durch, dessen schematischer Aufbau in Abbildung 14A dargestellt ist. Primäre murine embryonale Fibroblasten wurden in der dritten Passage mit MCMV (Infektionsdosis 5 PFU/Zelle) bzw. mock infiziert. Einen Tag nach Infektion wurden die Zellen dann mit Hyper-IL-6 (25 ng/ml) behandelt (*pulse*) und die Zellen dann nach einer Inkubationszeit von 30 min gründlich gewaschen, damit das Zytokin entfernt wird. Anschließend erfolgte der sogenannte *chase*, d. h., dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Waschvorgang Proteinlysate angefertigt wurden, um die durch die Behandlung mit Hyper-IL-6 in der Zelle erfolgten Veränderungen sowie deren Verlauf zu untersuchen. Bei diesem Experiment wurden die Proteinlysate direkt nach dem *pulse* sowie 30 min und 2 h nach Beendigung des *pulse* hergestellt. Die Proteinlysate wurden im Folgenden auf ihren Gehalt an Y705-phosphoryliertem STAT3 sowie ihren Gesamtgehalt an STAT3 untersucht (Abb. 14B). Zusätzlich erfolgte der Nachweis der bekannten STAT3- bzw. IL-6-Zielgene IRF-1 und SOCS3 (Dauer et al., 2005); dabei eignet sich SOCS3 besonders für die Durchführung eines solchen *Pulse-Chase*-Experiments, da dieses Protein nur bei entsprechendem Stimulus transient exprimiert wird und es eine kurze Halbwertszeit besitzt (Siewert et al., 1999). Weil sich die Detektion von SOCS3 im Westernblot als schwierig erwies, wurden für den Nachweis zwei unterschiedliche Antikörper verwendet.

Ergebnisse

(Spur 2). Nach 30-minütiger Behandlung mit Hyper-IL-6 (*pulse*) war die STAT3-Phosphorylierung sowohl in mock- als auch in MCMV-infizierten Zellen deutlich zu erkennen (Spuren 3 und 4). In der Folgezeit (*chase*) nahm der Gehalt an phosphoryliertem STAT3 in den mock-infizierten Zellen wieder ab, während die MCMV-infizierten Zellen weiterhin eine deutliche STAT3-Phosphorylierung aufwiesen. Etwa 2 h nach Behandlung mit Hyper-IL-6 war in den MCMV-infizierten Proteinlysaten noch eine deutliche Bande für Y705-phosphoryliertes STAT3 zu erkennen (Spur 8), während die Phosphorylierung in den mock-infizierten Zellen bereits kaum mehr sichtbar ist (Spur 7). Somit kann zu vergleichbaren Zeitpunkten nach Behandlung mit HyperIL-6 in den MCMV-infizierten Zellen deutlich mehr Y705-phosphoryliertes STAT3 nachgewiesen werden als in den mock-infizierten Zellen.

Dabei stellt sich die Frage, ob diese scheinbar verstärkte Aktivierung von STAT3 in der Folge auch einen Anstieg der Transkription zellulärer STAT3-Zielgene zur Folge hat. Da es sich bei STAT3 um ein autoregulatorisches Protein, das die Transkription des eigenen Gens im Sinne einer positiven Rückkopplung (*positive feedback*) induziert, war der STAT3-Gesamtproteingehalt nach Infektion von Bedeutung. Dabei fällt wie schon in den zuvor durchgeführten Experimenten auf, dass sich die Gesamtmenge an STAT3 nach Infektion trotz erhöhter Menge an Y705-phosphoryliertem und scheinbar aktiviertem STAT3 reduziert. Ähnlich verhält es sich auch bei den bekannten STAT3-Zielgenen SOCS3 und IRF-1: In den mock-Zellen steigt die Proteinmenge beider Proteine nach Behandlung mit Hyper-IL-6 an (Spur 5); bei Betrachtung von Spur 6 stellt man aber fest, dass es trotz deutlich größerer Menge an Y705-phosphoryliertem und scheinbar aktiviertem STAT3 zu keiner oder nur zu einer vergleichsweise schwachen Induktion von SOCS3 und IRF-1 kommt.

Ein ähnlicher Befund konnte in einem zweiten Experiment mit vergleichbarem Versuchsaufbau erhoben werden (Abb. 15). Dabei wurden primäre murine embryonale Fibroblasten in der dritten Passage mit MCMV (Infektionsdosis 10 PFU/Zelle) resp. mock infiziert. Einen Tag nach Infektion wurden diese Zellen für 30 min mit Hyper-IL-6 (10 ng/ml) behandelt und anschließend mehrfach gewaschen, um das Hyper-IL-6 zu entfernen. 30 min nach dem Waschvorgang erfolgte die Herstellung der Proteinlysate. Im Westernblot konnte beobachtet werden, dass die Behandlung mit Hyper-IL-6 erwartungsgemäß die Y705-Phosphorylierung von STAT3 und folglich Expression von SOCS3 induziert. Die Behandlung MCMV-infizierter Zellen mit Hyper-IL-6 führte hingegen trotz verstärkter Y705-Phosphorylierung von STAT3 nicht zu einer Induktion des STAT3-Zielgens SOCS3. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Y705-Phosphorylierung von STAT3 zu einer Induktion des STAT3-

Ergebnisse

Zielgens *matrix metalloprotease 9* (MMP-9) (Song et al., 2008) führt. Dabei ist zu erkennen, dass weder die Infektion mit MCMV noch die Behandlung mit Hyper-IL-6 in den hier untersuchten Zellen zu einer Induktion des MMP-9-Gehalts führt.

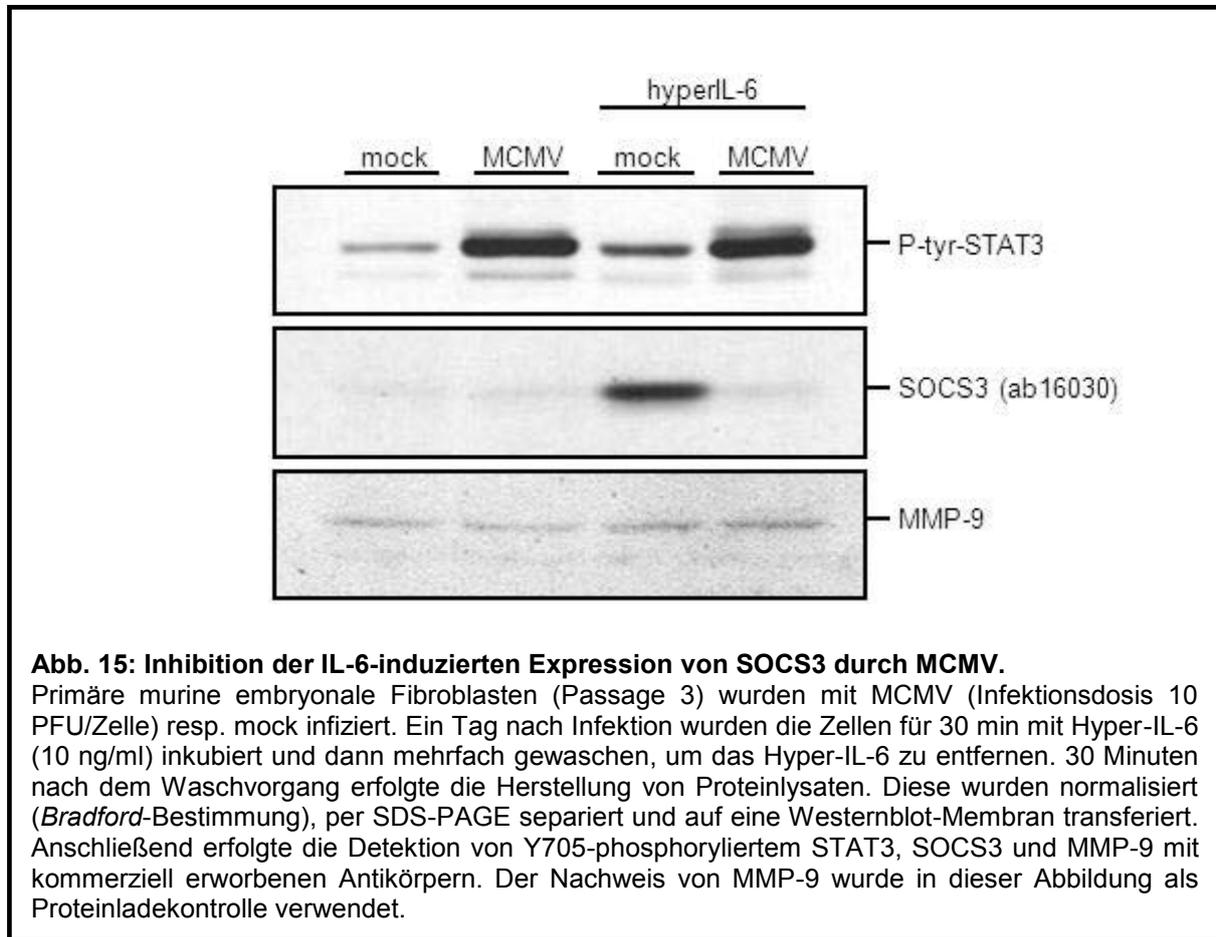


Abb. 15: Inhibition der IL-6-induzierten Expression von SOCS3 durch MCMV.

Primäre murine embryonale Fibroblasten (Passage 3) wurden mit MCMV (Infektionsdosis 10 PFU/Zelle) resp. mock infiziert. Ein Tag nach Infektion wurden die Zellen für 30 min mit Hyper-IL-6 (10 ng/ml) inkubiert und dann mehrfach gewaschen, um das Hyper-IL-6 zu entfernen. 30 Minuten nach dem Waschvorgang erfolgte die Herstellung von Proteinlysaten. Diese wurden normalisiert (*Bradford*-Bestimmung), per SDS-PAGE separiert und auf eine Westernblot-Membran transferiert. Anschließend erfolgte die Detektion von Y705-phosphoryliertem STAT3, SOCS3 und MMP-9 mit kommerziell erworbenen Antikörpern. Der Nachweis von MMP-9 wurde in dieser Abbildung als Proteinladekontrolle verwendet.

Somit ist gezeigt, dass die Behandlung MCMV-infizierter Zellen mit Hyper-IL-6 zwar eine verstärkte Akkumulation von Y705-phosphoryliertem und demzufolge scheinbar aktivierten STAT3 bewirkt, die zu erwartende Induktion der Expression spezifischer STAT3-Zielgene wie SOCS3 und IRF-1 aber ausbleibt.

2.3. Replikation von MCMV in STAT3-defizienten Zellen

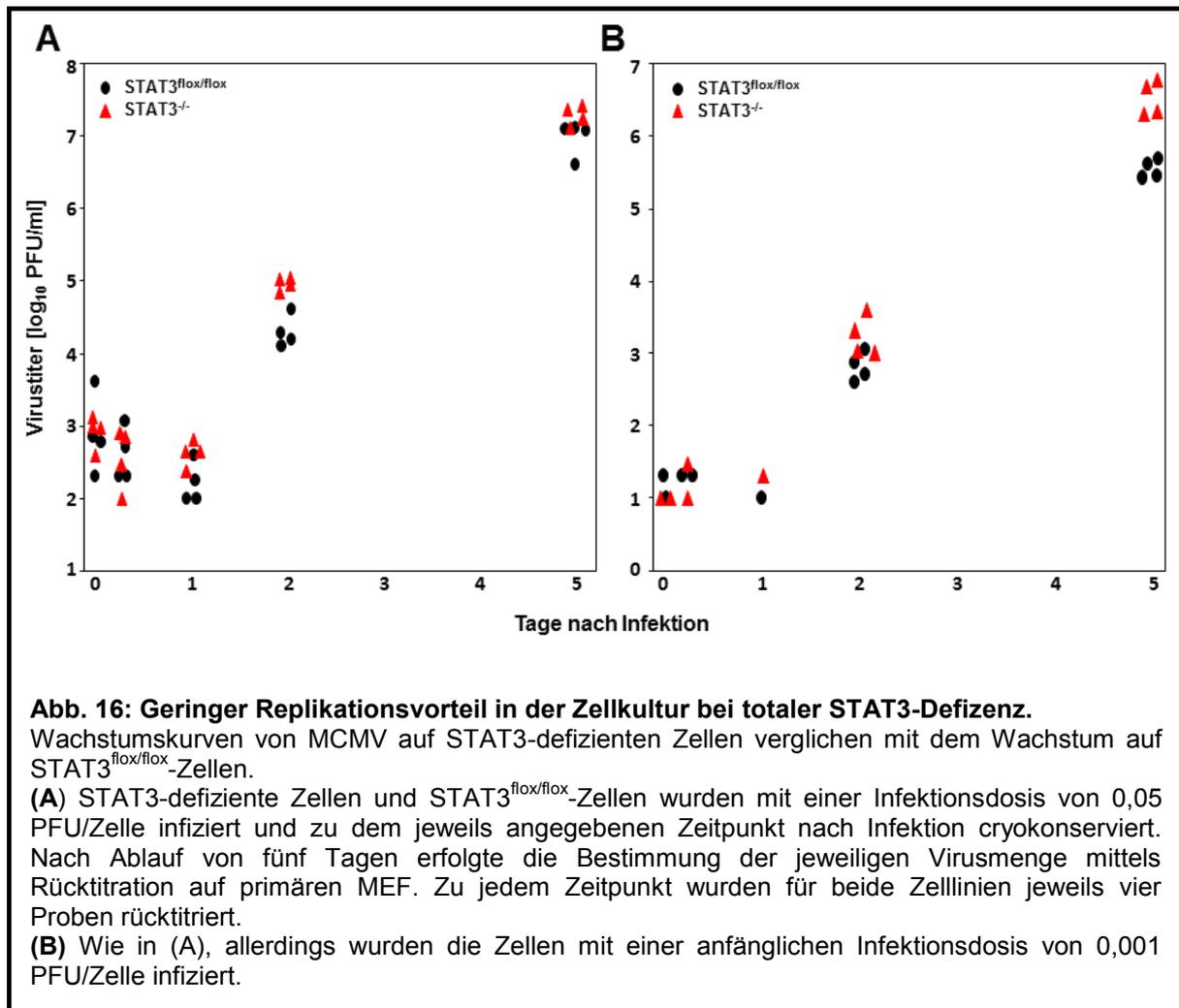
2.3.1. Geringer Replikationsvorteil in der Zellkultur bei totaler STAT3-Defizienz

Nachdem festgestellt wurde, dass eine Infektion mit MCMV zu einer STAT3-Modulation im Sinne einer Y705-Phosphorylierung und einer Reduktion des STAT3-Proteingehalts führt,

Ergebnisse

wurde die Bedeutung dieses Effekts für die Replikation des Virus in der Zellkultur untersucht. Zu diesem Zweck wurden Wachstumskurven angefertigt, bei denen die Replikation von MCMV auf STAT3-defizienten Zellen mit dem Wachstum auf einer STAT3-positiven Vergleichszelle (STAT3^{flox/flox}) verglichen wurde. Beide Zelllinien wurden mit einer anfänglichen Infektionsdosis von 0,05 PFU/Zelle infiziert und die Proben zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion cryokonserviert. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde die jeweilige Virusmenge zu den unterschiedlichen Zeitpunkten mittels Rücktitration und Bestimmung der Anzahl der Plaques ermittelt. Diese Werte wurden in der abgebildeten Wachstumskurve dargestellt (Abb. 16A). Bei diesem Experiment wurde beobachtet, dass MCMV in den STAT3-defizienten Zellen einen leichten Wachstumsvorteil gegenüber der Replikation in den Vergleichszellen hat. Auch wenn es sich nur um einen geringen Wachstumsvorteil handelt, konnte für die Werte an den Zeitpunkten zwei und fünf Tage nach Infektion signifikante Unterschiede im Virustiter festgestellt werden.

In einer zweiten, unabhängig angefertigten Wachstumskurve, bei der die Zellen mit einer anfänglichen Infektionsdosis von 0,001 PFU/Zelle infiziert wurden, konnte ein vergleichbarer Befund erhoben werden (Abb. 16B), bei dem zum Zeitpunkt fünf Tage nach Infektion ein signifikanter Unterschied im Virustiter festzustellen ist. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass MCMV auf STAT3-defizienten Zellen einen leichten, aber signifikanten Replikationsvorteil gegenüber der Replikation auf der Vergleichszelle hat, was darauf hindeutet, dass STAT3 möglicherweise antiviral wirksam ist.



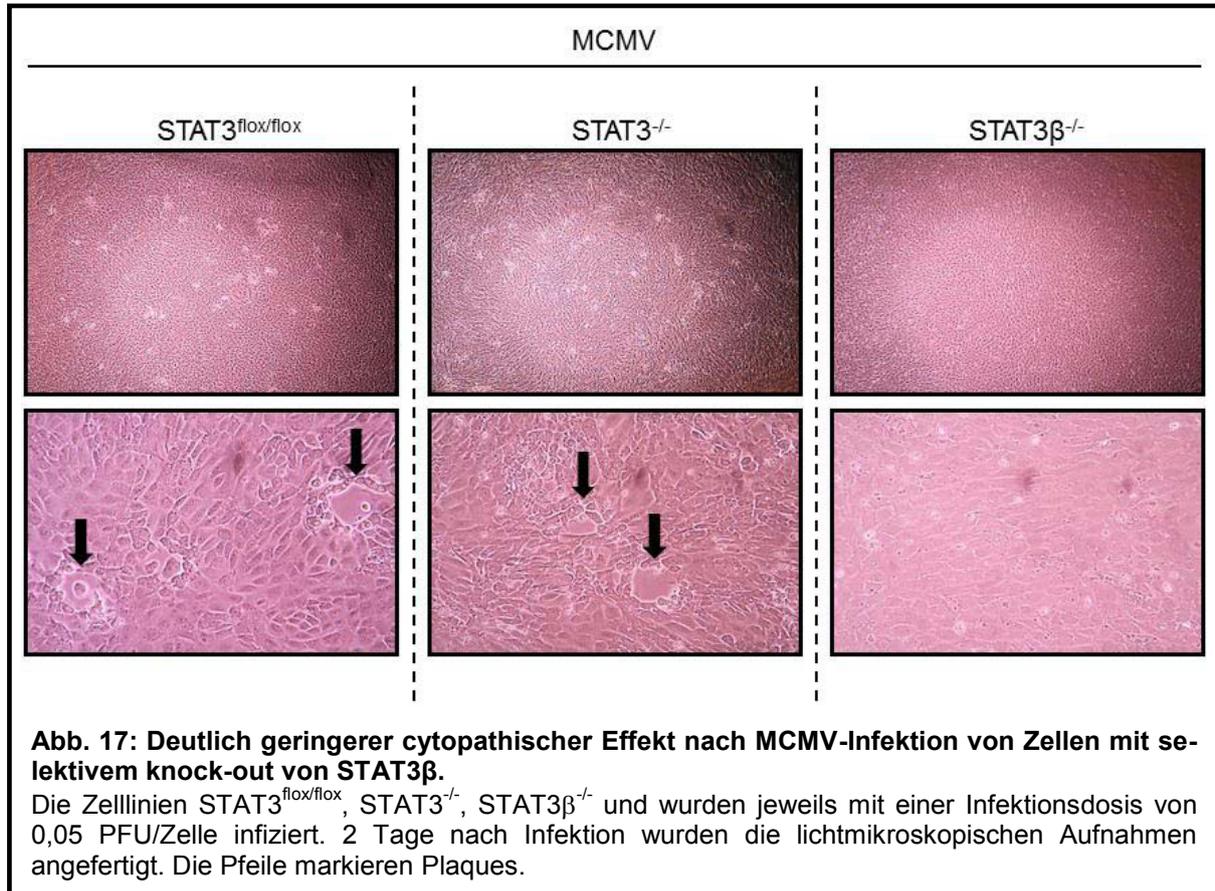
Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich bei den verwendeten Zellen um stabile, krisen-immortalisierte Zelllinien handelt, die nur bedingt mit primären Zellen zu vergleichen sind. Aus diesem Grund wäre die Durchführung dieser Experimente in primären murinen Fibroblasten wünschenswert, da diese eine bessere Vergleichbarkeit mit der Situation *in vivo* zeigen. Eine *in vivo* angefertigte Wachstumskurve ist in diesem Fall wegen der embryonalen Letalität STAT3-defizienter Mäuse (Takeda et al., 1997) leider nicht möglich.

2.3.2. Selektiver knock-out von STAT3 β führt zu einer Attenuierung der Replikation von MCMV

Nach Infektion von STAT3 β -defizienten Zellen mit MCMV fällt auf, dass diese im Vergleich mit STAT3^{flox/flox}- und STAT3-defizienten Zellen einen deutlich geringeren cytopathischen Effekt (CPE) aufweisen. So sieht man in lichtmikroskopischen Aufnahmen in STAT3^{flox/flox}-

Ergebnisse

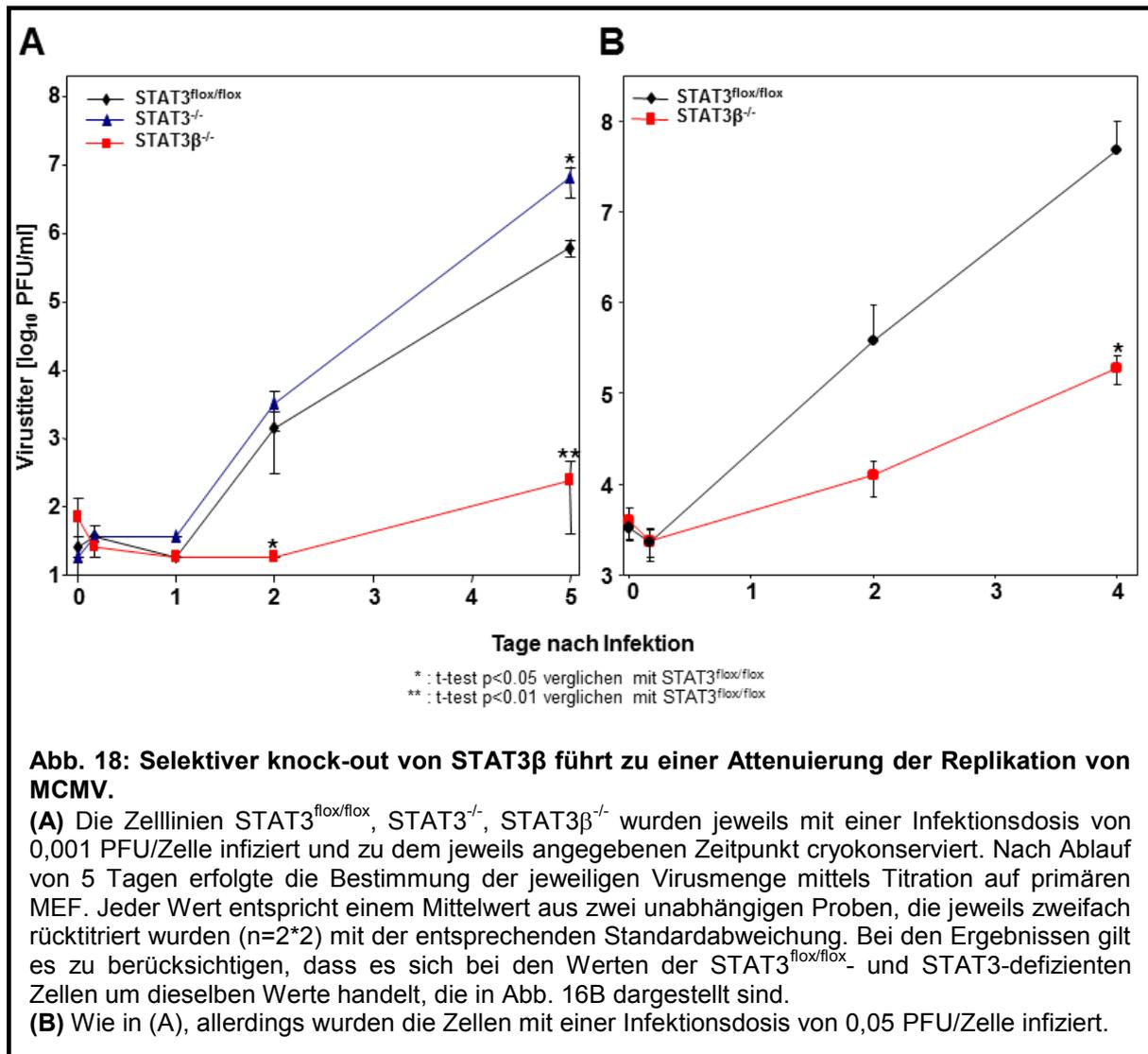
und STAT3-defizienten Zellen 2 Tage nach Infektion bei einer Infektionsdosis von 0,05 PFU/Zelle deutliche Plaques, während MCMV in STAT3 β -defizienten Zellen zu diesem Zeitpunkt noch keine Plaques ausgebildet hat (Abb. 17).



Um die beobachteten Unterschiede in der Replikation des Virus auf diesen Zellen nun zu verifizieren und in Wachstumskurven zu quantifizieren, wurden STAT3^{flx/flx}-, STAT3-defiziente und STAT3 β -defiziente Zellen mit einer Infektionsdosis von 0,001 PFU/Zelle infiziert und die Zellen zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten nach Infektion cryokonserviert. Nach Ablauf von 5 Tagen wurde die jeweilige Virusmenge mittels Rücktitration auf primären murinen Fibroblasten bestimmt und in einer Wachstumskurve dargestellt (Abb. 18A). Dabei bestätigten sich die visuell erhobenen Befunde: Während 5 Tage nach Infektion in den STAT3^{flx/flx}- und STAT3-defizienten Zellen Virustiter von mehr als 10⁵ PFU/ml erreicht wurden, zeigte sich ein deutlicher Wachstumsnachteil des Virus auf den STAT3 β -defizienten Zellen; im Vergleich mit den STAT3^{flx/flx}-Zellen zeigte sich ein 2508-fach reduziertes Wachstum.

Ergebnisse

In einer zweiten Wachstumskurve (Abb. 18B), bei der $\text{STAT3}^{\text{flox/flox}}$ und $\text{STAT3}\beta$ -defiziente Zellen mit einer initialen Infektionsdosis von 0,05 PFU/Zelle infiziert wurden, konnte der oben beschriebene Befund reproduziert werden. Es zeigte sich eine deutliche Attenuierung der viralen Replikation auf $\text{STAT3}\beta$ -defizienten Zellen.



Somit ist davon auszugehen, dass das Fehlen von $\text{STAT3}\beta$ einen deutlichen Wachstumsnachteil für MCMV in den Zellen darstellt. Es ist bekannt, dass $\text{STAT3}\beta$ -defiziente Mäuse verglichen mit wt-Mäusen nach Behandlung mit LPS mit einer verstärkten Entzündungsreaktion im Sinne einer erhöhten Sekretion an IL-6 und TNF- α reagieren (Maritano et al., 2004). Diese verstärkte inflammatorische Reaktion könnte die Attenuierung der viralen Replikation in diesen Zellen erklären.

Wie schon in dem zuvor durchgeführten Experiment wurden auch hier krisen-immortalisierte Zelllinien verwendet. Eine bessere Beurteilung der Bedeutung von STAT3 β im Rahmen einer MCMV-Infektion könnte mit Hilfe von auf primären embryonalen Fibroblasten angefertigten Wachstumskurven erfolgen. Da die isolierte Deletion von STAT3 β im Gegensatz zur kompletten STAT3-Defizienz nicht zu einer embryonalen Letalität führt (Maritano et al., 2004), könnten diese Experimente auch *in vivo* durchgeführt werden.

2.4. Die Modulation von STAT3 durch das humane Cytomegalovirus

Das murine CMV hat für die wissenschaftliche Erforschung der Cytomegaloviren eine große Bedeutung, da es die Möglichkeit bietet, Hypothesen in einem Tiermodell *in vivo* zu überprüfen (Krmptotic et al., 2003). Das Cytomegalovirus weist aber einen hohen Grad an Spezies-spezifität auf, sodass jede Wirtsspezies nur durch ihr „privates“ Virus infiziert werden kann (Kim und Carp, 1971; Shenk und Stinski, 2008). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Experimente nicht auf MCMV zu beschränken, sondern aufgrund der klinischen Relevanz auch die Übertragbarkeit der erhobenen Befunde auf das humane CMV zu prüfen. Im folgenden Experiment wurden deshalb humane Fibroblasten mit HCMV infiziert.

HCMV verfügt über unterschiedliche Mechanismen, um die IFN-Reaktion der infizierten Zelle zu inhibieren. So ist bekannt, dass die Infektion mit HCMV zu einer proteasomalen Degradation von Jak1 führt (Miller et al., 1998) und somit die Expression IFN-spezifischer Zielgene – wie beispielsweise MHC-I, IRF-1 und MxA – inhibiert (Miller et al., 1999). Da Jak1 auch mit der gp130-Untereinheit des IL-6-Rezeptors assoziiert ist (Lutticken et al., 1994) und an der Signaltransduktion von IL-6 beteiligt ist (Stahl et al., 1994), stellte sich die Frage, ob die Infektion mit HCMV auch die IL-6-induzierte Y705-Phosphorylierung von STAT3 inhibiert.

Um dies zu untersuchen, wurden MRC-5-Zellen mit HCMV (Infektionsdosis 5 PFU/Zelle) bzw. UV-inaktiviertem HCMV infiziert und zu dem jeweils angegebenen Zeitpunkt nach Infektion für 30 Minuten mit IFN- γ (500 U/ml) oder Hyper-IL-6 (10 ng/ml) behandelt. Nach der Inkubation mit dem jeweiligen Zytokin erfolgte die Herstellung der Proteinlysate. Diese wurden darauffolgend mittels Westernblot auf ihren Gehalt an Y705-phosphoryliertem STAT3, Y701-phosphoryliertem STAT1 sowie dem Gesamtproteingehalt an STAT3 und STAT1 untersucht (Abb. 19).

Ergebnisse

Bei diesem Experiment fällt zuerst einmal auf, dass es nach Infektion mit HCMV nicht zu der nach MCMV-Infektion beobachteten Reduktion des STAT3-Gehalts kommt; die Gesamtmenge an STAT3 bleibt über den gesamten Verlauf der Infektion relativ konstant.

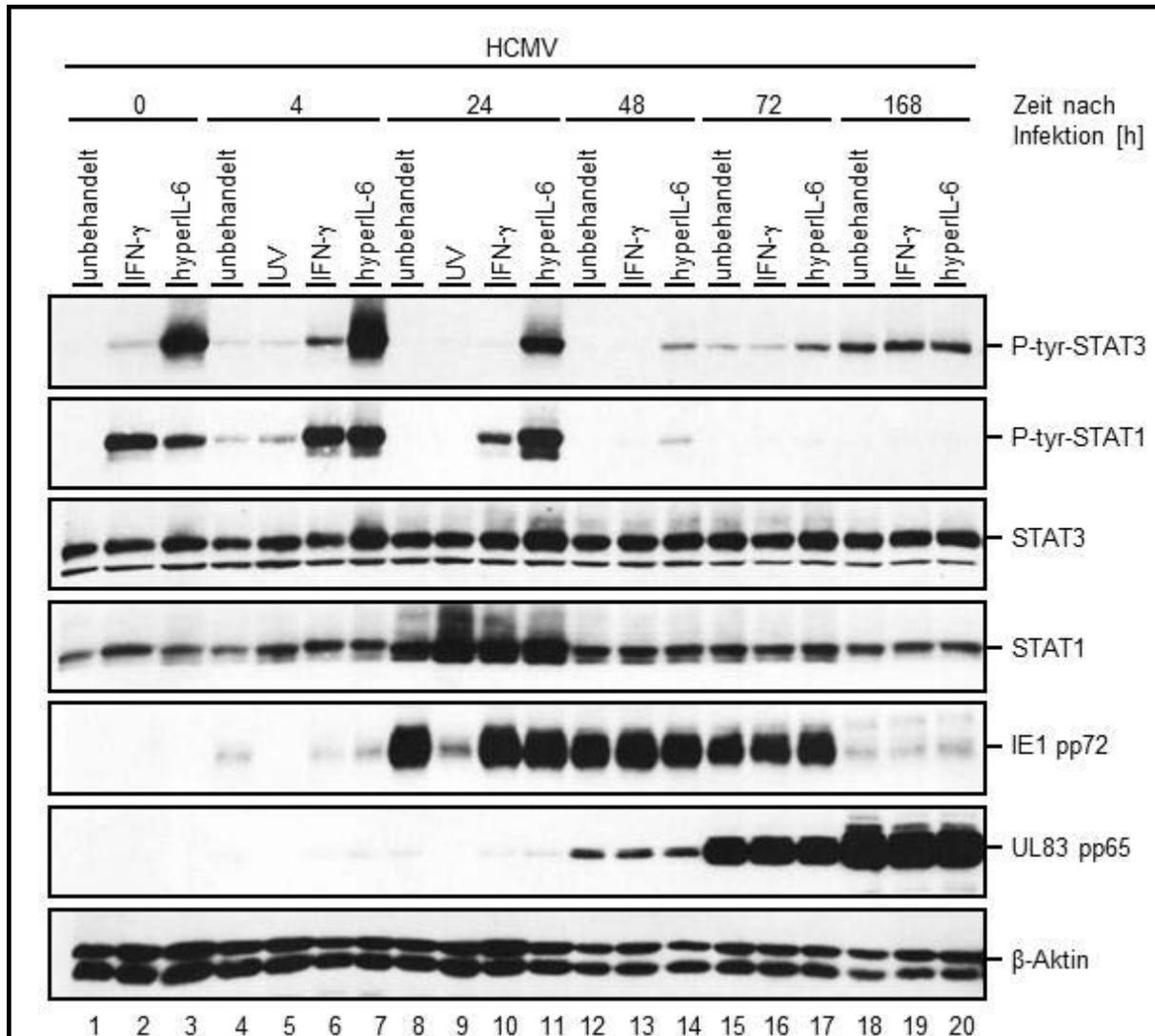


Abb. 19: Inhibition der IL-6- und IFN- γ -induzierten Phosphorylierung von STAT3 bzw. STAT1 durch HCMV in Abhängigkeit von der Infektionsdauer.

MRC-5-Zellen wurden mit HCMV (Stamm AD169; Infektionsdosis 5 PFU/Zelle) bzw. UV-inaktiviertem HCMV infiziert und zum jeweils angegebenen Zeitpunkt nach Infektion für 30 min mit IFN- γ (500 U/ml) oder Hyper-IL-6 (10 ng/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Die Proteinlysate wurden anschließend normalisiert (*Bradford*-Bestimmung, s. Material und Methoden), mittels SDS-PAGE separiert und per Westernblot auf die angegebenen Proteine hin untersucht. Dabei wurden alle Proteine sequentiell auf derselben Membran detektiert. Die Effizienz der UV-Inaktivierung wurde mit dem viralen Protein IE1 pp72 untersucht, das Fortschreiten der Infektion mit UL83 pp65. β -Aktin diente dem Nachweis der Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung.

Im Fall von IFN- γ führte die Infektion mit HCMV wie erwartet dazu, dass die in den mock-infizierten Zellen induzierte Phosphorylierung von STAT3 und STAT1 48 h nach Infektion

Ergebnisse

deutlich inhibiert wurde und im Westernblot nahezu kein Signal detektiert werden konnte (Vergleich Spur 13 und 6). Bei Betrachtung von Spur 7 erkennt man, dass die Behandlung der Zellen mit Hyper-IL-6 eine starke Induktion der STAT3-Phosphorylierung sowie eine etwas schwächere Induktion der STAT1-Phosphorylierung bewirkt. Werden die HCMV-infizierten Zellen 48 h nach Infektion mit Hyper-IL-6 behandelt (Spur 14), wird diese Induktion jedoch deutlich abgeschwächt. Somit führt die Infektion mit HCMV spätestens 48 h nach Infektion zu einer Inhibition der IL-6-induzierten Phosphorylierung von STAT3 und STAT1, was möglicherweise auf die oben beschriebene Degradation von Jak1 zurückzuführen ist. Leider ist das verantwortliche virale Gen für die Jak1-Degradation bis dato nicht bekannt.

Auffällig ist auch, dass 72 h bzw. 168 h nach Infektion eine konstitutive, Zytokin-unabhängige Phosphorylierung von STAT3 zu beobachten ist, die sich durch Behandlung mit Hyper-IL-6 nicht zusätzlich steigern lässt; die Phosphorylierung von STAT1 hingegen ist zu diesem Zeitpunkt nach Infektion weiterhin deutlich inhibiert (Spuren 15-20). Der Gesamtgehalt an STAT3 nach Infektion mit HCMV blieb in diesem Experiment konstant.

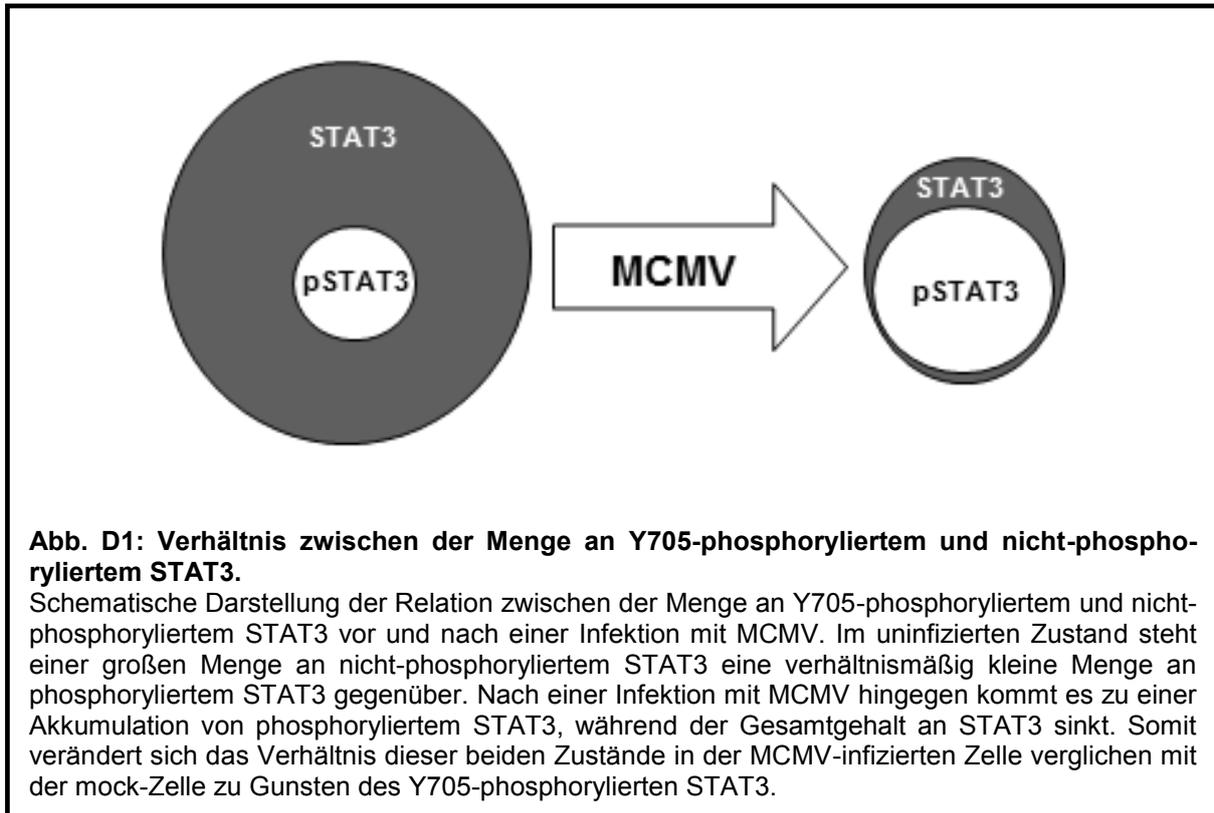
Aus diesen Experimenten kann gefolgert werden, dass die nach Infektion mit HCMV hervorgerufene Inhibition der Hyper-IL-6 und IFN- γ -induzierten Phosphorylierung von STAT3 und STAT1 spätestens 2 Tage nach Infektion in Erscheinung tritt. Im Infektionsverlauf kommt es zu einer konstitutiven, Zytokin-unabhängigen STAT3-Phosphorylierung. Es wird vermutet, dass Y705-phosphoryliertes STAT3 das Wachstum unterschiedlicher Karzinome stimuliert und möglicherweise an der Karzinogenese bestimmter Tumore beteiligt ist (Bowman und Jove, 1999; Garcia et al., 2001; Niu et al., 2002a; Yu und Jove, 2004). Da auch HCMV mit unterschiedlichen malignen Tumoren assoziiert ist (Cobbs et al., 2002; Harkins et al., 2002; Samanta et al., 2003; Baryawno et al., 2011; Cobbs, 2011), kann hier ein möglicher Zusammenhang bestehen.

3. Diskussion

3.1. Die Infektion mit MCMV führt zu einer Reduktion der STAT3-Gesamtmenge und zu einer Y705-Phosphorylierung von STAT3

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit MCMV zu einer zeit- (Abb. 3) und infektionsdosisabhängigen (Abb. 4A) Reduktion des Gesamtgehalts an STAT3 in der infizierten Zelle führt (Abb. 1). Da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beobachtet wurde, dass die Infektion mit MCMV über das virale Protein M27 zu einer proteasomalen Degradation von STAT2 und demzufolge einer starken Reduktion der STAT2-Menge führt (Zimmermann et al., 2005; Trilling et al., 2011), wurde hier ein ähnlicher Vorgang vermutet. In der Folge wurde aber nachgewiesen, dass die Reduktion der STAT3-Menge weder vom Proteasom noch von M27 abhängt (Dr. Mirko Trilling, unveröffentlichte Daten). Gleichzeitig wurde beobachtet, dass es in MCMV-infizierten Zellen zu einer Y705-Phosphorylierung des verbliebenen STAT3 kommt (Abb. 2), sodass die Relation zwischen phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem STAT3 zu Gunsten des phosphorylierten STAT3 beeinflusst wird (Abb. D1). Aus diesen Befunden konnte geschlossen werden, dass es sich bei der MCMV-induzierten Modulation von STAT3 um einen Vorgang handelt, der sich von der M27-abhängigen proteasomalen Reduktion von STAT2 grundsätzlich unterscheidet.

Es konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass sowohl STAT3-Phosphorylierung als auch Reduktion der Gesamtmenge an STAT3 von viraler Genexpression abhängen und auf einem viral kodierten Prinzip resp. einem viralen Gen(-produkt) beruhen (Abb. 5). Außerdem wurde gezeigt, dass sich beide Effekte auf infizierte Zellen beschränken (Abb. 9) und sich durch das Medium infizierter Zellen nicht auf mock-Zellen übertragen lassen (Abb. 10). Dies ist insofern von Bedeutung, als dass viele unterschiedliche Zytokine – wie beispielsweise IL-6, IL-10, EGF oder PDGF – existieren, deren Signaltransduktionsweg bekanntermaßen über eine Aktivierung bzw. Y705-Phosphorylierung von STAT3 bewerkstelligt wird, was bedeutet, dass die Sekretion dieser Zytokine in Folge einer MCMV-Infektion für die STAT3-Phosphorylierung verantwortlich sein könnte. Eine essentielle Rolle von IL-6, IL-10 und Jak2 für die beobachteten Effekte wurde zusätzlich über entsprechende k.o.-Zellen ausgeschlossen (Abb. 8).



3.2. Trotz scheinbarer STAT3-Aktivierung nach MCMV-Infektion wird keine Induktion von STAT3-Zielgenen beobachtet

Es konnte gezeigt werden, dass das Y705-phosphorylierte STAT3 in MCMV-infizierten Zellen in den Nukleus transloziert (Abb. 13) und an die DNA-Zielsequenzen bindet (Dr. Mirko Trilling, unveröffentlichte Daten). Diese Daten legen den Verdacht nahe, dass in Folge dieser Vorgänge die Transkription bekannter STAT3-Zielgene induziert wird. Dies wurde auch für die Infektion mit einigen anderen Viren beschrieben: So ist beispielweise bekannt, dass die Infektion mit dem Varizella-Zoster-Virus (VZV) zu einer Y705-Phosphorylierung von STAT3 führt, in dessen Folge das anti-apoptotische Protein Survivin induziert wird (Sen et al., 2012). Auch für das NS1-Protein des humanen Parvovirus B19 ist beschrieben, dass es eine Y705-Phosphorylierung von STAT3 mit nachfolgender Induktion des STAT3-Zielgens PIAS3 hervorruft (Duechting et al., 2008).

Im Falle von MCMV kam es aber trotz der Anwesenheit des STAT3 im Nukleus nicht zu der erwarteten Induktion der Genexpression bekannter STAT3-Zielgene, wie beispielweise SOCS3 und IRF-1. Selbst die Induktion dieser Zielgene durch einen externen Stimulus (z.B. Hyper-IL-6) wird in MCMV-infizierten Zellen inhibiert (Abb. 14 und 15).

Interessanterweise konnte in der Arbeitsgruppe ein vergleichbarer Befund für die MCMV-kodierte Inhibition der IFN- γ -Signaltransduktion erhoben werden: Bei der Behandlung MCMV-infizierter Zellen mit IFN- γ ist im Vergleich zu mock-Zellen eine verlängerte und verstärkte Y701-Phosphorylierung von STAT1 zu beobachten. Das phosphorylierte STAT1 bildet durch Dimerisierung den GAF-Komplex, transloziert in den Nukleus und bindet auch an die DNA; die zu erwartende Induktion des IFN- γ -Zielgens IRF-1 bleibt aber trotz verstärkt phosphoryliertem STAT1 deutlich ineffizienter als in nicht-infizierten Zellen (Dr. Mirko Trilling, unveröffentlichte Daten). Somit inhibiert MCMV die IFN- γ -bedingte Induktion der Transkription dieses Gens, ohne die Vorgänge proximal der Transkription zu beeinträchtigen. Die MCMV-bedingte Inhibition der IFN- γ -Signaltransduktion konnte in ähnlicher Form auch in anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Popkin et al., 2003). Die Parallelen zwischen den beobachteten Befunden bzgl. der MCMV-bedingten STAT3-Modulation und der MCMV-bedingten Inhibition der IFN- γ -Signaltransduktion führen zu dem im Folgenden angeführten aktuellen Modell der Modulation von STAT3 durch MCMV.

3.3. Aktuelles Modell der Modulation von STAT3 durch MCMV

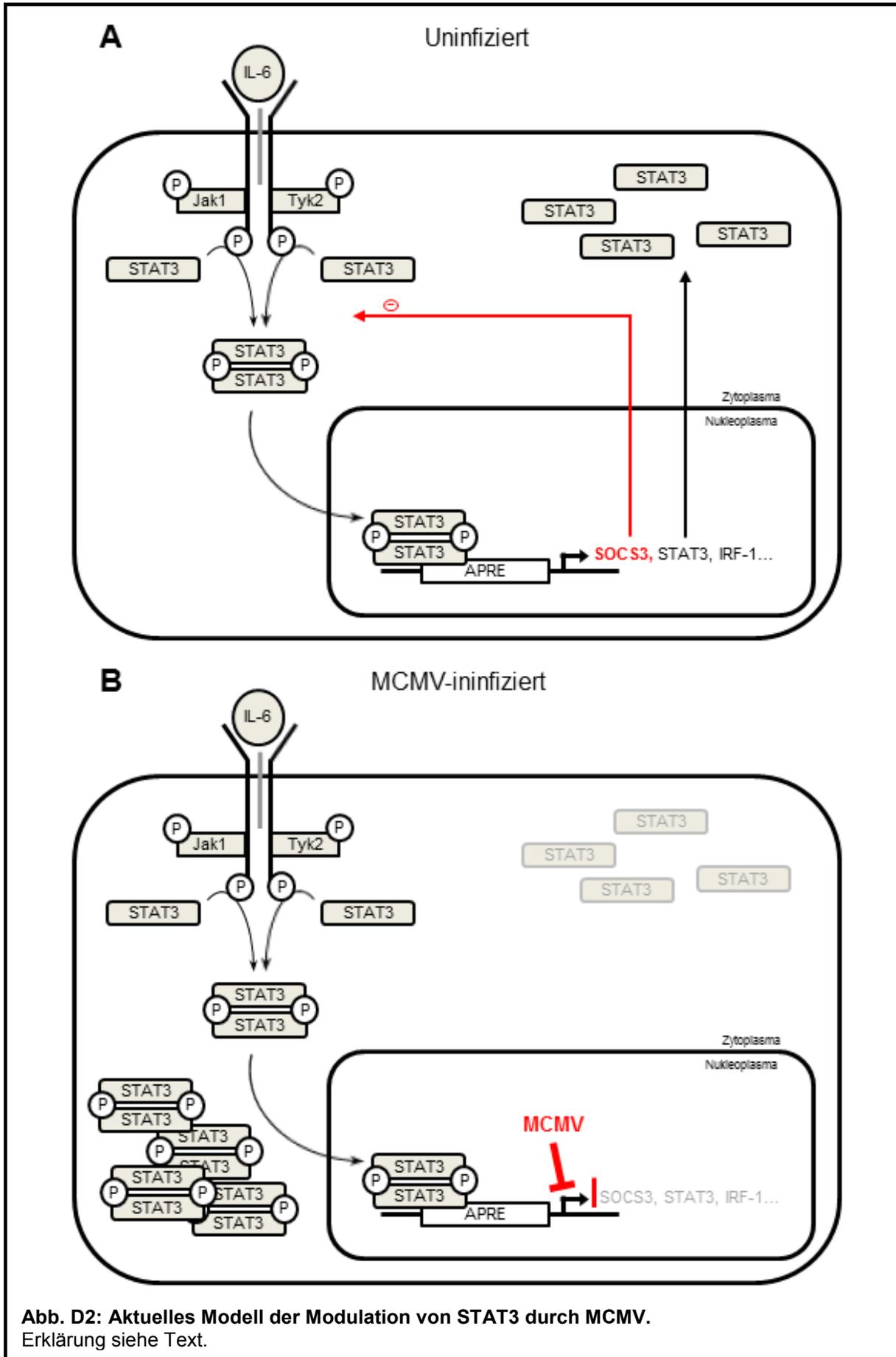
Die Behandlung von Zellen mit IL-6 führt normalerweise über die Assoziation des Zytokins mit dem IL-6-Rezeptor zu einer Aktivierung der gp130-assoziierten Januskinasen (Jak1, Jak2 und Tyk2). Anschließend werden die STAT-Proteine über eine spezifische Bindung ihrer *src homology 2* (SH2)-Domäne an den zytoplasmatischen Abschnitt des Rezeptors rekrutiert. Es kommt zu einer Phosphorylierung des Tyrosinrests der STAT-Proteine, woraufhin diese dimerisieren, in den Nukleus translozieren und dort an spezifische Enhancer-Sequenzen der Zielgene auf der DNA binden, um somit die Transkription bestimmter Zielgene zu induzieren (z.B. SOCS3 und IRF-1) (s. Abb. D2A). Zur Vereinfachung ist in dieser Abbildung nur die Y705-Phosphorylierung der STAT3-Proteine mit anschließender Homodimerisierung und Bindung an die sogenannte APRE-Sequenz (*acute phase response element*) dargestellt; es kann aber auch über die Y701-Phosphorylierung von STAT1-Proteinen zu der Ausbildung von Heterodimeren kommen (Aaronson und Horvath, 2002; Hirano et al., 2000; Murray, 2007) (Näheres s. Einleitung).

Bei Behandlung MCMV-infizierter Zellen ist nach Behandlung mit IL-6 trotz Zunahme der Y705-Phosphorylierung der STAT3-Proteine (Abb. 2), Translokation von STAT3 in den Nukleus (Abb. 13) und DNA-Bindung (Dr. Mirko Trilling, unveröffentlichte Daten) keine

Diskussion

Induktion IL-6- bzw. STAT3-spezifischer Zielgene zu beobachten; weder kam es zu einer Induktion von SOCS3, noch von IRF-1 (Abb. 14 und Abb. 15). Zudem konnte festgestellt werden, dass die Infektion mit MCMV zu einer deutlichen Reduktion der Gesamtmenge an STAT3-Protein führt (Abb. 1), wobei dies erst zu einem späten Zeitpunkt nach Infektion erfolgt (Abb. 3).

Diese Befunde führten uns zu dem in Abbildung D2B dargestellten Modell: Ein MCMV-kodierter Inhibitor unterbindet die STAT3-Signaltransduktion, sodass die Transkription der STAT3-spezifischen Zielgene gehemmt wird. Somit ist auch die Induktion der Regulatoren dieses Signalwegs inhibiert, zu denen u.a. auch SOCS3 gehört. Durch die fehlende Induktion dieser Regulatoren fehlt die negative Rückkopplung, was zu einer Akkumulation von Y705-phosphoryliertem STAT3 führt. Da es sich bei STAT3 um ein autoregulatorisches, STAT3-responsives Gen handelt, wird durch den MCMV-kodierten Inhibitor auch die effiziente Induktion der Transkription von STAT3 gehemmt, womit die Reduktion der Gesamtproteinmenge von STAT3 zu erklären wäre. Die relativ lange Halbwertszeit von STAT3 (8,5 h im Falle von STAT3 α ; (Siewert et al., 1999)) begründet die erst zu einem späten Zeitpunkt nach Infektion sichtbare Reduktion der STAT3-Gesamtmenge.



3.3.1. Möglicher Mechanismus einer MCMV-bedingten Inhibition der STAT3-Signaltransduktion

Wie bereits erwähnt wurde, konnte in bisher unveröffentlichten Daten (Dr. Mirko Trilling) gezeigt werden, dass die Infektion mit MCMV eine Inhibition der IFN- γ -Signaltransduktion bewirkt, die mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten bezüglich einer möglichen Inhibition der STAT3-Signaltransduktion vergleichbar sind; die Befunde zeigen deutliche Parallelen zwischen der MCMV-bedingten Inhibition der Signaltransduktion der IL-6/STAT3/SOCS3- und der IFN- γ /STAT1/SOCS1-Signalkaskade. In beiden Fällen kommt es nach der Interaktion des Liganden mit dem entsprechenden Rezeptor zur Phosphorylierung des jeweiligen STAT-Proteins, zur Dimerisierung, zur nukleären Translokation sowie zur Bindung an die Enhancer der responsiven Gene, ohne dass eine effiziente Induktion der entsprechenden Zielgene stattfindet – zumindest für die Gene, die in unseren Experimenten untersucht wurden (SOCS3, IRF-1). In Anbetracht dieser Ergebnisse besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der Inhibition dieser beiden Signalkaskaden um einen gemeinsamen, identischen Inhibitor handelt.

Der STAT1:STAT1- und der STAT3:STAT3-Transkriptionskomplex sind sich sehr ähnlich, was sich u.a. an der Tatsache verdeutlicht, dass es nach einer entsprechenden Aktivierung auch zu der Ausbildung von STAT1:STAT3-Heterodimeren kommen kann (Ho und Ivashkiy, 2006). Beide Transkriptionskomplexe weisen deutliche Parallelen in ihrer dreidimensionalen Struktur auf (Zhang et al., 1999; Levy und Darnell, 2002): In Folge der Bindung der SH2-Domäne an das phosphorylierte Tyrosin des zweiten STAT-Proteins kommt es zu der Ausbildung eines C-förmigen Dimers, in dessen Zentrum eine DNA-Bindestelle entsteht (Becker et al., 1998; Chen et al., 1998). Somit sind beide STAT-Proteine des Homodimers an der Bindung beteiligt und haben direkten Kontakt zu der DNA. Die Bindung des STAT1:STAT1- bzw. STAT3-STAT3-Homodimers unterscheidet sich somit grundsätzlich von der DNA-Bindung des IFN- α -induzierten STAT1:STAT2:p48-Transkriptionskomplex (ISGF3), bei dem die DNA-Bindung über die DNA-Bindemotive von STAT1 und p48 (IRF-9) bewerkstelligt wird (Leung et al., 1995; Qureshi et al., 1995), während STAT2 die Transaktivator-domäne zur Verfügung stellt (Bluyssen und Levy, 1997). Dabei ist zu berücksichtigen, dass MCMV die Transkription über ISGF3 nicht direkt blockiert, sondern die Inhibition in diesem Fall über die proteasomale Degradation von STAT2 hervorruft (Zimmermann et al., 2005; Trilling et al., 2011).

Die strukturellen Parallelen zwischen dem STAT1- und dem STAT3-Homodimer und die Differenz zum ISGF3 würden nahelegen, dass MCMV die DNA-Bindung inhibiert. Da aber

gezeigt werden konnte, dass die DNA-Bindung von STAT1- und STAT3-Homodimeren sowie auch von STAT1:STAT3-Heterodimeren in MCMV-infizierten Zellen nicht beeinträchtigt ist, scheint diese Möglichkeit der Inhibition ausgeschlossen.

Es ist bekannt, dass bei der STAT-induzierten Transkription noch viele weitere, mit den STAT-Proteinen interagierende Proteine involviert sind, die die Transkription in positivem wie auch in negativem Sinne beeinflussen können (Shuai, 2000; Levy und Darnell, 2002). Dabei wurden einige Faktoren beschrieben, die sowohl mit STAT1 als auch mit STAT3 interagieren, was in Anbetracht der strukturellen Ähnlichkeit zwischen beiden Homodimeren auch nicht verwunderlich ist. Als Beispiel sei hier das *specificity protein 1* (Sp1) genannt: Sp1 kann die transkriptionelle Aktivität von STAT1 und STAT3 verstärken; es konnte nachgewiesen werden, dass es einerseits in Folge der IFN- γ -Antwort mit STAT1 assoziiert (Look et al., 1995), andererseits aber auch nach Behandlung mit IL-6 an STAT3 bindet (Cantwell et al., 1998; Canaff et al., 2008). Auch die Histon-Acetyltransferasen (HAT) p300 und *CREB-binding protein* (CBP) interagieren mit STAT1 (Zhang et al., 1996; Horvai et al., 1997) und STAT3 (Schuringa et al., 2001; Ray et al., 2002; Wang et al., 2005) und sind an der für die Transkription notwendigen Remodellierung des Chromatins beteiligt (Kadonaga, 1998). Als weiteres Ziel einer möglichen Interaktion mit MCMV käme Nmi in Frage, ein weiterer Co-Aktivatoren der STAT-Signaltransduktion, der sowohl mit STAT1 als auch mit STAT3 – interessanterweise aber nicht mit STAT2 – interagieren kann (Zhu et al., 1999).

Es besteht die Möglichkeit, dass ein MCMV-kodierter Inhibitor über die Antagonisierung eines Co-Aktivatoren der STAT-Signaltransduktion, der sowohl mit STAT1 als auch mit STAT3 interagiert, eine Hemmung der Transkription über diese Mediatoren bewirkt. Für HCMV ist beispielsweise eine Interaktion mit CREB beschrieben; die Infektion mit HCMV führt zu der Ausbildung eines DNA-bindenden Komplexes namens CIF (*cytomegalovirus-induced interferon-stimulated response element binding factor*), der u.a. aus CREB besteht (Navarro et al., 1997). Hierbei scheint es sich zwar nicht um eine Antagonisierung von CREB zu handeln, doch zeigt dieses Beispiel, dass Interaktionen von viralen Proteinen mit Co-Aktivatoren der Transkription nach CMV-Infektion auftreten können.

Eine antagonisierende Interaktion mit einem Co-Aktivatoren der Transkription ist auch bei anderen Viren beschrieben; beispielsweise bindet das E1A-Protein des Adenovirus p300/CBP und inhibiert somit die Aktivierung IFN-responsiver Gene (Shuai, 2000). Nichtsdestotrotz kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um zwei unabhängige Inhibitoren handelt, die die Transkription durch die STAT1- und STAT3-Dimere auf unabhängige Art und Weise inhibieren.

3.3.2. Mögliche Ursache der MCMV-bedingten, Zytokin-unabhängigen Phosphorylierung von STAT3

Ein beachtenswerter Unterschied zwischen der MCMV-abhängigen Inhibition der STAT1- und der STAT3-Signaltransduktion ist, dass die verlängerte Y701-Phosphorylierung von STAT1 nur dann auftritt, wenn die infizierten Zellen mit IFN- γ behandelt wurden. Im Falle der Y705-Phosphorylierung von STAT3 hingegen konnte man beobachten, dass die MCMV-infizierten Zellen eine verstärkte STAT3-Phosphorylierung vorwiesen, auch wenn sie nicht mit Hyper-IL-6 behandelt wurden (Abb. 2). Auf den ersten Blick würde dies dem in Abschnitt 3.3 dargestellten Modell widersprechen, da die verstärkte Phosphorylierung der STAT-Proteine ja erst durch eine die Inhibition der Transkription der negativen Regulatoren dieses Signalwegs(z. B. SOCS3) hervorgerufen wird und dabei somit immer ein externer Stimulus dieses Signalwegs (in unserem Fall Hyper-IL-6 oder IFN- γ) benötigt.

Im Falle der Y705-Phosphorylierung von STAT3 gilt es aber zu berücksichtigen, dass STAT3 – wie bereits erwähnt – durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen aktiviert und phosphoryliert werden kann und sich dadurch grundsätzlich von STAT1 unterscheidet, welches hauptsächlich durch Interferone aktiviert wird. So wurde beispielsweise im Fall von HCMV gezeigt, dass das HCMV-kodierte Protein US28 über eine Induktion von NF- κ B die Sekretion von IL-6 und VEGF stimuliert, was zu einer Y705-Phosphorylierung von STAT3 führt (Slinger et al., 2010). Da für das MCMV-kodierte Protein M33 beschrieben ist, dass es mit US28 vergleichbare Eigenschaften besitzt (Waldhoer et al., 2002), besteht hier die Möglichkeit, dass dieses Protein an der Induktion der STAT3-Phosphorylierung beteiligt ist. Da allerdings in Transwell-Experimenten gezeigt werden konnte, dass sich die Phosphorylierung auf infizierte Zellen beschränkt (Abb. 9 und Abb. 10) und zudem unabhängig von IL-6 vorzufinden ist (Abb. 8), ist diese Möglichkeit als Ursache der beobachteten STAT3-Phosphorylierung ausgeschlossen.

Es ist auch bekannt, dass STAT3 durch einige Wachstumsfaktoren aktiviert, wie beispielsweise PDGF (Vignais und Gilman, 1999) oder EGF (Zhong et al., 1994). Die Zellen in der Zellkultur sind über das im Nährmedium enthaltene FKS dauerhaft einer gewissen Menge an Wachstumsfaktoren ausgesetzt, welches für das Wachstum der Zellen auch von wichtiger Bedeutung ist. Diese Wachstumsfaktoren bewirken, dass sich STAT3 – im Gegensatz zu STAT1 – in einen regelmäßigen Kreislauf mit Aktivierung und darauffolgender Induktion der

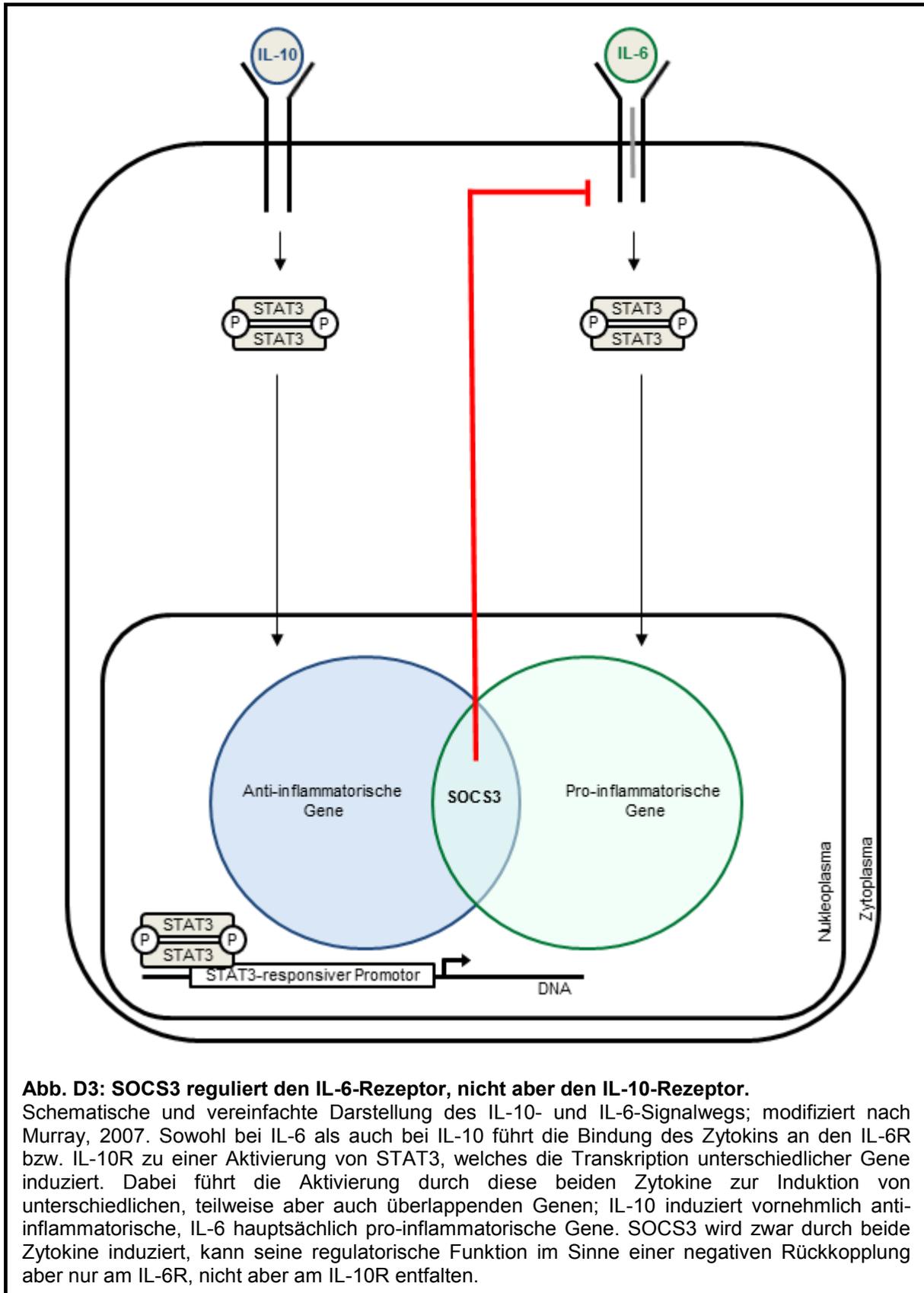
negativen Rückkopplung befindet. Wird dieser Kreislauf nun durch den potentiellen Inhibitor von MCMV unterbunden, kommt es zu einer Akkumulation von Y705-phosphoryliertem STAT3. Dass die im FKS enthaltenen Wachstumsfaktoren einen verstärkenden Einfluss auf die MCMV-induzierte STAT3-Phosphorylierung haben, ist auch in Abbildung 6 dargestellt.

3.4. Potentielle evolutionäre Vorteile für MCMV durch die Inhibition der STAT3-abhängigen Signaltransduktion

Die Funktion der STAT-Moleküle STAT1 und STAT2 beschränkt sich zu großen Teilen auf die Generierung der antiviralen Antwort durch Interferone (Levy und Darnell, 2002). Aus diesem Grund stellt die Antagonisierung dieses Signalwegs durch MCMV einen Replikationsvorteil für das Virus dar, der die evolutionäre Entwicklung dieser Immunevasionsmechanismen plausibel erklärt. Die Herausarbeitung evolutionärer Vorteile durch eine Modulation von STAT3 hingegen gestaltet sich aufgrund der heterogenen, teilweise widersprüchlichen Funktionen (s. Einleitung) von STAT3 als kompliziert. Da die genauen Zusammenhänge zwischen der Aktivierung von STAT3 und seiner Wirkung zum Teil noch nicht erforscht sind, kann in vielen Punkten auch noch keine endgültige Schlussfolgerung erfolgen. Trotzdem soll hier versucht werden, einige Zusammenhänge und potentielle Replikationsvorteile für MCMV durch die Inhibition der STAT3-Signaltransduktion herauszuarbeiten.

3.4.1. Bedeutung von SOCS3 für die Differenzierung zwischen der pro- und anti-inflammatorischen Antwort durch IL-6 bzw. IL-10

Wie bereits erwähnt, ist STAT3 als Mediator sowohl an der pro-inflammatorischen Antwort des IL-6 (Heinrich et al., 1998) als auch an der anti-inflammatorischen Antwort des IL-10 (Moore et al., 2001) entscheidend beteiligt. Normalerweise würde man erwarten, dass es für das Virus einen Replikationsvorteil ergäbe, wenn es die inflammatorische IL-6-Antwort inhibieren, gleichzeitig aber die anti-inflammatorische IL-10-Antwort induzieren würde. Die Inhibition der anti-inflammatorischen Wirkung von IL-10 hingegen wäre nicht plausibel und stünde auch im Widerspruch zu der bisherigen Datenlage.



Bei der Betrachtung des IL-10- und IL-6-Signalwegs stellt sich die Frage, wie es sein kann, dass beide Zytokine hauptsächlich STAT3-Homodimere als Mediator benutzen, trotzdem aber

größtenteils gegensätzliche Effekte in der Zelle hervorrufen? Hier hat sich SOCS3 als entscheidendes Protein zur Differenzierung zwischen der Wirkung dieser beiden Zytokine herausgestellt. Denn im Gegensatz zu dem IL-10R wird der IL-6R durch SOCS3 reguliert (Abb. D3) (Lang et al., 2003; Murray, 2007). Interessanterweise wird die Wirkung von IL-6 in Abwesenheit von SOCS3 umgekehrt, sodass die Behandlung von SOCS3^{-/-}-Zellen mit IL-6 zu einer der Wirkung von IL-10 ähnelnden, anti-inflammatorischen Antwort führt (Yasukawa et al., 2003; Murray, 2006). Die Inhibition der Transkription von SOCS3 kann somit eine anti-inflammatorische Antwort imitieren und einen deutlichen Replikationsvorteil für MCMV darstellen.

Hier kann eine Parallele zum NS1-Protein des humanen Parvovirus B19 gezogen werden: Für dieses Protein ist beschrieben, dass es die Y705-Phosphorylierung von STAT3 induziert. Gleichzeitig wird aber die Induktion von SOCS3 gehemmt – vermutlich über eine Interaktion von NS1 mit dem SOCS3-Promotor (Duechting et al., 2008). Da MCMV zusätzlich auch die Transkription anderer STAT3-Zielgene inhibiert (IRF-1 und STAT3, s. Abb. 14), wird sich der Mechanismus der MCMV-bedingten STAT3-Modulation wahrscheinlich von der beschriebenen Inhibition durch das humanen Parvovirus B19 unterscheiden; trotzdem zeigt dieser Punkt, dass die Inhibition von SOCS3 auch von anderen Viren als Immunevasionsmechanismus ausgenutzt wird.

3.4.2. Negative Regulation der STAT1-abhängigen Typ I IFN-Antwort durch die Akkumulation von Y705-phosphoryliertem STAT3

Es ist bekannt, dass Y705-phosphoryliertes STAT3 die Transkriptionsaktivität von STAT1 und somit auch die antivirale Wirkung von Typ I IFN negativ beeinflusst, was vermutlich durch die folglich vermehrte Bildung von STAT3:STAT1-Heterodimeren an Stelle von STAT1:STAT1-Homodimeren und der folglich weniger effizienten Typ I IFN-Signaltransduktion bedingt ist; so konnte gezeigt werden, dass STAT3 die IFN- α induzierte Expression von IRF-1, CXCL9 und CXCL10 inhibiert (Ho und Ivashkiv, 2006). Auf diese Weise könnte das durch die Inhibition der negativen Rückkopplung (SOCS3) akkumulierte Y705-phosphorylierte STAT3 eine antivirale Wirkung entfalten.

3.4.3. Reduktion des STAT3-Gesamtgehalts führt zu einer Inhibition der pro-inflammatorischen Wirkung des nicht-phosphorylierten STAT3

Eine weitere Wirkung der von uns vermuteten Inhibition der STAT3-Signaltransduktion durch MCMV ist die Reduktion des STAT3-Gesamtgehalts. Somit wird auch die Menge des nicht-phosphorylierten STAT3 im Zytoplasma reduziert. Hierbei muss in Betracht gezogen werden, dass STAT3 abgesehen von dem kanonischen Signaltransduktionsweg (Y705-Phosphorylierung mit folgender Homodimerisierung) auch über einen weiteren, nicht-kanonischen Signalweg transduzieren kann: Die durch IL-6 hervorgerufene Aktivierung bzw. Y705-Phosphorylierung von STAT3 führt normalerweise wegen der autoregulativen Eigenschaft von STAT3 zu einer Akkumulation von unphosphoryliertem STAT3 (U-STAT3) im Zytoplasma. Das U-STAT3 bildet zusammen mit unphosphoryliertem NF- κ B einen Transkriptionskomplex, der unterschiedliche Gene induziert – darunter die Expression von pro-inflammatorischen Proteinen wie RANTES, IFN- β oder IL-6 selbst (Yang et al., 2007; Yang und Stark, 2008). Somit führt die Reduktion des STAT3-Gesamtgehalts bzw. die Inhibition der verstärkten STAT3-Expression zu einem Ausbleiben der Induktion dieser pro-inflammatorischen Zytokine, was einen Replikationsvorteil für MCMV darstellen könnte.

Es ist bekannt, dass die Infektion mit MCMV die Expression von IFN- β (Le et al., 2008b) bzw. die Infektion mit HCMV die Expression von IFN- β und RANTES (Taylor und Bresnahan, 2005) inhibiert. Die dargestellten Zusammenhänge könnten eine Ursache für diese Inhibition darstellen.

3.5. Bedeutung von STAT3 β für die Replikation von MCMV

Durch alternatives Spleißen werden aus der STAT3-prä-mRNA die beiden Isoformen STAT3 α und STAT3 β generiert. Dabei ist STAT3 β dadurch gekennzeichnet, dass die 55 C-terminalen Aminosäuren – inkl. der S727-Transaktivierungsdomäne – durch einen spezifischen, 7 Aminosäuren umfassenden Rest ersetzt werden (Abb. 7A) (Schaefer et al., 1995) (Näheres s. Einleitung).

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die nach MCMV-Infektion zu beobachtende, verstärkte Y705-Phosphorylierung von STAT3 sowohl STAT3 α als auch STAT3 β betrifft (Abb. 7B). Dabei wurde in STAT3^{flox/flox}-Zellen, die beide Isoformen exprimieren, deutlich geringere Mengen an STAT3 β als STAT3 α nachgewiesen, was auch in anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden konnte (Schaefer et al., 1995; Yoo et al., 2002). Interessant ist,

Diskussion

dass in STAT3 α -defizienten Zellen, die dementsprechend nur STAT3 β exprimieren, deutlich größere Mengen an Y705-phosphoryliertem STAT3 β vorzufinden sind als in der Vergleichszelle, was nahelegt, dass beide Isoformen um das MCMV-kodierte, phosphorylierende Prinzip konkurrieren könnten.

Die Rolle von STAT3 β ist noch nicht hinreichend geklärt; es wurde aber gezeigt, dass STAT3 β eine regulierende Funktion bei immunologischen Abläufen besitzt. So führt die Deletion von STAT3 β *in vivo* dazu, dass mit Lipopolysaccharid (LPS) behandelte Mäuse mit einer prolongierten inflammatorischen Reaktion antworten und u.a. mit akuter tubulärer Nekrose in der Niere sowie mit einem endotoxischen Schock, der gehäuft zum Tode führt, reagieren (Yoo et al., 2002). Maritano und Mitarbeiter konnten beobachten, dass STAT3 β -defiziente peritoneale Makrophagen nach Behandlung mit LPS oder IFN- γ signifikant höhere Mengen an IL-6 und TNF- α sezernierten. Andererseits reagierten diese Makrophagen auf die Behandlung mit LPS bzw. IFN- γ auch mit einer signifikant geringeren Sekretion von IL-10 als die jeweilige Vergleichszelle. Diese Befunde deuten an, dass STAT3 β der inflammatorischen Reaktion entgegenwirkt und diese abschwächend reguliert (Maritano et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde zusätzlich gezeigt, dass MCMV eine deutliche Attenuierung der Replikation auf STAT3 β -defizienten Zellen aufweist (Abb. 17). Wenn man die oben dargelegten Daten bzgl. der Funktion von STAT3 β berücksichtigt, könnte die attenuierte Virusreplikation mit einer verstärkten inflammatorischen Reaktion bei STAT3 β -Defizienz erklärt werden. Eine Hyperreagibilität nach MCMV-Infektion könnte zu einer verstärkten antiviralen Reaktion führen, welche die Replikation inhibiert.

In diesem Zusammenhang besteht die Möglichkeit, dass der potentielle MCMV-kodierte Inhibitor der STAT3-Signaltransduktion spezifisch die Transkription durch eine der beiden STAT3-Isoformen inhibiert und somit eine Deregulation des Gleichgewichts zwischen diesen beiden Mediatoren hervorruft, die letztendlich einen proviralen Effekt haben könnte. Ein möglicher Kandidat hierbei wäre p300/CBP: Bei diesem Co-Aktivatoren der STAT-Signaltransduktion ist bekannt, dass er an die C-terminale Transaktivierungsdomäne bindet und seine Wirkung in Abhängigkeit von der Phosphorylierung des sich in diesem Bereich befindlichen Serins S727 entfaltet (Levy und Darnell, 2002; Schuringa et al., 2001). Da STAT3 β diese Transaktivierungsdomäne fehlt (Schaefer et al., 1995), ist davon auszugehen, dass das aktivierte STAT3 β -Dimer nicht dazu fähig ist, p300/CBP zu rekrutieren (Maritano et al., 2004), was bedeutet, dass STAT3 β unabhängig von p300/CBP wirken kann. Eine MCMV-kodierte Inhibition von p300/CBP würde somit eine spezifische Inhibition von STAT3 α mit

einer Aberration des STAT3 α /STAT3 β -Gleichgewichts zu Gunsten von STAT3 β bewirken. Wie oben dargelegt wurde, führt das Fehlen von STAT3 β zu einer verstärkten inflammatorischen Reaktion; dementsprechend ist es wahrscheinlich, dass eine Verstärkung der Wirkung von STAT3 β eine dämpfende Wirkung auf die inflammatorische Reaktion der Zelle hat und somit einen proviralen Effekt hervorruft.

Bei Betrachtung der Wachstumskurven ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich bei den STAT3 β -defizienten Zellen um krisen-immortalisierte Zelllinien handelt. Im Rahmen der Selektion besteht die Möglichkeit, dass durch Mutationen Veränderungen in der Zelle hervorgerufen werden, welche die Suszeptibilität der Zellen für eine virale Infektion herabsetzen können. Da STAT3 β -defiziente Mäuse bereits generiert wurden (Yoo et al., 2002; Maritano et al., 2004) wäre es zur Verifizierung dieser Daten aufschlussreich, Wachstumskurven für MCMV in STAT3 β -defizienten primären murinen embryonalen Fibroblasten oder *in vivo* in STAT3 β -defizienten Mäusen durchzuführen.

3.6. Die Rolle von STAT3 nach Infektion mit HCMV

3.6.1. Infektion mit HCMV bewirkt im Infektionsverlauf eine Y705-Phosphorylierung von STAT3

HCMV inhibiert den Jak-STAT-Signalweg durch unterschiedliche Mechanismen (Miller et al., 1998; Le Roy et al., 1999; Baron und Davignon, 2008); beispielsweise konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass HCMV die Menge an STAT2-Protein reduziert, vermutlich durch proteasomale Degradation (Le et al., 2008a). Bekannt ist auch, dass die Infektion mit HCMV zu einer proteasomalen Degradation von Jak1 führt, wodurch die Phosphorylierung bzw. Aktivierung unterschiedlicher STAT-Proteine deutlich inhibiert wird (Miller et al., 1998).

Die Inhibition der IL-6- und IFN- γ -induzierten Y705- bzw. Y701-Phosphorylierung von STAT3 bzw. STAT1 konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden (Abb. 18). Hierbei war aber auffallend, dass die Infektion mit HCMV trotz initialer Inhibition zu späten Zeitpunkten nach Infektion (72 h und 168 h) eine konstitutive Y705-Phosphorylierung von STAT3 hervorruft (Abb. 18, Spuren 15-20). Dabei stellt sich die Frage, inwieweit die HCMV-induzierte STAT3-Phosphorylierung mit dem nach MCMV-Infektion beobachteten Y705-phosphorylierten STAT3 zu vergleichen ist. Soweit können gewisse Unterschiede festgestellt werden: Die STAT3-Phosphorylierung wird nach HCMV-Infektion initial inhibiert und ist erst zu

einem sehr späten Zeitpunkt nach Infektion vorzufinden. Zudem wird die Gesamtmenge an STAT3 im Gegensatz zu der Situation nach MCMV-Infektion nicht reduziert; da STAT3 bekanntermaßen ein STAT3-responsives Gen ist, lässt dieser Punkt vermuten, dass es nach HCMV-Infektion nicht zu der bei MCMV beobachteten Inhibition der STAT3-Zielgene kommt. Zur Untersuchung des neu synthetisierten STAT3 könnten Experimente mit ³⁵S-markierten Proteinen oder die Messung der Transkription mittels Northern Blot weiteren Aufschluss geben. Auch die Untersuchung der Expression weiterer STAT3-Zielgene nach HCMV-Infektion wird Aufschluss über die Frage geben, ob das hier beobachtete, Y705-phosphorylierte STAT3 Infektion mit HCMV auch zu einer Induktion von STAT3-Zielgenen führt oder ob diese Induktion wie im Falle von MCMV inhibiert wird.

Die dargestellten Unterschiede in der STAT3-Modulation durch MCMV und HCMV legen zumindest den Verdacht nahe, dass sich das Prinzip der HCMV-induzierten STAT3-Phosphorylierung von der MCMV-bedingten Inhibition der STAT3-Signaltransduktion unterscheidet. Diese Fragestellung muss in Zukunft genauer untersucht werden.

3.6.2. Mögliche Mechanismen einer HCMV-induzierten STAT3-Phosphorylierung unter Berücksichtigung der proteasomalen Degradation von Jak1

Da sich die nach HCMV-Infektion beobachtete Phosphorylierung durch die Behandlung der Zellen mit IL-6 und IFN- γ nicht zusätzlich steigern lässt und zudem die Induktion der STAT1-Phosphorylierung durch diese Zytokine weiterhin inhibiert ist, ist davon auszugehen, dass der MCMV-kodierte Inhibitor – vermutlich der Jak1-Antagonist – weiterhin aktiv ist. Somit muss die Y705-Phosphorylierung von STAT3 unabhängig von Jak1 erfolgen, sodass sich die Frage stellt, welche Kinase das STAT3-Protein phosphoryliert.

Eine erste Vermutung wäre, dass die Phosphorylierung über weitere, gp130-assoziierte Tyrosinkinase aus der Jak-Gruppe bewerkstelligt wird – wie beispielsweise Jak2 oder Tyk2 (Heinrich et al., 1998). Dies ist aber aus zwei Gründen äußerst unwahrscheinlich: Erstens würde dies implizieren, dass die zu späten Zeitpunkten nach HCMV-Infektion zu beobachtende STAT3-Phosphorylierung durch Behandlung mit IL-6 zusätzlich zu steigern sein muss, was aber nicht der Fall ist (Abb. 19, Spur 17 und 20). Zweitens konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Jak1 nicht durch die Präsenz der anderen Kinasen kompensiert werden kann; bei Jak1-Defizienz ist die IL-6-induzierte Y705-Phosphorylierung von STAT3 deutlich inhibiert (Guschin et al., 1995). Aus diesen Punkten kann geschlussfolgert werden,

Diskussion

dass die konstitutive STAT3-Phosphorylierung durch einen anderen, Jak-unabhängigen Mechanismus hervorgerufen werden muss.

Mögliche Kandidaten hierfür wären EGF und PDGF. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die EGF-induzierte Y705-Phosphorylierung von STAT3 (Zhong et al., 1994) unabhängig von Jak1, Jak2 und Tyk2 abläuft, auch wenn diese Kinasen mit dem EGFR assoziiert sind; die Aktivierung von STAT3 wird über die intrinsische Kinasefunktion des EGFR hervorgerufen (Leaman et al., 1996). Da bekannt ist, dass die Infektion mit HCMV zu einer Aktivierung des EGFR führt (Bentz und Yurochko, 2008), kann dies eine mögliche Ursache für die beobachtete konstitutive STAT3-Phosphorylierung nach HCMV-Infektion sein. Zur weiteren Untersuchung dieses Sachverhalts wäre die Inhibition des EGFR mittels verfügbarer pharmakologischer Antagonisten (Ciardiello und Tortora, 2008) sinnvoll.

Ähnliches gilt auch für die Aktivierung von STAT3 durch PDGF, auch hier wird die Y705-Phosphorylierung von STAT3 unabhängig von Januskinasen hervorgerufen (Vignais et al., 1996). Dabei ist bekannt, dass der PDGFR- α für HCMV als Rezeptor für die Infektion fungiert: Die Interaktion des viralen Membranhüllproteins Glykoprotein B (gB) mit dem PDGFR- α führt zu einer Aktivierung dieses Rezeptors und in der Folge zu einer Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalwegs (Soroceanu et al., 2008; Cobbs, 2011). Somit besteht hier die Möglichkeit, dass die beobachtete konstitutive Y705-Phosphorylierung von STAT3 durch den PDGF-Rezeptor bewerkstelligt wird.

Ein weiterer, möglicher Kandidat für die Induktion der STAT3-Phosphorylierung ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF): Es ist bekannt, dass das HCMV-kodierte Protein US28 die Sekretion des VEGF induziert (Maussang et al., 2006; Cobbs, 2011). VEGF ist wiederum ein bekannter Aktivator von STAT3, der die Y705-Phosphorylierung von STAT3 induziert (Korpelainen et al., 1999; Bartoli et al., 2003). Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion von VEGF ist noch nicht beschrieben, doch besteht auch hier die Vermutung, dass die Aktivierung über rezeptorgebundene Tyrosinkinasen und somit unabhängig von Januskinasen hervorgerufen wird (Korpelainen et al., 1999; Yahata et al., 2003). Somit könnte US28 über die induzierte Sekretion von VEGF für die konstitutive STAT3-Aktivierung verantwortlich sein. Eine Testung der US28-defizienten HCMV-Mutante würde bei dieser Fragestellung weiteren Aufschluss geben.

3.6.3. Y705-Phosphorylierung von STAT3 als mögliche Ursache einer Assoziation von HCMV mit unterschiedlichen Karzinomen

Bei der Entstehung eines tumorösen Geschehens spielt die Dysregulation des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose eine entscheidende Rolle (Hanahan und Weinberg, 2011). Da STAT3 an der Steuerung dieser Vorgänge beteiligt ist, ist es naheliegend, dass eine konstitutive Aktivierung von STAT3 zu einer Dysregulation des Zellwachstums führen kann. Dies zeigt sich auch darin, dass konstitutiv aktiviertes STAT3 in einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen werden kann – wie beispielsweise dem Prostatakarzinom (Ni et al., 2000), dem Mammakarzinom (Burke et al., 2001; Garcia et al., 2001) und dem malignen Melanom (Niu et al., 2002a). STAT3 gilt somit als onkogenes Protein (Bromberg et al., 1999; Regis et al., 2008; Yu und Jove, 2004). Die Inhibition des konstitutiv aktivierten STAT3 in Karzinomen stellt ein zukünftiges Ziel für therapeutische Interventionen dar und ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Darnell, 2002).

Auf der anderen Seite wurde auch HCMV mit einigen spezifischen neoplastischen Erkrankungen assoziiert; hier kann man z.B. das Prostatakarzinom (Samanta et al., 2003), das Medulloblastom (Baryawno et al., 2011) und das Glioblastoma multiforme (Cobbs et al., 2002) nennen. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass noch nicht endgültig geklärt ist, ob HCMV ein onkogenes Virus ist, oder ob es sich lediglich um ein sogenanntes *onkomodulierendes* Virus handelt, dessen Infektion die Malignität eines Tumors zwar verstärkt, für diese aber nicht kausal verantwortlich ist (Michaelis et al., 2009; Johnsen et al., 2011; Soroceanu und Cobbs, 2011). Unabhängig davon, welche dieser beiden Eigenschaften HCMV besitzt, könnte die Assoziation von HCMV mit bestimmten Karzinomen – zumindest partiell – mit einer Aktivierung von STAT3 in Verbindung stehen (Cobbs, 2011), da viele STAT3-phosphorylierende Signalwege durch HCMV aktiviert werden (z.B. PDGF, cmvIL-10, VEGF). Die in dieser Arbeit beobachtete konstitutive STAT3-Phosphorylierung nach HCMV Infektion (s. Abb. 18) kann somit möglicherweise bei der Assoziation von HCMV mit bestimmten Karzinomen eine entscheidende Rolle spielen; hierfür ist allerdings zu klären, ob die beobachtete STAT3-Phosphorylierung auch eine Induktion von spezifischen STAT3-Zielgenen zur Folge hat.

Interessanterweise führt auch die Infektion mit anderen onkogenen Viren (Martin und Gutkind, 2008) zu einer Y705-Phosphorylierung von STAT3. So ist bekannt, dass das *core* Protein des Hepatitis C Virus die Aktivierung von STAT3 induziert und dieser Vorgang zu Proliferation und Transformation der infizierten Zellen führt (Yoshida et al., 2002). Auch für EBV ist beschrieben, dass das *latent membrane protein 1* (LMP1) die Aktivierung von

Diskussion

STAT3 induziert, was mit der Entstehung von EBV-induzierten Tumoren assoziiert ist (Chen et al., 2003; Buettner et al., 2006).

Die aufgeführten Zusammenhänge zwischen einer HCMV-induzierten STAT3-Phosphorylierung und der Entwicklung bestimmter Karzinome legen nahe, dass die Inhibition des aktivierten STAT3 oder aber eine antivirale Therapie zur Unterbindung einer HCMV-induzierten STAT3-Aktivierung ein potentielles Ziel der Tumorthherapie sein können.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

-80°C Schrank	Revco Ultima II Thermo Scientific über Welabo, Düsseldorf, Deutschland
-80°C Truhe	Hettich Freezer, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Deutschland
Blotting-Appratur	Fastblot B33/B34 (klein), Biometra, Göttingen, Deutschland Fastblot B64 (groß), Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophorese	Kammer für Proteingele (mittel): MAXI-Vertikal, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Foto-Entwickler	Curix 60, Agfa, Mortsel, Belgien
Geltrockner	Gel dryer 583, Biorad, München, Deutschland
Heizblöcke	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Thermostat plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inkubatoren	Heraeus BBD 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskope	TS100, Nikon, Düsseldorf, Deutschland Axiovert 40 CFL, Zeiss, Göttingen, Deutschland LSM 510 Meta, Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	Sharp
Spektralphotometer	UV-VIS Spectrophotometer UVmini 1240, Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Sterile Arbeitsbank	Hera Safe, Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstoff-Tank	Cryotherm Biosafe MD mit ApolloLIN Versorgungsbehälter
UV-Handlampe	Benda Laborgeräte (Ser. Nr. 7841200), Wiesloch, Deutschland
Vortexer	L46, Labinco, Breda, Niederlande
Wasserbad	GFL 1092, GFL, Burgwedel, Deutschland
Wiegeschüttler	GFL 3011, GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	3K30 Sigma, Sartorius, Göttingen, Deutschland 5415D (ungekühlt), Eppendorf, Hamburg, Deutschland 5417R (gekühlt), Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3K30, Sigma, Göttingen, Deutschland

4.1.2. Kits

ECL und ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare München, Deutschland)

Verwendung nach Anweisung des Herstellers.

4.1.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	Merck #1.00014.2511
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth #9592.2
β -Glycerophosphat	Sigma #G-9891
β -Mercaptoethanol	Roth #4227.2
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma #A9418-59
Bromphenolblau	Merck #1.08122.0005
Calciumchlorid	Roth #A119.1
Complete Protease Inhibitors	Roche #16974498
DAPI	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth #A994.2
Dithiothreitol (DTT)	Serva #20710
EDTA	Serva #11280
Essigsäure (96%)	Roth #X895.2
Ethanol	Merck #1.00983.2511
Ethidiumbromid 10 mg/ml Lsg.	Roth #2218.1
Filme	
24x30 BioMax MR	Kodak #8912560
35x43 BioMax MR	Kodak #8715187
Amersham Hyperfilme ECL	GE Healthcare # 90260
Formaldehyd 37%	Merck #1.04003
Glycerol	Merck #1.04093.1000
Glycin	Roth #3908.5

Material und Methoden

HEPES	Roth #9105.4
Isopropanol	Merck #1.09634.2511
Kaleidoscope Prestained Protein-Standard	Biorad #161-0324
Kaliumchlorid	Merck #1.04936.1000
Leupeptin	Sigma #L8884
Magermilchpulver	Sucofin, Comet, Düsseldorf
Methanol	Merck #1.06009.2500
Methocel MC	Fluka #64630
Minimal Essential Medium (MEM) 10x	Sigma #M0275
Natriumchlorid	Roth #3952.2
Natriumcarbonat	Merck #1.06392.1000
Natriumdesoxycholat	Merck #1.06504
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva #20763
Natriumfluorid (NaF)	Alexis #400-031-G025
Natriumhydrogencarbonat	Merck #K12610129
Natriumhydroxid	Merck # 6498.1000
NP40/IGEPAL	Sigma #I3021-100ml
OptiMEM	Invitrogen #31985
Paraformaldehyd (PFA)	Roth #0335.2
Pepstatin-A	Sigma #P4265
PMSF	Roth #6367.3
Reblot Plus Stripping Solution	Chemicon #2509
Rotiphorese-30-Acrylamid	Roth #3029.1
Rotiphorese-40-Acrylamid	Roth #A515.1
Saccharose	Roth #4621.1
Salzsäure	Roth #4625.1
Saran Folie	Dow
Sorbitol	Roth # 6213.1
TEMED	Roth # 2367.1
Transwell-Platten /-Einsätze	Corning Costar # 3450
Tris-Base	Roth #AF15.3
Triton-X-100	Serva #37240
Tween-20	Sigma #P1379
Whatman 3MM Chr Papier	Whatman #3030917

Whatman Protran Nitrocellulose Membran
Ziegenserum

Whatman #7067994

4.1.4. Puffer und Lösungen

1x Blot-Puffer (semi dry blotting)

48 mM Tris
28 mM Glycin
20% (v/v) Methanol

Bradford-Lösung

8,5% (v/v) Phosphorsäure
4,75% (v/v) Ethanol
100 mg/l Coomassie Blue G-250

Cytoplasmatischer Lysepuffer; pH 7,4

10 mM KCl
20 mM HEPES
0,2% (v/v) IGEPAL
1 mM EDTA
10% (v/v) Glycerol
0,1 mM Na-Vanadat (aktiviert)
0,1 mM PMSF
1 mM DTT
Complete Protease Inhibitors (Roche)

10x Laemmli-SDS-PAGE-Laufpuffer

252 mM Tris
1,92 mM Glycin
1% (w/v) SDS

Methylcellulose:

8,8 g Methylcellulose in 360 ml H₂O

Material und Methoden

40 ml 10x MEM
20 ml FKS
5 ml Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)
5 ml L-Glutamin (200 mM)
20 ml NaHCO₃ (55g/l)

MCMV-Saccharose-VSB-Kissen:

15% Saccharose
50 mM Tris/HCl; pH 7,8
12 mM KCl
5 mM EDTA

Nukleoplasmatischer Lysepuffer:

420 mM KCl
20 mM HEPES; pH 7,6
1 mM EDTA
20% (v/v) Glycerol
0,1 mM Na-Vanadat (aktiviert)
0,1 mM PMSF
1 mM DTT
Complete Protease Inhibitors (Roche)

RIPA+ Puffer:

50 mM TrisHCl; pH 7,5
150 mM NaCl
1% (v/v) IGEPAL
1% (w/v) Na-Deoxycholate
0,1% (w/v) SDS
1 mM DTT
0,2 mM PMSF
1 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Pepstatin
50 mM NaF
0,1 mM Na-Vanadat (aktiviert)

Complete Protease Inhibitors (Roche)

5x SDS-Probenpuffer:

0,25 M Tris/HCl; pH 6,8

25% (v/v) Glycerol

20% (w/v) SDS

0,5% (v/v) β -Mercaptoethanol

Eine Spitze Bromphenolblau

10x TBST:

100 mM Tris/HCl; pH 8,0

1,5 M NaCl

5% (v/v) Tween-20

4.1.5. Zytokine

IFN- γ :

Humanes IFN- γ von PBL Biomedical Laboratories, New Jersey, USA (#11500-2) wurde aliquotiert und bei -80° C aufbewahrt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen mit für 30 min mit 500 U/ml IFN- γ behandelt.

Hyper-IL-6:

Das Designer-Zytokin Hyper-IL-6 wurde freundlicherweise von PD Dr. J. Scheller und Prof. S. Rose-John, Institut für Biochemie, Carl-Albrechts-Universität zu Kiel, zur Verfügung gestellt (vorgestellt in (Peters et al., 1998)). Es handelt sich dabei um ein Fusionsprotein aus IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R) mit super-agonistischer Aktivität. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen für 30 min mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 behandelt.

Material und Methoden

mHTC-K2	Murine Hepatomazellen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Wolfram Brune, Robert-Koch-Institut, Berlin, Deutschland
MEF	Primäre murine embryonale Fibroblasten, Mausstamm C57BL/6
IL-6-defiziente MEF	Primäre murine embryonale Fibroblasten einer IL-6-defizienten Maus; vorgestellt in (Kopf et al., 1994)
IL-10-defiziente MEF	Primäre murine embryonale Fibroblasten einer IL-10-defizienten Maus (Kuhn et al., 1993)
Jak2-defiziente Zellen	Immortalisierte murine Zelllinie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Klaus Pfeffer, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universität Düsseldorf, Deutschland; vorgestellt in (Neubauer et al., 1998)
STAT3-/STAT3 α -/STAT3 β -defiziente Zellen und STAT3 ^{flox/flox} -Zellen	Immortalisierte Zelllinien, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Valeria Poli, Institut für Genetik, Biologie und Biochemie, Universität Turin, Italien; vorgestellt in (Maritano et al., 2004)

4.1.8. Viren

MCMV	Stamm MW97.01 („C3X“) (Messerle et al., 1997) und (Wagner et al., 1999)
HCMV	Stamm AD169 (Hengel et al., 1995)

4.1.9. Computerprogramme

Adobe Photoshop CS
Microsoft Office Word
Microsoft Office Excel
Microsoft Office Powerpoint

4.2. Methoden

4.2.1. Zellkultur

Die Arbeit mit eukaryontischen Zellen erfolgte unter den Bedingungen einer sterilen Arbeitsbank. Dabei gab es eine räumliche Trennung zwischen infizierten und uninfizierten Zellen. Die Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) kultiviert; sofern nicht anders angegeben, wurde dem Medium 10% hitzeinaktiviertes FKS und 1% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 80% Luftfeuchtigkeit, 37° C und 5% CO₂.

Zum Umsetzen der adhärennten Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit vorgewärmten PBS (37° C) gewaschen, um das restliche, sich auf dem Zellrasen befindende Medium zu entfernen. Die Zellen wurden mit Trypsin (0,5%, verdünnt in PBS) behandelt, sodass sich diese von dem Boden des Zellkulturgefäßes lösten. Je nach Umsetzschema wurden die Zellen in frischem, vorgewärmten Medium (37° C) resuspendiert und in ein neues Zellkulturgefäß übertragen.

4.2.1.1. Cryokonservierung

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff cryokonserviert. Zu diesem Zweck wurden sie bei einer Konfluenz von ca. 80% vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst (s.o.) und in 1 ml Einfriermedium aufgenommen (10% DMSO, 50% FKS im DMEM), in Einfrier Röhrchen überführt und in Cryo-Einfrierbehältern (Qualifreeze, Qualilab) bei -80° C eingefroren; dabei erfolgt eine langsame und schonende Temperatursenkung um 1° C/Stunde. Nachdem die Zellen für mindestens 24 h auf -80° C gehalten wurden, wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

4.2.1.2. Transwell-System

Das *Transwell*-System (Corning Costar) ist so aufgebaut, dass zwei Zellpopulationen durch eine mikroporöse Membran in zwei Kompartimente getrennt werden (*Well* und Membraneinsatz), sodass beide Zellpopulationen im selben Medium kultiviert werden, ohne direkten Zellkontakt zu haben. Die Poren der Membran hatten in diesem Fall einen Durchmesser von 0,4 µm. Somit bestand die Möglichkeit, dass von einer Zellpopulation

sezernierte Zytokine in das andere Kompartiment übertreten und die Zellen dieser Zellpopulation affektieren.

Die Zellen wurden in einem separaten Zellkulturgefäß mit der entsprechenden Infektionsdosis MCMV infiziert. Um die restlichen, im Medium befindlichen Viren zu entfernen, wurde 4 h nach Infektion ein Mediumwechsel vorgenommen. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit Hilfe von Trypsin von dem Zellkulturgefäß gelöst und auf den Membraneinsatz der *Transwell*-Platten übertragen. In dem *Well* der *Transwell*-Platten wurden uninfilzierte mock-Zellen ausgesät. Demzufolge bestand das *Transwell*-System aus einem infizierten und einem uninfilzierten Kompartiment, die im selben Medium kultiviert wurden. Die Zytokine, die möglicherweise von den infizierten Zellen sezerniert wurden, konnten somit auch die uninfilzierten Zellen affektieren. Im Westernblot konnte durch den Nachweis bzw. durch das Fehlen von IE1 pp89 nachgewiesen werden, dass nur eine der beiden Zellpopulationen infiziert wurde.

4.2.2. Virologische Methoden

4.2.2.1. Stock-Präparation

20-30 175 cm² Zellkulturflaschen mit MEF (Passage 3) wurden mit MCMV (Infektionsdosis ca. 0,05 PFU/Zelle) infiziert und für 6-9 d inkubiert. In der Folge wurden Medium und Zellen in Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 5.000 g und 10° C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde für weitere 3 h bei 20.000 g und 10° C zentrifugiert. Darauf folgend wurde der Überstand verworfen, das Pellet, das die MCMV-Virionen beinhaltet, wurde über Nacht bei 4° C auf Eis gelagert. Am nächsten Morgen wurde das Virus-Pellet mit Hilfe eines *douncers* homogenisiert und auf ein Saccharosekissen (15% Saccharose/VSB) übertragen. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, die Probe wurde für 1 h bei 60.000 g und 10° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 2-4 ml 15%-Saccharose/VSB überschichtet und über Nacht bei 4° C auf Eis gelagert. Am nächsten Morgen wurde das Pellet resuspendiert, mit Hilfe eines *douncers* homogenisiert und anschließend aliquotiert (20-50 µl/Aliquot). Die Aliquots wurden bei -80° C aufbewahrt.

4.2.2.1. Titration

Die Virustitration der MCMV-enhaltenden Medien erfolgte auf MEF. Zu diesem Zweck wurden die MEF in der dritten Passage auf 48-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Das MCMV-enhaltende Medium wurde auf diesen Zellen in 1:10 Verdünnungsschritten titriert. Die Infektion wurde mit dem sog. *centrifugal enhancement* (s.u.) verstärkt. Die Platten wurden für 2 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und mit einem semi-soliden, Methylcellulose-haltigen Medium ersetzt, damit sich die Viren nicht über den Überstand ausbreiten können; mit Hilfe dieses Verfahrens wurde das Auftreten von sekundären Plaques verhindert und somit die ursprüngliche Zahl der im Medium enthaltenen Viren ermittelt. Die Platten wurden für 4-5 d bei 37° C inkubiert. In der Folge wurde die Anzahl der Plaques mikroskopisch ermittelt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors auf die Einheit PFU/Zelle zurückgerechnet.

Jedes Titrationsexperiment erfolgte im Doppelansatz, wobei jeder Ansatz zusätzlich zweimal titriert wurde ($n= 2*2$); aus den somit ermittelten Werten wurde jeweils der arithmetische Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung errechnet.

4.2.2.2. Infektion

Die Zellen wurden in den Zellkulturgefäßen mit der jeweils angegebenen Infektionsdosis infiziert, anschließend erfolgte das sog. *centrifugal enhancement*, bei dem die Zellen in einer Plattenzentrifuge zweimal (je 15 min 800g bei 25-28° C) zentrifugiert werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens wird eine gleichmäßige Infektion erreicht, zudem wird die Infektiosität um den Faktor 10-100 gesteigert.

4.2.2.3. Anfertigung von Wachstumskurven

Die Zellen wurden auf 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, wobei für jeden zu ermittelnden Zeitpunkt eine getrennte Zellkulturplatte benutzt wurde. Die Zellen wurden mit einer initialen Infektionsdosis von 0,05 oder 0,001 PFU/Zelle infiziert, anschließend erfolgte das sog. *centrifugal enhancement* (s.o.). Zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten wurde je eine komplette Zellkulturplatte bei -80° C cryokonserviert. Nach Ablauf der Dauer des

Experiments wurden alle zuvor eingefrorenen Platten auf 4° C aufgetaut nach dem oben angegebenen Verfahren (s. 4.2.2.1) titriert.

4.2.2.4. *Inaktivierung von Viren durch UV-Licht*

Die Viren wurden für 25 min im Abstand von 10 cm mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Dadurch wird die Entstehung von zahlreichen Genommutationen in der viralen DNA induziert, wodurch das Genom irreversibel geschädigt und das Virus inaktiviert wird. Die Effizienz der UV-Inaktivierung wird mit dem Ausbleiben der Plaques sowie der fehlenden Expression der entsprechenden Infektionskontrollen überprüft.

4.2.3. **Proteinbiochemische Methoden**

4.2.3.1. *Herstellung von Proteinlysaten (Gesamtzell-Lysate)*

Die adhärennten Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers (*cell scraper*, Renner) von dem Boden des Zellkulturgefäßes gelöst und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 100-300 g abzentrifugiert und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl eiskaltem RIPA⁺-Lysepuffer resuspendiert und für 20 min bei gelegentlichem Schwenken auf Eis inkubiert. Darauffolgend wurden die Proben für 25 min bei 16.000 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand stellt das Gesamtproteinlysate dar. Dieser wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt weiterverwendet oder zur Lagerung bei -20° C eingefroren.

4.2.3.2. *Herstellung von Proteinlysaten (Fraktionierte native Lysate)*

Die adhärennten Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers (*cell scraper*, Renner) von dem Boden des Zellkulturgefäßes gelöst, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 100-300 g abzentrifugiert. Nachdem die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen wurden, wurden sie in 100 µl eiskaltem zytoplasmatischen Lysepuffer vorsichtig resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 16 s zentrifugiert. Der aus diesem ersten

Material und Methoden

Zentrifugationsschritt gewonnene Überstand wurde für die weitere Verarbeitung des zytoplasmatischen Lysats verwendet, das Pellet für das nukleoplasmatische Lysat.

Der Überstand wurde für 10 min bei 16.700 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt stellt das zytoplasmatische Lysat dar. Dieses wurde aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert.

Das Pellet des ersten Zentrifugationsschritts wurde erneut mit eiskaltem PBS gewaschen und in 100 µl nukleoplasmatischen Lysepuffer resuspendiert. Die Proben wurden für 25 min und unter gelegentlichem Schwenken auf Eis inkubiert und anschließend für 25 min bei 13.000 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt stellt das nukleoplasmatische Lysat dar. Dieses wurde aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert.

Die Sauberkeit der Proben wurde im Westernblot mit dem fehlenden Nachweis von Lamin A/C in den zytoplasmatischen Lysaten bzw. IκBα in den nukleoplasmatischen Lysaten geprüft.

4.2.3.3. *Bradford-Bestimmung*

Um sicherzustellen, dass in den einzelnen Proben vergleichbare Proteinmengen vorzufinden sind, wurden diese vor der Gelelektrophorese mit Hilfe der Bradford-Bestimmung normalisiert. Dabei wurden jeweils 5 µl des Proteinlysats mit 995 µl der Bradford-Lösung vermischt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Die Proben wurden für die weitere Verwendung entsprechend der gemessenen Extinktionswerte verdünnt. Die erfolgreiche Normalisierung des Proteingehalts der einzelnen Proben wurde mit Hilfe der Ponceau-Färbung und eines β-Aktin-spezifischen Antikörpers im Westernblot kontrolliert.

4.2.3.4. *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteinproben nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt; mit Hilfe des SDS wird die Eigenladung der Proteine maskiert, sodass diese keinen Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit der Proteine nimmt. Das Prinzip dieser Methode basiert auf U. K. Laemmli (Laemmli, 1970).

Material und Methoden

Vor dem Auftragen der Proteine wurden diese mit einem Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95° C denaturiert. Für die Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche Gele verwendet, bei denen die Gele aus einem Sammel- und einem Trenngel bestehen.

Die Anfertigung der Gele erfolgte nach dem folgenden Schema (Angabe jeweils für zwei Gele mittlerer Größe):

	Trenngel	Sammelgel
Polyacrylamid 30% (PAA)	24 ml	6 ml
TrisHCl 0,5 M pH 6,8	-	4,8 ml
TrisHCl 2 M pH 8,0	15,2 ml	-
SDS 20%	360 µl	180 µl
Saccharose 60%	-	8,4 ml
H ₂ O	31,8 ml	16,8 ml
TEMED	144 µl	48 µl
APS 10%	800 µl	200 µl

Es wurden jeweils 10-50 µl der normalisierten Proteinproben auf die Gele aufgetragen. Die Gele wurden über Nacht (17 h) bei 4° C gefahren; dabei wurde (bei zwei parallel gefahrenen Gelen) eine Stromstärke von 12 mA und eine Spannung von 150 V angesetzt.

4.2.3.5. Westernblot

Durch den Westernblot können die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden die Proteine mittels eines *semi-dry*-Blotverfahrens auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies geschieht in einem Elektrobloetter (Biometra): Auf die Anode werden drei mit Blotting-Puffer getränkte Whatman-Filterpapiere sowie die ebenfalls in Blotting-Puffer äquilibrierte Nitrocellulosemembran gelegt. Auf diese folgt das die Proteine enthaltende Gel, welches von drei weiteren, mit Blotting-Puffer getränkten, Whatman-Papieren und der den Versuchsaufbau abschließenden Kathode bedeckt wird. Die Proteine wurden über 90 min bei einer Stromstärke von 1000 mA und einer Spannung von 16 V auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Sofern keine phosphorylierten Proteine nachgewiesen werden sollten, wurden mit

Ponceau-Rot gefärbt, um den Erfolg des Proteintransfers sowie die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung zu kontrollieren. Mit Hilfe von TBST-Lösung wurde die Ponceau-Färbung wieder entfernt.

Durch eine 40-minütige Behandlung der proteinbeladenen Nitrocellulosemembran mit 5% in TBST gelöstem Milchpulver wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4° C mit in 1% Milchpulver/TBST gelöstem Primäantikörper inkubiert. Die nichtgebundenen Antikörper wurden durch 2-3 Waschvorgänge zu je ca. 5 min entfernt. Anschließend erfolgte eine mindestens 40-minütige Inkubation mit einem POD-gekoppelten, gegen den Primäantikörper gerichteten Sekundäantikörper, der auch in 1% Milchpulver/TBST gelöst war. Nachdem die nichtgebundenen Antikörper durch 4-6 ca. 5-10 min andauernde Waschvorgänge entfernt wurden, wurde die Membran getrocknet und mit einer Entwicklerlösung (ECL-Kit, GE Healthcare) behandelt. Mit Hilfe von entsprechenden Filmen (GE Healthcare oder Kodak) wurden die Proteinbanden detektiert.

4.2.3.6. *Immunfluoreszenzfärbung (IF)*

Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, erfolgte die Fixation der Zellen durch eine 15-minütige Behandlung mit 4% (v/v) Paraformaldehyd (gelöst in PBS, RT). Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen durch eine 10-minütige Behandlung mit 0,1% (v/v) Triton-X-100 (gelöst in PBS, RT) permeabilisiert. Das Triton-X-100 wurde durch 2-3 Waschschriften zu je 2-5 min entfernt. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubation der Zellen mit einer Blockierungslösung (2% FKS oder 2% Ziegen Serum in PBS) bei RT. Nach dem Blockieren wurden die Zellen für 1 h bei RT mit dem Primäantikörper inkubiert (entsprechende Verdünnung in 10% Blockierungslösung). Nach 3 Waschschriften zu je ca. 10 min erfolgte eine mindestens 45-minütige Inkubation bei RT mit dem Sekundäantikörper Cy2 oder Cy3 (Verdünnung 1:500 in 10% Blockierungslösung) sowie mit Hoechst (Verdünnung 1:10.000), einer Substanz, die durch die DNA durch Interkalierung färbt und somit den Zellkern sichtbar macht. Nach drei weiteren Waschschriften zu je ca. 10 min wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit einem konventionellen Mikroskop (Nikon TE2000) oder einem Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 510 Meta) ausgewertet.

Referenzen

- Aaronson, D.S., and C.M. Horvath. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296:1653-1655.
- Abell, K., A. Bilancio, R.W. Clarkson, P.G. Tiffen, A.I. Altaparmakov, T.G. Burdon, T. Asano, B. Vanhaesebroeck, and C.J. Watson. 2005. Stat3-induced apoptosis requires a molecular switch in PI(3)K subunit composition. *Nature cell biology* 7:392-398.
- Akira, S. 1999. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 17:138-146.
- Akira, S. 2000. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 19:2607-2611.
- Akira, S., Y. Nishio, M. Inoue, X.J. Wang, S. Wei, T. Matsusaka, K. Yoshida, T. Sudo, M. Naruto, and T. Kishimoto. 1994. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77:63-71.
- Almeida, G.D., C.D. Porada, S. St Jeor, and J.L. Ascensao. 1994. Human cytomegalovirus alters interleukin-6 production by endothelial cells. *Blood* 83:370-376.
- Aoki, Y., G.M. Feldman, and G. Tosato. 2003. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood* 101:1535-1542.
- Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Mullberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schutz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J.F. Schlaak, H.A. Lehr, F. Autschbach, G. Schurmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P.R. Galle, S. Rose-John, and M.F. Neurath. 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature medicine* 6:583-588.
- Baichwal, V.R., and B. Sugden. 1988. Latency comes of age for herpesviruses. *Cell* 52:787-789.
- Baron, M., and J.L. Davignon. 2008. Inhibition of IFN-gamma-induced STAT1 tyrosine phosphorylation by human CMV is mediated by SHP2. *J Immunol* 181:5530-5536.
- Bartoli, M., D. Platt, T. Lemtalsi, X. Gu, S.E. Brooks, M.B. Marrero, and R.B. Caldwell. 2003. VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells. *FASEB journal* 17:1562-1564.
- Baryawno, N., A. Rahbar, N. Wolmer-Solberg, C. Taher, J. Odeberg, A. Darabi, Z. Khan, B. Sveinbjornsson, O.M. FuskevAg, L. Segerstrom, M. Nordenskjold, P. Siesjo, P. Kogner, J.I. Johnsen, and C. Soderberg-Naucler. 2011. Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target. *The Journal of clinical investigation* 121:4043-4055.

Referenzen

- Becker, S., B. Groner, and C.W. Muller. 1998. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 394:145-151.
- Becker, S., J. Quay, and J. Soukup. 1991. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol* 147:4307-4312.
- Bentz, G.L., and A.D. Yurochko. 2008. Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and beta1 and beta3 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:5531-5536.
- Berenguer, J., and J. Mallolas. 2000. Intravenous cidofovir for compassionate use in AIDS patients with cytomegalovirus retinitis. Spanish Cidofovir Study Group. *Clinical infectious diseases* 30:182-184.
- Birx, D.L., R.R. Redfield, K. Tencer, A. Fowler, D.S. Burke, and G. Tosato. 1990. Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection. *Blood* 76:2303-2310.
- Blyussen, H.A., and D.E. Levy. 1997. Stat2 is a transcriptional activator that requires sequence-specific contacts provided by stat1 and p48 for stable interaction with DNA. *The Journal of biological chemistry* 272:4600-4605.
- Boehme, K.W., M. Guerrero, and T. Compton. 2006. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol* 177:7094-7102.
- Boeuf, H., C. Hauss, F.D. Graeve, N. Baran, and C. Kedinger. 1997. Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* 138:1207-1217.
- Bogdan, C., Y. Vodovotz, and C. Nathan. 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *The Journal of experimental medicine* 174:1549-1555.
- Boppana, S.B., K.B. Fowler, W.J. Britt, S. Stagno, and R.F. Pass. 1999. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 104:55-60.
- Boppana, S.B., R.F. Pass, W.J. Britt, S. Stagno, and C.A. Alford. 1992. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *The Pediatric infectious disease journal* 11:93-99.
- Botto, S., D.N. Strelow, V. DeFilippis, L. White, C.N. Kreklywich, P.P. Smith, and P. Caposio. 2011. IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin. *Blood* 117:352-361.
- Bowman, T., and R. Jove. 1999. STAT Proteins and Cancer. *Cancer control* 6:615-619.
- Braat, H., P. Rottiers, D.W. Hommes, N. Huyghebaert, E. Remaut, J.P. Remon, S.J. van Deventer, S. Neiryck, M.P. Peppelenbosch, and L. Steidler. 2006. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clinical gastroenterology and hepatology* 4:754-759.

Referenzen

- Braunstein, J., S. Brutsaert, R. Olson, and C. Schindler. 2003. STATs dimerize in the absence of phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 278:34133-34140.
- Bromberg, J.F., M.H. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R.G. Pestell, C. Albanese, and J.E. Darnell, Jr. 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell* 98:295-303.
- Brune, W., C. Menard, J. Heesemann, and U.H. Koszinowski. 2001. A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* 291:303-305.
- Budt, M., H. Reinhard, A. Bigl, and H. Hengel. 2004. Herpesviral Fcγ receptors: culprits attenuating antiviral IgG? *International Immunopharmacology* 4:1135-1148.
- Buettner, M., N. Heussinger, and G. Niedobitek. 2006. Expression of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane proteins and STAT3 activation in nasopharyngeal carcinoma. *Virchows Archiv* 449:513-519.
- Burke, W.M., X. Jin, H.J. Lin, M. Huang, R. Liu, R.K. Reynolds, and J. Lin. 2001. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene* 20:7925-7934.
- Caldenhoven, E., T.B. van Dijk, R. Solari, J. Armstrong, J.A. Raaijmakers, J.W. Lammers, L. Koenderman, and R.P. de Groot. 1996. STAT3β, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *The Journal of biological chemistry* 271:13221-13227.
- Canaff, L., X. Zhou, and G.N. Hendy. 2008. The proinflammatory cytokine, interleukin-6, up-regulates calcium-sensing receptor gene transcription via Stat1/3 and Sp1/3. *The Journal of biological chemistry* 283:13586-13600.
- Cantwell, C.A., E. Sterneck, and P.F. Johnson. 1998. Interleukin-6-specific activation of the C/EBPδ gene in hepatocytes is mediated by Stat3 and Sp1. *Molecular and cellular biology* 18:2108-2117.
- Catlett-Falcone, R., T.H. Landowski, M.M. Oshiro, J. Turkson, A. Levitzki, R. Savino, G. Ciliberto, L. Moscinski, J.L. Fernandez-Luna, G. Nunez, W.S. Dalton, and R. Jove. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10:105-115.
- Chen, H., L. Hutt-Fletcher, L. Cao, and S.D. Hayward. 2003. A positive autoregulatory loop of LMP1 expression and STAT activation in epithelial cells latently infected with Epstein-Barr virus. *Journal of virology* 77:4139-4148.
- Chen, X., U. Vinkemeier, Y. Zhao, D. Jeruzalmi, J.E. Darnell, Jr., and J. Kuriyan. 1998. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93:827-839.
- Chou, S.W. 2001. Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 3 Suppl 2:20-24.
- Chowdary, T.K., T.M. Cairns, D. Atanasiu, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, and E.E. Heldwein. 2010. Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nature structural & molecular biology* 17:882-888.

Referenzen

- Chung, C.D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta, and K. Shuai. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278:1803-1805.
- Ciardello, F., and G. Tortora. 2008. EGFR antagonists in cancer treatment. *The New England journal of medicine* 358:1160-1174.
- Cobbs, C.S. 2011. Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis. *Herpesviridae* 2:10.
- Cobbs, C.S., L. Harkins, M. Samanta, G.Y. Gillespie, S. Bharara, P.H. King, L.B. Nabors, C.G. Cobbs, and W.J. Britt. 2002. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer research* 62:3347-3350.
- Costa-Pereira, A.P., S. Tininini, B. Strobl, T. Alonzi, J.F. Schlaak, H. Is'harc, I. Gesualdo, S.J. Newman, I.M. Kerr, and V. Poli. 2002. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8043-8047.
- Crumpacker, C.S. 1996. Ganciclovir. *The New England journal of medicine* 335:721-729.
- Darnell, J.E., Jr. 2002. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 2:740-749.
- Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, G.R. Stark. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-1421.
- Dauer, D.J., B. Ferraro, L. Song, B. Yu, L. Mora, R. Buettner, S. Enkemann, R. Jove, and E.B. Haura. 2005. Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene* 24:3397-3408.
- Davis-Poynter, N.J., and H.E. Farrell. 1996. Masters of deception: a review of herpesvirus immune evasion strategies. *Immunology and cell biology* 74:513-522.
- Davison, A.J. 2007. Overview of classification. In Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, editors. Cambridge.
- Davison, A.J., A. Dolan, P. Akter, C. Addison, D.J. Dargan, D.J. Alcendor, D.J. McGeoch, and G.S. Hayward. 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *The Journal of general virology* 84:17-28.
- Decker, T., and P. Kovarik. 2000. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19:2628-2637.
- Donnelly, R.P., H. Dickensheets, and D.S. Finbloom. 1999. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *Journal of interferon & cytokine research* 19:563-573.
- Dubin, G., E. Socolof, I. Frank, and H.M. Friedman. 1991. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal of virology* 65:7046-7050.

Referenzen

- Duechting, A., C. Tschope, H. Kaiser, T. Lamkemeyer, N. Tanaka, S. Aberle, F. Lang, J. Torresi, R. Kandolf, and C.T. Bock. 2008. Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells. *Journal of virology* 82:7942-7952.
- Duff, P. 2005. Immunotherapy for congenital cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine* 353:1402-1404.
- Ebers, G.C., PRISMS Study Group. 1998. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon β -1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352:1498-1504
- European Association For The Study Of The Liver. 2012. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology* 57:167-185
- Eliopoulos, A.G., M. Stack, C.W. Dawson, K.M. Kaye, L. Hodgkin, S. Sihota, M. Rowe, and L.S. Young. 1997. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene* 14:2899-2916.
- Enders, G., A. Daiminger, L. Lindemann, F. Knotek, U. Bader, S. Exler, and M. Enders. 2012. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in pregnant women, bone marrow donors and adolescents in Germany, 1996-2010. *Medical microbiology and immunology*
- Epling-Burnette, P.K., J.H. Liu, R. Catlett-Falcone, J. Turkson, M. Oshiro, R. Kothapalli, Y. Li, J.M. Wang, H.F. Yang-Yen, J. Karras, R. Jove, and T.P. Loughran, Jr. 2001. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *The Journal of clinical investigation* 107:351-362.
- Evans, P.C., A. Soin, T.G. Wreghitt, C.J. Taylor, D.G. Wight, and G.J. Alexander. 2000. An association between cytomegalovirus infection and chronic rejection after liver transplantation. *Transplantation* 69:30-35.
- Fiorentino, D.F., A. Zlotnik, T.R. Mosmann, M. Howard, and A. O'Garra. 1991a. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147:3815-3822.
- Fiorentino, D.F., A. Zlotnik, P. Vieira, T.R. Mosmann, M. Howard, K.W. Moore, and A. O'Garra. 1991b. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146:3444-3451.
- Fodil-Cornu, N., and S.M. Vidal. 2008. Type I interferon response to cytomegalovirus infection: the kick-start. *Cell host & microbe* 3:59-61.
- Forman, S.J., and J.A. Zaia. 1994. Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do we stand? *Blood* 83:2392-2398.
- Fortis, C., M. Foppoli, L. Gianotti, L. Galli, G. Citterio, G. Consogno, O. Gentilini, and M. Braga. 1996. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. *Cancer letters* 104:1-5.
- Fowler, K.B., S. Stagno, R.F. Pass, W.J. Britt, T.J. Boll, and C.A. Alford. 1992. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *The New England journal of medicine* 326:663-667.

Referenzen

- Fried, M.W., M.L. Shiffman, K.R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F.L. Gonçalves Jr, D. Häussinger, M. Diago, G. Carosi, D. Dhumeaux, A. Craxi, A. Lin, J. Hoffman, and J. Yu. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine* 347:975-982.
- Garcia-Blanco, M.A., and B.R. Cullen. 1991. Molecular basis of latency in pathogenic human viruses. *Science* 254:815-820.
- Garcia, R., T.L. Bowman, G. Niu, H. Yu, S. Minton, C.A. Muro-Cacho, C.E. Cox, R. Falcone, R. Fairclough, S. Parsons, A. Laudano, A. Gazit, A. Levitzki, A. Kraker, and R. Jove. 2001. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20:2499-2513.
- Gealy, C., M. Denson, C. Humphreys, B. McSharry, G. Wilkinson, and R. Caswell. 2005. Posttranscriptional suppression of interleukin-6 production by human cytomegalovirus. *Journal of virology* 79:472-485.
- Geist, L.J., and L.Y. Dai. 1996. Cytomegalovirus modulates interleukin-6 gene expression. *Transplantation* 62:653-658.
- Genovese, M.C., J.D. McKay, E.L. Nasonov, E.F. Mysler, N.A. da Silva, E. Alecock, T. Woodworth, and J.J. Gomez-Reino. 2008. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis and rheumatism* 58:2968-2980.
- Greenhalgh, C.J., and D.J. Hilton. 2001. Negative regulation of cytokine signaling. *Journal of leukocyte biology* 70:348-356.
- Grunstein, J., W.G. Roberts, O. Mathieu-Costello, D. Hanahan, and R.S. Johnson. 1999. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer research* 59:1592-1598.
- Grutz, G. 2005. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *Journal of leukocyte biology* 77:3-15.
- Guschin, D., N. Rogers, J. Briscoe, B. Witthuhn, D. Watling, F. Horn, S. Pellegrini, K. Yasukawa, P. Heinrich, G.R. Stark, and et al. 1995. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *The EMBO journal* 14:1421-1429.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
- Hanshaw, J.B., A.P. Scheiner, A.W. Moxley, L. Gaev, V. Abel, and B. Scheiner. 1976. School failure and deafness after "silent" congenital cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine* 295:468-470.
- Harker, J.A., G.M. Lewis, L. Mack, and E.I. Zuniga. 2011. Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science* 334:825-829.

Referenzen

- Harkins, L., A.L. Volk, M. Samanta, I. Mikolaenko, W.J. Britt, K.I. Bland, and C.S. Cobbs. 2002. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet* 360:1557-1563.
- Harrison, D.A. 2012. The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4:
- Hasegawa, Y., A. Goto, S. Nishimura, Y. Sukawa, K. Fujii, K. Suzuki, K. Yonezawa, T. Abe, Y. Shinomura, and Y. Yoshida. 2009. Cytomegalovirus gastritis after treatment with rituximab. *Endoscopy* 41 Suppl 2:E199.
- Hecker, M., D. Qiu, K. Marquardt, G. Bein, and H. Hackstein. 2004. Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. *Vox Sanguinis* 86:41-44.
- Heinrich, P.C., I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* 374:1-20.
- Heinrich, P.C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal* 334 (Pt 2):297-314.
- Heinrich, P.C., J.V. Castell, and T. Andus. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *The Biochemical journal* 265:621-636.
- Hengel, H., W. Brune, and U.H. Koszinowski. 1998. Immune evasion by cytomegalovirus-- survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends in microbiology* 6:190-197.
- Hengel, H., C. Esslinger, J. Pool, E. Goulmy, and U.H. Koszinowski. 1995. Cytokines restore MHC class I complex formation and control antigen presentation in human cytomegalovirus-infected cells. *The Journal of general virology* 76:2987-2997.
- Hevehan, D.L., W.M. Miller, and E.T. Papoutsakis. 2002. Differential expression and phosphorylation of distinct STAT3 proteins during granulocytic differentiation. *Blood* 99:1627-1637.
- Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi. 2000. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19:2548-2556.
- Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu, and et al. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324:73-76.
- Ho, H.H., and L.B. Ivashkiv. 2006. Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation. *The Journal of biological chemistry* 281:14111-14118.
- Ho, M. 2008. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical microbiology and immunology* 197:65-73.

Referenzen

- Holland, S.M., F.R. DeLeo, H.Z. Elloumi, A.P. Hsu, G. Uzel, N. Brodsky, A.F. Freeman, A. Demidowich, J. Davis, M.L. Turner, V.L. Anderson, D.N. Darnell, P.A. Welch, D.B. Kuhns, D.M. Frucht, H.L. Malech, J.I. Gallin, S.D. Kobayashi, A.R. Whitney, J.M. Voyich, J.M. Musser, C. Woellner, A.A. Schaffer, J.M. Puck, and B. Grimbacher. 2007. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *The New England journal of medicine* 357:1608-1619.
- Horvai, A.E., L. Xu, E. Korzus, G. Brard, D. Kalafus, T.M. Mullen, D.W. Rose, M.G. Rosenfeld, and C.K. Glass. 1997. Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:1074-1079.
- Humphreys, I.R., C. de Trez, A. Kinkade, C.A. Benedict, M. Croft, and C.F. Ware. 2007. Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *The Journal of experimental medicine* 204:1217-1225.
- Ichiba, M., K. Nakajima, Y. Yamanaka, N. Kiuchi, and T. Hirano. 1998. Autoregulation of the Stat3 gene through cooperation with a cAMP-responsive element-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 273:6132-6138.
- Isaacson, M.K., A.L. Feire, and T. Compton. 2007. Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *Journal of virology* 81:6241-6247
- Jenkins, B.J., A.W. Roberts, C.J. Greenhill, M. Najdovska, T. Lundgren-May, L. Robb, D. Grail, and M. Ernst. 2007. Pathologic consequences of STAT3 hyperactivation by IL-6 and IL-11 during hematopoiesis and lymphopoiesis. *Blood* 109:2380-2388.
- Jenkins, C., W. Garcia, A. Abendroth, and B. Slobedman. 2008a. Expression of a human cytomegalovirus latency-associated homolog of interleukin-10 during the productive phase of infection. *Virology* 370:285-294.
- Jenkins, C., W. Garcia, M.J. Godwin, J.V. Spencer, J.L. Stern, A. Abendroth, and B. Slobedman. 2008b. Immunomodulatory properties of a viral homolog of human interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection. *Journal of virology* 82:3736-3750.
- Johnsen, J.I., N. Baryawno, and C. Soderberg-Naucler. 2011. Is human cytomegalovirus a target in cancer therapy? *Oncotarget* 2:1329-1338.
- Just-Nubling, G., S. Korn, B. Ludwig, C. Stephan, H.W. Doerr, and W. Preiser. 2003. Primary cytomegalovirus infection in an outpatient setting--laboratory markers and clinical aspects. *Infection* 31:318-323.
- Kadonaga, J.T. 1998. Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92:307-313.
- Kato, T., E. Sakamoto, H. Kutsuna, A. Kimura-Eto, F. Hato, and S. Kitagawa. 2004. Proteolytic conversion of STAT3alpha to STAT3gamma in human neutrophils: role of granule-derived serine proteases. *The Journal of biological chemistry* 279:31076-31080.
- Katze, M.G., Y. He, and M. Gale, Jr. 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature reviews Immunology* 2:675-687.

Referenzen

- Kaufner, B.B., K.W. Jarosinski, and N. Osterrieder. 2011. Herpesvirus telomeric repeats facilitate genomic integration into host telomeres and mobilization of viral DNA during reactivation. *The Journal of experimental medicine* 208:605-615.
- Kile, B.T., and W.S. Alexander. 2001. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58:1627-1635.
- Kim, K.S., and R.I. Carp. 1971. Growth of murine cytomegalovirus in various cell lines. *Journal of virology* 7:720-725.
- Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga. 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86:1243-1254.
- Kopf, M., H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, and G. Köhler. 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368:339-42.
- Korpelainen, E.I., M. Karkkainen, Y. Gunji, M. Vikkula, and K. Alitalo. 1999. Endothelial receptor tyrosine kinases activate the STAT signaling pathway: mutant Tie-2 causing venous malformations signals a distinct STAT activation response. *Oncogene* 18:1-8.
- Kotenko, S.V., L.S. Izotova, B.P. Pollack, T.M. Mariano, R.J. Donnelly, G. Muthukumaran, J.R. Cook, G. Garotta, O. Silvennoinen, J.N. Ihle, and et al. 1995. Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *The Journal of biological chemistry* 270:20915-20921.
- Kotenko, S.V., S. Sacconi, L.S. Izotova, O.V. Mirochnitchenko, and S. Pestka. 2000. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:1695-1700.
- Krmpotic, A., I. Bubic, B. Polic, P. Lucin, and S. Jonjic. 2003. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes and infection* 5:1263-1277.
- Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lagneaux, L., A. Delforge, R. Snoeck, E. Bosmans, J.F. Moreau, J.L. Taupin, E. De Clercq, P. Stryckmans, and D. Bron. 1996. Human cytomegalovirus increases constitutive production of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *Blood* 87:59-66.
- Lalezari, J.P., R.J. Stagg, B.D. Kuppermann, G.N. Holland, F. Kramer, D.V. Ives, M. Youle, M.R. Robinson, W.L. Drew, and H.S. Jaffe. 1997. Intravenous cidofovir for peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. A randomized, controlled trial. *Annals of internal medicine* 126:257-263.
- Lang, R., A.L. Pauleau, E. Parganas, Y. Takahashi, J. Mages, J.N. Ihle, R. Rutschman, and P.J. Murray. 2003. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nature immunology* 4:546-550.

Referenzen

- Le Roy, E., A. Muhlethaler-Mottet, C. Davrinche, B. Mach, and J.L. Davignon. 1999. Escape of human cytomegalovirus from HLA-DR-restricted CD4(+) T-cell response is mediated by repression of gamma interferon-induced class II transactivator expression. *Journal of virology* 73:6582-6589.
- Le, V.T., M. Trilling, and H. Hengel. 2011. The cytomegaloviral protein pUL138 acts as potentiator of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 surface density to enhance ULb'-encoded modulation of TNF-alpha signaling. *Journal of virology* 85:13260-13270.
- Le, V.T., M. Trilling, M. Wilborn, H. Hengel, and A. Zimmermann. 2008a. Human cytomegalovirus interferes with signal transducer and activator of transcription (STAT) 2 protein stability and tyrosine phosphorylation. *The Journal of general virology* 89:2416-2426.
- Le, V.T., M. Trilling, A. Zimmermann, and H. Hengel. 2008b. Mouse cytomegalovirus inhibits beta interferon (IFN-beta) gene expression and controls activation pathways of the IFN-beta enhanceosome. *The Journal of general virology* 89:1131-1141.
- Leach, M.W., N.J. Davidson, M.M. Fort, F. Powrie, and D.M. Rennick. 1999. The role of IL-10 in inflammatory bowel disease: "of mice and men". *Toxicologic pathology* 27:123-133.
- Leaman, D.W., S. Pisharody, T.W. Flickinger, M.A. Commane, J. Schlessinger, I.M. Kerr, D.E. Levy, and G.R. Stark. 1996. Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Molecular and cellular biology* 16:369-375.
- Leung, S., S.A. Qureshi, I.M. Kerr, J.E. Darnell, Jr., and G.R. Stark. 1995. Role of STAT2 in the alpha interferon signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 15:1312-1317.
- Levy, D.E., and J.E. Darnell, Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews Molecular cell biology* 3:651-662.
- Levy, D.E., and C.K. Lee. 2002. What does Stat3 do? *The Journal of clinical investigation* 109:1143-1148.
- Li, H., J. Zhang, A. Kumar, M. Zheng, S.S. Atherton, and F.S. Yu. 2006. Herpes simplex virus 1 infection induces the expression of proinflammatory cytokines, interferons and TLR7 in human corneal epithelial cells. *Immunology* 117:167-176.
- Li, M.C., and S.H. He. 2004. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* 10:620-625.
- Liongue, C., L.A. O'Sullivan, M.C. Trengove, and A.C. Ward. 2012. Evolution of JAK-STAT pathway components: mechanisms and role in immune system development. *PLoS One* 7: e32777
- Liu, H., and R.M. Pope. 2003. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. *Current opinion in pharmacology* 3:317-322.
- Liu, Y., P.K. Li, C. Li, and J. Lin. 2010. Inhibition of STAT3 signaling blocks the anti-apoptotic activity of IL-6 in human liver cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 285:27429-27439.

Referenzen

- Look, D.C., M.R. Pelletier, R.M. Tidwell, W.T. Roswit, and M.J. Holtzman. 1995. Stat1 depends on transcriptional synergy with Sp1. *The Journal of biological chemistry* 270:30264-30267.
- Lorenzon, E., R. Colladel, E. Andreuzzi, S. Marastoni, F. Todaro, M. Schiappacassi, G. Ligresti, A. Colombatti, and M. Mongiat. 2011. MULTIMERIN2 impairs tumor angiogenesis and growth by interfering with VEGF-A/VEGFR2 pathway. *Oncogene*
- Lovato, P., C. Brender, J. Agnholt, J. Kelsen, K. Kalsoft, A. Svejgaard, K.W. Eriksen, A. Woetmann, and N. Odum. 2003. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *The Journal of biological chemistry* 278:16777-16781.
- Ludwig, A., and H. Hengel. 2009. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Eurosurveillance* 14:26-32.
- Lutticken, C., U.M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, A.G. Harpur, A.F. Wilks, K. Yasukawa, T. Taga, and et al. 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263:89-92.
- Maritano, D., M.L. Sugrue, S. Tininini, S. Dewilde, B. Strobl, X. Fu, V. Murray-Tait, R. Chiarle, and V. Poli. 2004. The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nature immunology* 5:401-409.
- Martin, D., and J.S. Gutkind. 2008. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* 27 Suppl 2:S31-42.
- Maussang, D., D. Verzijl, M. van Walsum, R. Leurs, J. Holl, O. Pleskoff, D. Michel, G.A. van Dongen, and M.J. Smit. 2006. Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:13068-13073.
- McLemore, M.L., S. Grewal, F. Liu, A. Archambault, J. Poursine-Laurent, J. Haug, and D.C. Link. 2001. STAT-3 activation is required for normal G-CSF-dependent proliferation and granulocytic differentiation. *Immunity* 14:193-204.
- McVoy, M.A., and S.P. Adler. 1994. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *Journal of virology* 68:1040-1051.
- Mertens, C., M. Zhong, R. Krishnaraj, W. Zou, X. Chen, and J.E. Darnell, Jr. 2006. Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes & development* 20:3372-3381.
- Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U.H. Koszinowski. 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:14759-14763.
- Michaelis, M., H.W. Doerr, and J. Cinatl. 2009. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia* 11:1-9.

Referenzen

- Miller, D.M., B.M. Rahill, J.M. Boss, M.D. Lairmore, J.E. Durbin, J.W. Waldman, and D.D. Sedmak. 1998. Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *The Journal of experimental medicine* 187:675-683.
- Miller, D.M., Y. Zhang, B.M. Rahill, W.J. Waldman, and D.D. Sedmak. 1999. Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J Immunol* 162:6107-6113.
- Minegishi, Y., and H. Karasuyama. 2009. Defects in Jak-STAT-mediated cytokine signals cause hyper-IgE syndrome: lessons from a primary immunodeficiency. *International immunology* 21:105-112.
- Mizuta, M., and M.G. Schuster. 2005. Cytomegalovirus hepatitis associated with use of anti-tumor necrosis factor-alpha antibody. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 40:1071-1072.
- Mocarski Jr, E.S. 2007. Comparative analysis of herpesvirus-common proteins. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, editors. Cambridge.
- Mohr, A., N. Chatain, T. Domszalai, N. Rinis, M. Sommerauer, M. Vogt, and G. Muller-Newen. 2012. Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling. *European journal of cell biology* 91:524-532.
- Moore, K.W., R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* 19:683-765.
- Moore, K.W., P. Vieira, D.F. Fiorentino, M.L. Trounstein, T.A. Khan, and T.R. Mosmann. 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248:1230-1234.
- Murray, P.J. 2006. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Current opinion in pharmacology* 6:379-386.
- Murray, P.J. 2007. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178:2623-2629.
- Navarro, L., K. Mowen, S. Rodems, B. Weaver, N. Reich, D. Spector, and M. David. 1998. Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex. *Molecular and cellular biology* 18:3796-3802.
- Neubauer, H., A. Cumano, M. Muller, H. Wu, U. Huffstadt, and K. Pfeffer. 1998. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93:397-409.
- Ni, Z., W. Lou, E.S. Leman, and A.C. Gao. 2000. Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer research* 60:1225-1228.
- Nigro, G., S.P. Adler, R. La Torre, and A.M. Best. 2005. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine* 353:1350-1362.

Referenzen

- Nigro, G., S.P. Adler, G. Parruti, M.M. Anceschi, E. Coclite, I. Pezone, and G.C. Di Renzo. 2012. Immunoglobulin therapy of fetal cytomegalovirus infection occurring in the first half of pregnancy--a case-control study of the outcome in children. *The Journal of infectious diseases* 205:215-227.
- Niu, G., T. Bowman, M. Huang, S. Shivers, D. Reintgen, A. Daud, A. Chang, A. Kraker, R. Jove, and H. Yu. 2002a. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 21:7001-7010.
- Niu, G., K.L. Wright, M. Huang, L. Song, E. Haura, J. Turkson, S. Zhang, T. Wang, D. Sinibaldi, D. Coppola, R. Heller, L.M. Ellis, J. Karras, J. Bromberg, D. Pardoll, R. Jove, and H. Yu. 2002b. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21:2000-2008.
- Niu, G., K.L. Wright, Y. Ma, G.M. Wright, M. Huang, R. Irby, J. Briggs, J. Karras, W.D. Cress, D. Pardoll, R. Jove, J. Chen, and H. Yu. 2005. Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Molecular and cellular biology* 25:7432-7440.
- Parganas, E., D. Wang, D. Stravopodis, D.J. Topham, J.C. Marine, S. Teglund, E.F. Vanin, S. Bodner, O.R. Colamonici, J.M. van Deursen, G. Grosveld, and J.N. Ihle. 1998. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93:385-95.
- Park, O.K., L.K. Schaefer, W. Wang, and T.S. Schaefer. 2000. Dimer stability as a determinant of differential DNA binding activity of Stat3 isoforms. *The Journal of biological chemistry* 275:32244-32249.
- Pereira, L. 1994. Function of glycoprotein B homologues of the family herpesviridae. *Infectious agents and disease* 3:9-28.
- Pertel, P., R. Hirschtick, J. Phair, J. Chmiel, L. Poggensee, and R. Murphy. 1992. Risk of developing cytomegalovirus retinitis in persons infected with the human immunodeficiency virus. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 5:1069-1074.
- Peters, M., G. Blinn, F. Solem, M. Fischer, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and S. Rose-John. 1998. In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J Immunol* 161:3575-3581.
- Platanias, L.C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews. Immunology* 5:375-386.
- Plate, K.H., G. Breier, H.A. Weich, and W. Risau. 1992. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359:845-848.
- Pomeroy, C., and J.A. Englund. 1987. Cytomegalovirus: epidemiology and infection control. *American journal of infection control* 15:107-119.
- Popkin, D.L., M.A. Watson, E. Karaskov, G.P. Dunn, R. Bremner, and H.W.t. Virgin. 2003. Murine cytomegalovirus paralyzes macrophages by blocking IFN gamma-induced promoter assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:14309-14314.
- Qing, Y., and G.R. Stark. 2004. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *The Journal of biological chemistry* 279:41679-41685.

Referenzen

- Qureshi, S.A., M. Salditt-Georgieff, and J.E. Darnell, Jr. 1995. Tyrosine-phosphorylated Stat1 and Stat2 plus a 48-kDa protein all contact DNA in forming interferon-stimulated-gene factor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:3829-3833.
- Rafailidis, P.I., E.G. Mourtzoukou, I.C. Varbobitis, and M.E. Falagas. 2008. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virology journal* 5:47.
- Raftery, M.J., D. Wieland, S. Gronewald, A.A. Kraus, T. Giese, and G. Schonrich. 2004. Shaping phenotype, function, and survival of dendritic cells by cytomegalovirus-encoded IL-10. *J Immunol* 173:3383-3391.
- Ray, S., C.T. Sherman, M. Lu, and A.R. Brasier. 2002. Angiotensinogen gene expression is dependent on signal transducer and activator of transcription 3-mediated p300/cAMP response element binding protein-binding protein coactivator recruitment and histone acetyltransferase activity. *Mol Endocrinol* 16:824-836.
- Redell, M.S., M.J. Ruiz, T.A. Alonzo, R.B. Gerbing, and D.J. Tweardy. 2011. Stat3 signaling in acute myeloid leukemia: ligand-dependent and -independent activation and induction of apoptosis by a novel small-molecule Stat3 inhibitor. *Blood* 117:5701-5709.
- Redpath, S., A. Angulo, N.R. Gascoigne, and P. Ghazal. 1999. Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J Immunol* 162:6701-6707.
- Regis, G., S. Pensa, D. Boselli, F. Novelli, and V. Poli. 2008. Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Seminars in cell & developmental biology* 19:351-359.
- Ren, Z., X. Mao, C. Mertens, R. Krishnaraj, J. Qin, P.K. Mandal, M.J. Romanowski, J.S. McMurray, and X. Chen. 2008. Crystal structure of unphosphorylated STAT3 core fragment. *Biochemical and biophysical research communications* 374:1-5.
- Renner, E.D., T.R. Torgerson, S. Rylaarsdam, S. Anover-Sombke, K. Golob, T. LaFlam, Q. Zhu, and H.D. Ochs. 2007. STAT3 mutation in the original patient with Job's syndrome. *The New England journal of medicine* 357:1667-1668.
- Rennick, D.M., M.M. Fort, and N.J. Davidson. 1997. Studies with IL-10^{-/-} mice: an overview. *Journal of leukocyte biology* 61:389-396.
- Revello, M.G. 2005. Passive immunization against cytomegalovirus during pregnancy. *The New England journal of medicine* 353:2818-2820; author reply 2818-2820.
- Reynolds, D.W., S. Stagno, K.G. Stubbs, A.J. Dahle, M.M. Livingston, S.S. Saxon, and C.A. Alford. 1974. Inapparent congenital cytomegalovirus infection with elevated cord IgM levels. Casual relation with auditory and mental deficiency. *The New England journal of medicine* 290:291-296.
- Ross, S.A., K.B. Fowler, G. Ashrith, S. Stagno, W.J. Britt, R.F. Pass, and S.B. Boppana. 2006. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *The Journal of pediatrics* 148:332-336.

Referenzen

- Rousset, F., E. Garcia, T. Defrance, C. Peronne, N. Vezzio, D.H. Hsu, R. Kastelein, K.W. Moore, and J. Banchereau. 1992. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:1890-1893.
- Rowe, W.P., J.W. Hartley, S. Waterman, H.C. Turner, and R.J. Huebner. 1956. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med* 92:418-424.
- Ruzek, M.C., A.H. Miller, S.M. Opal, B.D. Pearce, and C.A. Biron. 1997. Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *The Journal of experimental medicine* 185:1185-1192.
- Samanta, M., L. Harkins, K. Klemm, W.J. Britt, and C.S. Cobbs. 2003. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *The Journal of urology* 170:998-1002.
- Sari, I., M. Birlik, C. Gonen, S. Akar, D. Gurel, F. Onen, and N. Akkoc. 2008. Cytomegalovirus colitis in a patient with Behcet's disease receiving tumor necrosis factor alpha inhibitory treatment. *World journal of gastroenterology : WJG* 14:2912-2914.
- Schaefer, T.S., L.K. Sanders, and D. Nathans. 1995. Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:9097-9101.
- Schuringa, J.J., H. Schepers, E. Vellenga, and W. Kruijer. 2001. Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation. *FEBS letters* 495:71-76.
- Schuringa, J.J., A.T. Wierenga, W. Kruijer, and E. Vellenga. 2000. Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood* 95:3765-3770.
- Sehgal, P.B., D.C. Helfgott, U. Santhanam, S.B. Tatter, R.H. Clarick, J. Ghrayeb, and L.T. May. 1988. Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts. *The Journal of experimental medicine* 167:1951-1956.
- Sen, N., X. Che, J. Rajamani, L. Zerboni, P. Sung, J. Ptacek, and A.M. Arvin. 2012. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and survivin induction by varicella-zoster virus promote replication and skin pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:600-605.
- Shenk, T.E., and M.F. Stinski. 2008. Human cytomegalovirus. Preface. *Current topics in microbiology and immunology* 325:v.
- Shuai, K. 2000. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19:2638-2644.

Referenzen

- Siewert, E., W. Muller-Esterl, R. Starr, P.C. Heinrich, and F. Schaper. 1999. Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components. *European journal of biochemistry / FEBS* 265:251-257.
- Slinger, E., D. Maussang, A. Schreiber, M. Siderius, A. Rahbar, A. Fraile-Ramos, S.A. Lira, C. Soderberg-Naucler, and M.J. Smit. 2010. HCMV-encoded chemokine receptor US28 mediates proliferative signaling through the IL-6-STAT3 axis. *Science signaling* 3:ra58.
- Smith, M.G. 1956. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 92:424-430.
- Solidoro, P., L. Delsedime, C. Costa, M. Bergallo, D. Libertucci, E. Ruffini, M. Rinaldi, and S. Baldi. 2011. Effect of CMV-immunoglobulins (cytotect biotest) prophylaxis on CMV pneumonia after lung transplantation. *The new microbiologica* 34:33-36.
- Song, Y., L. Qian, S. Song, L. Chen, Y. Zhang, G. Yuan, H. Zhang, Q. Xia, M. Hu, M. Yu, M. Shi, Z. Jiang, and N. Guo. 2008. Fra-1 and Stat3 synergistically regulate activation of human MMP-9 gene. *Molecular immunology* 45:137-143.
- Soroceanu, L., A. Akhavan, and C.S. Cobbs. 2008. Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* 455:391-395.
- Soroceanu, L., and C.S. Cobbs. 2011. Is HCMV a tumor promoter? *Virus research* 157:193-203.
- Spencer, J.V. 2007. The cytomegalovirus homolog of interleukin-10 requires phosphatidylinositol 3-kinase activity for inhibition of cytokine synthesis in monocytes. *Journal of virology* 81:2083-2086.
- Spencer, J.V., K.M. Lockridge, P.A. Barry, G. Lin, M. Tsang, M.E. Penfold, and T.J. Schall. 2002. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *Journal of virology* 76:1285-1292.
- Stagno, S., R.F. Pass, G. Cloud, W.J. Britt, R.E. Henderson, P.D. Walton, D.A. Veren, F. Page, and C.A. Alford. 1986. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 256:1904-1908.
- Stagno, S., R.F. Pass, M.E. Dworsky, R.E. Henderson, E.G. Moore, P.D. Walton, and C.A. Alford. 1982. Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *The New England journal of medicine* 306:945-949.
- Stahl, N., T.G. Boulton, T. Farruggella, N.Y. Ip, S. Davis, B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini, and et al. 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263:92-95.
- Staras, S.A., S.C. Dollard, K.W. Radford, W.D. Flanders, R.F. Pass, and M.J. Cannon. 2006. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clinical infectious diseases* 43:1143-1151.
- Takeda, K., B.E. Clausen, T. Kaisho, T. Tsujimura, N. Terada, I. Forster, and S. Akira. 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10:39-49.

Referenzen

- Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:3801-3804.
- Tamashiro, J.C., D. Filpula, T. Friedmann, and D.H. Spector. 1984. Structure of the heterogeneous L-S junction region of human cytomegalovirus strain AD169 DNA. *Journal of virology* 52:541-548.
- Taniguchi, T., K. Ogasawara, A. Takaoka, and N. Tanaka. 2001. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual review of immunology* 19:623-655.
- Tanner, J.E., C. Alfieri, T.A. Chatila, and F. Diaz-Mitoma. 1996. Induction of interleukin-6 after stimulation of human B-cell CD21 by Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp220. *Journal of virology* 70:570-575.
- Taylor, R.T., and W.A. Bresnahan. 2005. Human cytomegalovirus immediate-early 2 gene expression blocks virus-induced beta interferon production. *Journal of virology* 79:3873-3877.
- Thale, R., P. Lucin, K. Schneider, M. Eggers, and U.H. Koszinowski. 1994. Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an Fc receptor. *Journal of virology* 68:7757-7765.
- Thomson, R.M., D. Conrad, H. Antoszewska, M.C. Croxson, and J.G. McCormack. 1998. Cytomegalovirus retinitis, human immunodeficiency virus antibody positivity and normal T helper cell numbers. *The Journal of infection* 37:186-188.
- Trilling, M., V.T. Le, M. Fiedler, A. Zimmermann, E. Bleifuss, and H. Hengel. 2011. Identification of DNA-damage DNA-binding protein 1 as a conditional essential factor for cytomegalovirus replication in interferon-gamma-stimulated cells. *PLoS pathogens* 7:e1002069.
- Vallet, H., R. Houitte, A. Azria, and X. Mariette. 2011. Cytomegalovirus colitis and hypo-IgG after rituximab therapy for rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 38:965-966.
- Vignais, M.L., and M. Gilman. 1999. Distinct mechanisms of activation of Stat1 and Stat3 by platelet-derived growth factor receptor in a cell-free system. *Molecular and cellular biology* 19:3727-3735.
- Vignais, M.L., H.B. Sadowski, D. Watling, N.C. Rogers, and M. Gilman. 1996. Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Molecular and cellular biology* 16:1759-1769.
- Wagner, M., S. Jonjic, U.H. Koszinowski, and M. Messerle. 1999. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *Journal of virology* 73:7056-7060.
- Wagstaff, A.J., and H.M. Bryson. 1994. Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections. *Drugs* 48:199-226.

Referenzen

- Waldhoer, M., T.N. Kledal, H. Farrell, and T.W. Schwartz. 2002. Murine cytomegalovirus (CMV) M33 and human CMV US28 receptors exhibit similar constitutive signaling activities. *Journal of virology* 76:8161-8168.
- Wang, R., P. Cherukuri, and J. Luo. 2005. Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *The Journal of biological chemistry* 280:11528-11534.
- Wang, X., S.M. Huong, M.L. Chiu, N. Raab-Traub, and E.S. Huang. 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* 424:456-461.
- Wathen, M.W., and M.F. Stinski. 1982. Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *Journal of virology* 41:462-477.
- Wei, D., X. Le, L. Zheng, L. Wang, J.A. Frey, A.C. Gao, Z. Peng, S. Huang, H.Q. Xiong, J.L. Abbruzzese, and K. Xie. 2003a. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 22:319-329.
- Wei, L.H., M.L. Kuo, C.A. Chen, C.H. Chou, K.B. Lai, C.N. Lee, and C.Y. Hsieh. 2003b. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* 22:1517-1527.
- Weile, J., B. Streeck, J. Muck, G. Krebs, K.H. Jakobus, C. Knabbe, and F. Weber. 2009. Severe cytomegalovirus-associated esophagitis in an immunocompetent patient after short-term steroid therapy. *Journal of clinical microbiology* 47:3031-3033.
- Weller, T.H., J.B. Hanshaw, and D.E. Scott. 1960. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 12:130-132.
- Wiest, P.M., T. Flanigan, R.A. Salata, D.M. Shlaes, M. Katzman, and M.M. Lederman. 1989. Serious infectious complications of corticosteroid therapy for COPD. *Chest* 95:1180-1184.
- Yahata, Y., Y. Shirakata, S. Tokumaru, K. Yamasaki, K. Sayama, Y. Hanakawa, M. Detmar, and K. Hashimoto. 2003. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for vascular endothelial growth factor-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation. *The Journal of biological chemistry* 278:40026-40031.
- Yang, J., X. Liao, M.K. Agarwal, L. Barnes, P.E. Auron, and G.R. Stark. 2007. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes & development* 21:1396-1408.
- Yang, J., and G.R. Stark. 2008. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell research* 18:443-451.
- Yasukawa, H., M. Ohishi, H. Mori, M. Murakami, T. Chinen, D. Aki, T. Hanada, K. Takeda, S. Akira, M. Hoshijima, T. Hirano, K.R. Chien, and A. Yoshimura. 2003. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nature immunology* 4:551-556.

Referenzen

- Yoo, J.Y., D.L. Huso, D. Nathans, and S. Desiderio. 2002. Specific ablation of Stat3beta distorts the pattern of Stat3-responsive gene expression and impairs recovery from endotoxic shock. *Cell* 108:331-344.
- Yoshida, T., T. Hanada, T. Tokuhisa, K. Kosai, M. Sata, M. Kohara, and A. Yoshimura. 2002. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *The Journal of experimental medicine* 196:641-653.
- Yoshizaki, K., N. Nishimoto, M. Mihara, and T. Kishimoto. 1998. Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody. *Springer seminars in immunopathology* 20:247-259.
- You, M., D.H. Yu, and G.S. Feng. 1999. Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Molecular and cellular biology* 19:2416-2424.
- Yu, H., and R. Jove. 2004. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nature reviews. Cancer* 4:97-105.
- Yue, P., X. Zhang, D. Paladino, B. Sengupta, S. Ahmad, R.W. Holloway, S.B. Ingersoll, and J. Turkson. 2011. Hyperactive EGF receptor, Jaks and Stat3 signaling promote enhanced colony-forming ability, motility and migration of cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene*
- Zhang, J.J., U. Vinkemeier, W. Gu, D. Chakravarti, C.M. Horvath, and J.E. Darnell, Jr. 1996. Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:15092-15096.
- Zhang, X., M.H. Wrzeszczynska, C.M. Horvath, and J.E. Darnell, Jr. 1999. Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* 19:7138-7146.
- Zhong, Z., Z. Wen, and J.E. Darnell, Jr. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264:95-98.
- Zhu, M., S. John, M. Berg, and W.J. Leonard. 1999. Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN-gamma-mediated signaling. *Cell* 96:121-130.
- Zimmermann, A., M. Trilling, M. Wagner, M. Wilborn, I. Bubic, S. Jonjic, U. Koszinowski, and H. Hengel. 2005. A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses. *The Journal of experimental medicine* 201:1543-1553.

Anhang

Präsentationen & Publikationen

Poster

„*Modulation of STAT3-signalling upon Mouse Cytomegalovirus Infection*”

Jassin Rashidi-Alavijeh, Mirko Trilling, Vu Thuy Khanh Le and Hartmut Hengel

4. Konferenz des SFB 575, „*Regenerative Hepatology*“, Düsseldorf, 11/2008

Poster

„*Equal and Unequal Events in STAT2 Degradation and in Inhibition of STAT1 Signalling Between Mouse and Human CMV*”

Mirko Trilling, Vu Thuy Khanh Le, **Jassin Rashidi-Alavijeh**, Albert Zimmermann and Hartmut Hengel

34th Annual International Herpesvirus Workshop, Ithaca, NY, 07/2009

Vortrag

„*Towards Solving the STAT3 Conundrum in Mouse Cytomegalovirus-infected cells*“

Jassin Rashidi-Alavijeh, Mirko Trilling, Vu Thuy Khanh Le, Jürgen Scheller, Stefan Rose-John, Gabriella Regis, Valeria Poli and Hartmut Hengel

Workshop des Arbeitskreises „*Immunobiology of Viral Infections*“ der GfV, Deidesheim, 10/2009

Vortrag

‘*Activated*’ *STAT1 and STAT3 proteins – a paradoxical consequence of inhibited Jak-STAT signalling in MCMV infected cells?*

Mirko Trilling, **Jassin Rashidi-Alavijeh**, Vu Thuy Khanh Le and Hartmut Hengel

35th Annual International Herpesvirus Workshop, Salt Lake City, Utah, 07/2010

Publikation

‘*Activated*’ *STAT proteins – a paradoxical consequence of inhibited JAK-STAT signalling in cytomegalovirus-infected cells*

Anhang

Mirko Trilling, Vu Thuy Khanh Le, **Jassin Rashidi-Alavijeh**, Benjamin Katschinski, Jürgen Scheller, Stefan Rose-John, Gabriela Elena Androsiac, Stipan Jonjić, Valeria Poli, Klaus Pfeffer and Hartmut Hengel

Journal of Immunology, 2014, 192(1): 447-58

Danksagung

Ursprünglich hatte ich mir überlegt, auf das Schreiben einer persönlichen und ausführlicheren Danksagung für meine Doktorarbeit zu verzichten. Jetzt aber, wo ich kurz vor Abgabe dieses Textes stehe, denke ich einerseits an den Aufwand, die Lebenszeit, die Nerven und die grauen Haare zurück, die ich in meine Doktorarbeit investiert habe, und bedenke andererseits, dass ich vielleicht nie wieder die Möglichkeit bekommen werde, eine offizielle und „öffentliche“ Danksagung zu verfassen, sodass ich mich für die folgenden Worte entschieden habe:

Der erste und zweifellos wichtigste Dank geht an meine wunderbaren Eltern Ali Rashidi und Esmat Ghanbarian, meine liebevolle Schwester Jasmin und meinen unglaublich geduldigen Cousin Hojjat, für ihre immerwährende Unterstützung und Liebe, für ihre Ratschläge, ihren Rückhalt und dafür, dass sie mir ein zu Hause mit einer herzlichen Atmosphäre geschaffen haben. Und auch wenn ihre wundervolle Erscheinung erst kurz vor Abgabe in mein Leben getreten ist und sie mit dieser Arbeit nicht mehr allzu viel zu tun hatte, möchte ich es mir nicht nehmen lassen, an dieser Stelle meiner besseren Hälfte Dorsa Moghadam zu danken.

Ich danke Hartmut Hengel für die Überlassung des interessanten Themas, für sein immer freundliches Gemüt und für die Zeit, die er sich für mich und meine Arbeit genommen hat.

Ich danke Mirko Trilling für die exzellente Betreuung meiner Arbeit, für seine Kreativität, guten Ideen und für viele grandiose gemeinsame Siege (und lehrreiche Niederlagen) am Kicker-Tisch. Außerdem danke ich Khanh Le für viele wertvolle Tipps und die Mit-Betreuung meiner Arbeit.

Ich danke allen CMV'lern und Mitarbeitern der Diagnostik sowie der AG Schaal für eine abwechslungsreiche und angenehme Zeit in unseren Laboratorien, die mir dank viel Humor, freitäglichen gemeinsamen Kochen und unerbittlichen Kämpfen am Kicker-Tisch in guter Erinnerung bleiben werden.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 10.06.2013

Jassin Rashidi-Alavijeh