

**Wirkung des humanen Cytomegalovirus auf
Transkription und Spleißregulation
des MHC-kodierten Chaperons Tapasin**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sebastian Hauka

aus Duisburg

Düsseldorf, Dezember 2013

aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Hartmut Hengel
Korreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2014

*Si les virus doivent être considérés
comme des organismes ou non
est une affaire de goût*

*André Lwoff, Medizin-Nobelpreisträger 1965

Inhaltsverzeichnis

Titelblatt.....I

Zweite Seite II

(...) *une affaire de goût* (André Lwoff)..... III

Inhaltsverzeichnis.....IV

AbbildungsverzeichnisVIII

Zusammenfassung..... XII

Abstract.....XIII

1 Einleitung 14

1.1 Viren 14

1.1.1 Herpesviren..... 15

1.1.2 Das humane Cytomegalovirus (HCMV) 16

1.2 Die MHC Klasse I Antigenpräsentation 18

1.2.1 Inhibition der MHC Klasse I Antigenpräsentation durch HCMV 20

1.2.2 Tapasin und eigene Vorarbeiten 21

1.3 Promotoren 22

1.3.1 Promotoren der Invertebraten und Vertebraten 23

1.3.1.1 Distale Promotoren der Invertebraten und Vertebraten..... 23

1.3.1.2 Kernpromotoren der Invertebraten und Vertebraten 24

1.3.1.3 Proximale Promotoren der Invertebraten und Vertebraten..... 27

1.3.2 Promotoren und deren veränderte Aktivität nach Virus-Infektionen 28

1.4 Spleißen – eine kurze Übersicht 29

1.4.1 G-run-reguliertes Spleißen 30

1.5 miRNAs 31

1.6 Der Tapasinpromotor..... 32

Inhaltsverzeichnis

2	Ergebnisse.....	35
2.1	Die MHC Klasse I vermittelte Antigenpräsentation wird von HCMV durch zahlreiche Inhibitoren kontrolliert.....	35
2.2	HCMV reduziert die Tapasintranskriptmenge	36
2.2.1	Bestätigung der reduzierten Tapasintranskriptmenge mittels qPCR.....	36
2.2.2	Wie wird die Tapasintranskriptmenge reguliert?	38
2.2.3	Die HCMV-kodierte miRNA US25.2 reduziert die Tapasinexpression nicht	39
2.2.4	Das Tapasin 3'UTR und ein frühzeitiges alternatives PolyA-Signal.....	40
2.2.5	Die Stabilität des Tapasintranskriptes ist während der HCMV-Infektion unverändert.....	42
2.2.6	Die Verhinderung von NMD (<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>) kann die Tapasintranskriptmenge nicht wiederherstellen	44
2.3	NeTT – <i>New Tapasin Transcript</i>	46
2.3.1	NeTT modifiziert die MHC Klasse I Oberflächenexpression.....	47
2.3.2	Erhöhte Mengen NeTT in HCMV-infizierten Zellen.....	48
2.3.3	Fibroblasten zeigen minimal höhere NeTT-Transkriptmengen als andere Zellen.....	50
2.3.4	SNPs (<i>single nucleotide polymorphisms</i>) können NeTT nicht erklären.....	52
2.3.5	<i>G-runs</i> in direkter Umgebung der 5'Spleißstelle des Exon 3.....	53
2.3.6	<i>G-runs</i> können die Entstehung von NeTT beeinflussen.....	54
2.3.7	Transkriptmengen von hnRNP-F und -H in infizierten Fibroblasten.....	56
2.4	Tapasin – Sein Promotor und dessen Regulation	58
2.4.1	Die GAPDH-mRNA wird während der HCMV-Infektion konstant transkribiert.....	58
2.4.2	Reduzierte Neu-Syntheserate des Tapasintranskriptes in HCMV-infizierten Zellen.....	59
2.4.3	Der Einfluss der Infektionsdosis (MOI) auf die Regulation der Transkription während der frühen und späten HCMV-Infektion.....	61
2.4.4	Differenzielle Regulation der Transkription von Tapasin und seiner Nachbargene während der HCMV-Infektion	64
2.4.5	ChIP (Chromatin Immunpräzipitation) des Tapasinpromotors.....	66
2.4.6	Histon 3 (Lysin 9) Acetylierung am Tapasingen und -promotor	67
2.4.7	Polymerase II Konzentration am Tapasingen und -promotor	68
2.4.8	Die sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP) als transientes Reportergergen.....	70
2.4.9	SEAP als stabil integriertes Reportergergen	71
2.4.10	IFN γ -Induzierbarkeit des β_2 m-Promotors im stabilen Reportergergenassay	73
2.4.11	Vergleich verschiedener Zelllinien im stabilen Reportergergenassay.....	74
2.4.12	Der Tapasinpromotor im stabilen Reportergergenassay ist IFN γ -induzierbar	76
2.4.13	Der Tapasinpromotor sowie 5'Verkürzungen des Promotors im stabilen Reportergergenassay in MRC-5 Fibroblasten	77
2.4.14	Punktmutationen der NF- κ B- und/oder PRDM1-Bindestellen verringern die Reduktion der Promotoraktivität während der HCMV-Infektion nicht	80

Inhaltsverzeichnis

3	Diskussion	83
3.1	Tapasin als Ziel zur Manipulation der Antigenpräsentation	83
3.2	Die Tapasin-mRNA selbst ist kein Ziel von HCMV.....	85
3.3	NeTT – <i>New Tapasin Transcript</i>	89
3.4	Die Entstehung von NeTT und die Rolle von hnRNP-F/H.....	90
3.5	Repression des Tapasinpromotors während der HCMV-Infektion	92
3.6	Der Tapasinpromotor und HCMV-vermittelte Transaktivierungen.....	97
3.7	Ein stabil integrierter Reportergenassay.....	98
3.8	Die Lokalisation der regulatorischen Sequenz	99
3.9	Modell des Tapasinpromotors	102
3.10	Inhibiert HCMV die Polymerase II-Initiation am fokussierten Teil des Kernpromotors?	107
4	Material und Methoden	109
4.1	Materialien.....	109
4.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien (Zellkultur)	109
4.1.2	Chemikalien und Biochemikalien	111
4.1.3	Kits	113
4.1.4	Antikörper.....	114
4.1.5	Restriktionsenzyme	114
4.1.6	Oligonukleotide I (qPCR und qRT-PCR).....	115
4.1.7	Oligonukleotide II (Minigen-Synthese)	115
4.1.8	Oligonukleotide III (Reportergenassay)	116
4.1.9	Oligonukleotide IV (sqRT-PCR).....	116
4.1.10	Oligonukleotide V (ChIP-Primer der qPCR und sqPCR)	117
4.1.11	Oligonukleotide VI (Reportergen-Integration, qPCR und sqPCR).....	117
4.1.12	Konstrukte I (Promotor-Konstrukte)	118
4.1.13	Konstrukte II (sequenzgerichtete Mutationen von Promotoren).....	118
4.1.14	Vektoren	119
4.1.15	Puffer und Lösungen	119
4.2	Methoden.....	121
4.2.1	Molekularbiologische Arbeiten	121
4.2.1.1	Konstruktion des lentiviralen Vektors pPR-GIP	121
4.2.1.2	Konstruktion des lentiviralen Vektors pwI-GIP	121
4.2.1.3	Phosphatase-Reportergenassay.....	122
4.2.1.4	Präparation von Plasmid-DNA.....	122
4.2.1.5	Sequenzgerichtete Mutationen	122
4.2.1.6	Gewinnung unmarkierter Gesamt-RNA.....	123
4.2.1.7	Markierung neusynthetisierter RNA und deren Aufreinigung.....	123
4.2.1.8	Reverse Transkription	124
4.2.1.9	Semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR)	125

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.10	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	125
4.2.1.11	Quantitative PCR (qPCR) für cDNA- und gDNA-Analysen (ChIP)	126
4.2.1.12	Semiquantitative PCR (sqPCR) für gDNA-Analysen (ChIP).....	127
4.2.1.13	Herstellung von RIPA-Zelllysaten	127
4.2.1.14	Denaturierende SDS-PAGE	128
4.2.1.15	Westernblot.....	128
4.2.1.16	Protein-Markierung (metabolisch) und Immunpräzipitation.....	129
4.2.1.17	Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)	129
4.2.2	Arbeiten mit prokaryontischen Zellen.....	131
4.2.2.1	Chemisch-kompetente <i>E. coli</i>	131
4.2.2.2	Transformation	131
4.2.2.3	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen	131
4.2.3	Zellkultur-Arbeiten.....	132
4.2.3.1	Zellkultur	132
4.2.3.2	Transfektion.....	132
4.2.3.3	Lentivirale Transduktion	132
4.2.3.4	Kryokonservierung humaner Zellen.....	133
4.2.4	Arbeiten mit HCMV.....	134
4.2.4.1	Infektionsversuche mit HCMV	134
5	Abkürzungsverzeichnis.....	135
6	Literaturverzeichnis.....	138
7	Publikationen (mit eigener Beteiligung).....	159
8	Vorträge	160
	Erklärung.....	161
	Danksagung.....	162
	Appendix	163

Abbildungsverzeichnis

Einleitung:

Abbildung 1: HSV-1- (elektronenmikroskopische Aufnahme) und HCMV- (Skizze) Virionen	15
Abbildung 2: Skizzierte Lage und Interaktionen sowohl des Kernpromotors als auch der proximalen und distalen Verstärker	26
Abbildung 3: mRNA Spleißen und das Spleißosom	30

Ergebnisse:

Abbildung 4: Relative Transkriptmengen verschiedener PLC-Komponenten in infizierten Zellen	37
Abbildung 5: Auflistung aller untersuchten, die Transkriptmenge beeinflussenden, Faktoren	38
Abbildung 6: Einfluss der miRNA US25.2 und UL112 auf die Tapasinexpression	39
Abbildung 7: Lokalisation eines alternativen Poly-Adenylierungssignals und AREs (<i>AU-rich elements</i>) im 3'UTR des Tapasintranskriptes	41
Abbildung 8: Die Halbwertszeit des Tapasintranskriptes ist in infizierten Zellen nicht vermindert	43
Abbildung 9: Unveränderte Reduktion der Tapasintranskriptmenge bei inhibiertem NMD	44
Abbildung 10: In infizierten Zellen ist die NeTT-Transkriptmenge induziert	46
Abbildung 11: Tapasin, Exon 3 (NeTT) sowie die essenzielle Schwefelbrücke zwischen Tapasin und ERp57	47
Abbildung 12: Absolute Quantifizierung der NeTT- sowie Tapasintranskriptmengen in infizierten Zellen mittels Transkript-spezifischer Primer	49
Abbildung 13: NeTT-Transkriptmengen in verschiedenen Zelllinien	51
Abbildung 14: Die SNPs 2395378 und 4077083 sowie ihre möglichen Konsequenzen für das Exon 3	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 15: Zwei <i>G-runs</i> finden sich in direkter Umgebung der 5'Spleißstelle des Exon 3	53
Abbildung 16: Expressionsmuster der Tapasin-Minigene	55
Abbildung 17: Erhöhte hnRNP-F und hnRNP-H Transkriptmengen in infizierten Fibroblasten	56
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Markierung neusynthetisierter RNA	58
Abbildung 19: Neusynthetisierte- und Gesamt-mRNA von GAPDH in infizierten und stimulierten MRC-5 Fibroblasten	59
Abbildung 20: mRNA Neusyntheserate von Tapasin, TAP1, TAP2, HLA-B, β_2m und ERp57 in infizierten Fibroblasten	60
Abbildung 21: mRNA Neusyntheserate von Tapasin, TAP1, TAP2 und CEACAM1 bei verschiedenen Infektionsdosen	62
Abbildung 22: mRNA Neusyntheserate von Tapasin, TAP1 und TAP2 bei verschiedenen Infektionsdosen	63
Abbildung 23: mRNA Neusyntheserate der Tapasin-umgebenden Gene	65
Abbildung 24: Chromatin Immunpräzipitation mit Polymerase II- und Kontroll-Antikörpern	66
Abbildung 25: Histon 3 (Lysin 9) Acetylierung (am Tapasinpromotor) in infizierten Fibroblasten	68
Abbildung 26: Polymerase II Konzentration am Tapasinpromotor	69
Abbildung 27: Übersicht des transient exprimierenden SEAP-Reportergensystems	70
Abbildung 28: SEAP-Expression in infizierten Fibroblasten	71
Abbildung 29: Übersicht des stabil exprimierenden SEAP-Reportergensystems	72
Abbildung 30: Der β_2m -Promotor des stabil transduzierten Reportergens ist IFN α - und IFN γ -stimulierbar	73
Abbildung 31: Das stabile Reportergensystem mit GAPDH, β_2m und Tapasin kontrollierter Reportergenexpression in verschiedenen Zellen	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 32: Das Reportergensystem ohne und mit Tapasinpromotor in MRC-Fibroblasten	76
Abbildung 33: Induktion und Repression der 5' Verkürzungen des Tapasinpromotors in infizierten und IFN γ -stimulierten MRC-5 Fibroblasten	78
Abbildung 34: Expression des Δ PRDM1-, Δ NF- κ B- und Δ PRDM1/ Δ NF- κ B-Tapasinpromotors in infizierten und IFN γ -stimulierten MRC-5 Fibroblasten.....	81
 <u>Diskussion:</u>	
Abbildung 35: Übersicht der Aktivitäten aller verkürzten und punktmutierten Promotoren im Verhältnis zum wildtypischen Promotor	103
Abbildung 36: Schematische Darstellung des Tapasin-Kernpromotors und proximaler Transkriptionsfaktor-Bindestellen	104
Abbildung 37: Hypothetisch funktionelle Bindungen am fokussierten Teil des Kernpromotors von Tapasin	107
 <u>Appendix:</u>	
Abbildung 38: Übersicht von vorhergesagten und experimentell gefundenen Poly-Adenylierungssignalen des Tapasintranskriptes	163
Abbildung 39: Übersicht von „simple nucleotide polymorphisms“ im Bereich des Spleißdonors von Exon 3	164
Abbildung 40: Skizzierte Übersicht des lentiviralen Vektors pUC2CL6IPwo.....	165
Abbildung 41: Skizzierte Übersicht des klonierten lentiviralen Vektors pPR-GIP	166
Abbildung 42: Skizzierte Übersicht des klonierten lentiviralen Vektors pwI-GIP.....	167
Abbildung 43: Relative Integrationsraten ausgesuchter Promotoren im stabilen Reportergenassay	168
Abbildung 44: Alignment des humanen (Query) mit dem murinen (Sbjct) Tapasinpromotor	169
Abbildung 45: Alignment des humanen (human) mit dem murinen (mouse) Tapasinpromotor	170

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 46: Übersicht der Histon 3 (Lysin 27) Acetylierung im Bereich des Tapasingens	171
Abbildung 47: Übersicht der experimentell gefundenen Transkriptionsfaktorbindungen im Bereich des Tapasinpromotors	172
Abbildung 48: Übersicht von experimentell (ChIP-seq) gefundenen Transkriptionsfaktorbindestellen (Polymerase 2)	173
Abbildung 49: Übersicht der gespleißten humanen ESTs (expressed sequence tags) im Bereich des Tapasingens	174
Abbildung 50: Übersicht von gefundenen mRNAs im Bereich des Tapasingens	175
Abbildung 51: 5' Verkürzungen des Tapasinpromotors in infizierten und IFN γ -stimulierten MRC-5 Fibroblasten	176
Abbildung 52: Die durch IFN γ -induzierten IDO-Transkriptmengen können von HCMV reguliert werden	177
Abbildung 53: HCMV-Partikel und Virus-Replikation induzieren die CEACAM1-Transkription.....	178

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des humanen Cytomegalovirus (HCMV) auf die Transkription des MHC-kodierten Chaperons Tapasin untersucht, dessen Funktion essenziell im MHC Klasse I Antigenpräsentationsweg und damit für die effiziente CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort ist. In den durchgeführten Experimenten konnten zwei Mechanismen von HCMV gefunden und näher analysiert werden, die die Funktion von Tapasin betreffen: Die Inhibition der Tapasintraskription sowie die Generierung einer neuen, in dieser Arbeit beschriebenen Spleißvariante von Tapasin.

Im Rahmen von Vorarbeiten waren im Verlauf der HCMV-Infektion deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung des, für den MHC Klasse I Antigenpräsentationsweg essenziellen, Peptidbeladungskomplexes (PLC) gefunden worden. Diese Unterschiede bestanden unabhängig von den bekannten HCMV-kodierten MHC I antagonisierenden Proteinen der Genregion *US2-11* und wurden durch die hier vorgelegte Arbeit auf der Transkriptionsebene untersucht. So waren die Transkriptgesamtmenge und die Transkriptneusynthese der PLC-Bestandteile Tapasin, TAP1 und TAP2 im Gegensatz zu den weiteren Bestandteilen HLA-B und β_2m reduziert. Interessanterweise sank ausschließlich die Transkriptionsrate von Tapasin stark unterhalb jener, welche in nicht-infizierten Vergleichszellen gefunden wurde. Dies deutete auf eine selektive Regulation des Tapasings hin.

Zusätzlich konnte eine neue alternativ gespleißte Variante des Tapasintraskriptes, NeTT (neues Tapasintraskript, *New Tapasin Transcript*), während der Infektion beobachtet werden. Diese wurde im Gegensatz zum vollständigen Transkript während der HCMV-Infektion verstärkt transkribiert. Dem NeTT-Protein fehlt infolge des Ausschlusses von Exon 3 Cystein 95, welches die für die Tapasinfunktion essenzielle Bindung an ERp57 vermittelt. Die Regulation, die zur Entstehung von NeTT führt, konnte mittels Mutationsanalysen in sogenannten Minigenen durch zwei Guanodin-Wiederholungen (*G-runs*) erklärt werden, ohne aber die starke Reduktion der Tapasintraskriptmenge während der Infektion erklären zu können.

Es wurde kein Einfluss der HCMV-Infektion auf die Tapasin-mRNA-Stabilität gefunden. Quantitative PCR-Analysen neu-synthetisierter RNA deuteten dagegen auf eine direkte Regulation der Transkriptionsrate hin. In weiterführenden SEAP-Reportergen-Analysen (sezernierte alkalische Phosphatase) mit systematischen Promotor-Verkürzungsmutanten gelangen in Verbindung mit *in silico* Vorhersagen nicht nur neue Einblicke in den Aufbau des Tapasinpromotors, sondern auch die während der Infektion mutmaßlich negativ regulierte Promotorsequenz konnte auf 29 Nukleotide eingengt werden. Es wurde gezeigt, dass die in dieser Sequenz vorhandene NF- κ B-Bindestelle (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) nicht von der Infektion reguliert wird. Es wird vielmehr ein Modell vorgeschlagen, in dem eine inhibierte Mzfl1-Bindung (*myeloid zinc finger 1*) zur reduzierten Promotoraktivität führt.

Abstract

Tapasin is a crucial factor of the MHC class I antigen presentation pathway presenting antigenic peptides to cytotoxic CD8⁺ T cells on the cell surface. The aim of this thesis was to gain understanding of human cytomegalovirus (HCMV) transcriptional regulation of the MHC-encoded chaperon tapasin. The experiments committed revealed two consequences of HCMV-infection on tapasin: i) inhibition of the tapasin promoter and ii) simultaneous appearance of a tapasin splice variant.

Preceding infection studies of a Δ US2-11 HCMV deletion mutant lacking the genes for established MHC I inhibitors, revealed changes in the constitution of the peptide loading complex (PLC), which is crucial for MHC class I quality control. In this study the reduction of tapasin protein in HCMV infection was found to be due to reduced transcript levels of tapasin. This was also found for TAP1 and TAP2, but not for HLA-B and β_2m . However, only tapasin transcript biosynthesis declined to a level below transcription in mock-infected cells, pointing at a specific regulation of tapasin by HCMV.

In addition, an alternatively spliced tapasin transcript lacking exon 3 (the new tapasin transcript, NeTT) was detected in infected cells. Interestingly, the reading frame of NeTT is not changed upon loss of exon 3 and, furthermore, exon 3 encodes for the cystein 95, which guarantees the crucial binding to ERp57 and is essential for tapasin function. This raised the question whether NeTT is able to counteract the function of tapasin. In contrast to tapasin transcript levels, NeTT was slightly induced upon infection. Splicing analysis of minigenes revealed that NeTT transcription can be controlled by G-runs located in the intronic sequence of the exon 3 splice donor, however, the G-runs are not responsible for the negative regulation of tapasin transcript levels.

Tapasin mRNA stability was not changed in infection. In fact, PCR-analysis of nascent RNA pointed into the direction of inhibited transcription. Subsequent analysis of the tapasin promoter via promoter truncations in a genome-integrated SEAP (secreted alkaline phosphatase) reporter gene assay combined with *in silico* analysis gave insights into the constitution of the promoter. Moreover, the negatively regulated sequence could be narrowed down to 29 nucleotides, which included NF- κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) and Mzf1 (*myeloid zinc finger 1*) transcription factor binding sites. No indications for an NF- κ B-binding-site regulation by HCMV could be found. Therefore, a model is proposed where the positive function of Mzf1 binding to the promoter is prevented in infection, leading to the strong down-regulation of tapasin transcriptional activity in HCMV-infected cells.

1 Einleitung

1.1 Viren

Der erste Versuch, Viren von Bakterien differenziell zu beschreiben, wurde von Martinus Beijerinck 1898 mit dem Begriff des „contagium vivum fluidum“ (infektiösen beweglichen Gegenstandes) getätigt, als er das Tabakmosaikvirus entdeckte und untersuchte (Beijerinck 1898). Dieser „Gegenstand“ war in der Lage Bakterienfilter zu durchdringen und wurde als ultrafiltrierbar definiert. Der lateinische Begriff Virus (Gift, Saft, Schleim) schien daher am nächstliegenden. Zeitgleich beschrieben Löffler und Frosch gleiche Eigenschaften für „den Überträger“ der Maul- und Klauenseuche (Loeffler and Frosch 1897). Ob es sich bei Viren dabei um Lebewesen handelt oder nicht, wurde damals von André Lwoff, wohl noch für heute passend, beantwortet: *“Whether or not viruses should be regarded as organisms is a matter of taste”* (Lwoff, Horne *et al.* 1962). Unabhängig von der genauen Einordnung als Lebewesen ergeben sich für Viren zwei eindeutige Alleinstellungsmerkmale, nämlich die nur minimale Kodierung für Proteine der Translationsmaschinerie sowie solcher eines eigenständigen Energiemetabolismus (Raoult and Forterre 2008). Beides, Translation und Energieversorgung, werden vom Virus umprogrammiert, um so einzig der Synthese vermeintlich maximaler Virusmengen zu dienen und die Vermehrung zu gewährleisten. „Dieses Programm“ ist auf RNA oder DNA kodiert und ermöglicht, unter Betrachtung der jeweiligen Komposition als doppelsträngig, einzelsträngig, negativ oder positiv, zirkulär oder segmentiert, eine Einteilung nach David Baltimore (Baltimore 1971).

Betrachtet man das Entweder-oder von DNA und RNA, ergibt sich das erste Kriterium einer hierarchischen Einteilung nach Lwoff, Horne und Tournier. Die Nukleinsäure wird außerdem durch ein Kapsid umgeben, welches entweder ikosaedrisch, helikal oder komplex organisiert sein kann und damit das zweite Kriterium bildet. Als drittes Kriterium wird die fehlende oder gegebene Umhüllung herangezogen, bevor schlussendlich die Größe des Virions als viertes und letztes Kriterium dient (Lwoff, Horne *et al.* 1962).

Nicht in den genannten Einteilungen inbegriffen sind die mannigfaltigen Mechanismen der Viren, die infizierten Zellen zum Vorteil (Vermehrung) umzuprogrammieren. Je länger eine Koevolution von Virus und Wirt stattfindet, desto gezielter kann eine Kontrolle der Wirtszellen durch das Virus erfolgen. Eine Familie der Viren, die der Herpesviren, zeichnet sich durch eine besonders lange Koevolution aus, wie durch Forschungen von McGeoch und

Einleitung

Mitarbeitern ausführlich beschrieben (siehe auch folgende Auszüge in 1.1.1) (McGeoch, Cook *et al.* 1995).

1.1.1 Herpesviren

Der Begriff Herpesvirus beschreibt eine große Gruppe artspezifischer (mit wenigen Ausnahmen (Greenwood, Tsangaras *et al.* 2012)) DNA-Viren, welche sowohl in Säugern, Amphibien, Reptilien, als auch Fischen vorkommen (McGeoch and Gatherer 2005). Klassischer Weise wurden Herpesviren als solche auf Grund ihrer Morphologie dieser Virus-Familie zugeordnet. Dabei wurde das spezifische Erscheinungsbild im Elektronenrastermikroskop herangezogen, welches sich aus der Struktur und Größe (Durchmesser ca. 200 Nanometer) des *Envelope* (Hülle der umhüllten Viren) ergibt. Sowohl das Kapsid, als auch das Tegument werden von diesem *lipid bilayer* (Lipid-Doppelschicht), mit hauptsächlich glykosylierten Proteinanteilen, umschlossen (Abbildung 1A).

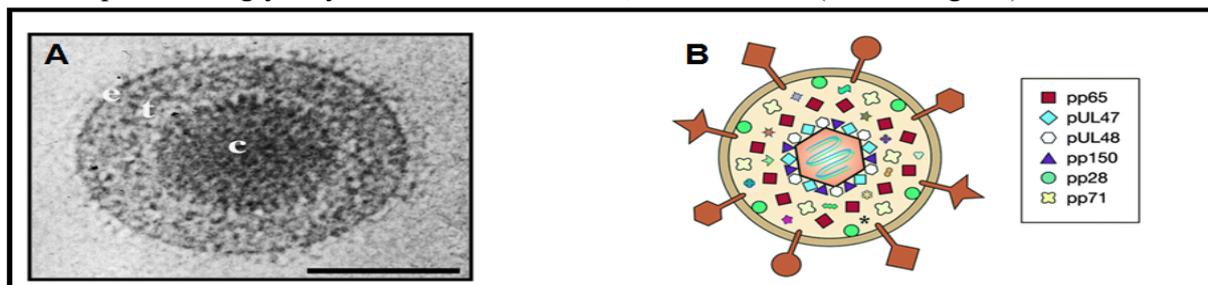


Abbildung 1: HSV-1- (elektronenmikroskopische Aufnahme) und HCMV- (Skizze) Virionen. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines HSV-1-Virions, mit dem *Envelope* (e), dem Tegument (t) und dem Kapsid (c). Der Balken in der Aufnahme, welche von McGeoch, Rixon *et al.* 2006 entnommen wurde, entspricht einer Länge von 100 Nanometern (McGeoch, Rixon *et al.* 2006). (B) Skizzierter Aufbau eines HCMV-Virions, entnommen aus Kalejta 2008. Gezeigt sind die abundanten Tegument-Proteine pp65, pUL47, pUL48, pp150, pp28 und pp71 (Kalejta 2008 b).

Das Tegument (Abbildung 1A/B) ist eine Ansammlung funktioneller Proteine (auch Matrix genannt), welche in der frühen und späten Phase der lytischen Infektion eine entscheidende Rolle spielen. Sobald die Virushülle mit der Zellmembran verschmolzen ist, gelangen die zuvor genannten Proteine ins Zytoplasma der Zielzelle und vermitteln zahlreiche entscheidende Funktionen: a) den weiteren Eintritt des Viruskapsids, b) eine schnelle und direkte Regulation der Immunantwort, c) den Transport der DNA in den Nukleus (*shuttling*), d) den Beginn der Transkription viraler mRNA und weiter den Start der viralen Replikation (Gilbert, Riddell *et al.* 1996, Kalejta 2008 b, Liu, Zhang *et al.* 2012, Phillips, Cygnar *et al.* 2012).

Die DNA ist in einem 20-seitigen Kapsid (Ikosaeder) dicht verpackt, dieses besteht aus 162 Kapsomeren (zu 960 Proteinen) und besitzt damit nach Caspar und Klug die

Einleitung

Triangulationszahl 16 (Caspar and Klug 1962). Das Kapsid der Herpesviren hat einen Durchmesser zwischen 115-130 Nanometern (McGeoch, Rixon *et al.* 2006). Biologisch-funktionale Merkmale einschließlich Artspezifität und genetischer Verwandtschaft führen im Gegensatz zu den morphologischen Charakteristika der Familie zu der Einteilung in die Unterfamilien der α -, β - und γ -Herpesviren (Davison, Eberle *et al.* 2009).

Die klare Zuordnung von Herpesviren zu ihren jeweiligen Wirtsorganismen scheint in ihrer Evolution begründet zu sein. Humane Herpesviren etwa unterliefen nicht nur einer Koevolution mit dem Menschen (Davison 2002). Seit der Entwicklung der verschiedenen Säugetiere (und auch schon früher mit Amphibien und Reptilien) entwickelten sich Herpesviren scheinbar mit den jeweiligen taxonomischen Gruppen koevolutionär. So konnte in phylogenetischen Untersuchung deutlich gezeigt werden, dass jeder neuen taxonomischen Gruppe von Säugern parallel eine neue taxonomische Gruppe von Herpesviren gegenübersteht (McGeoch and Cook 1994, McGeoch, Cook *et al.* 1995, McGeoch, Dolan *et al.* 2000). Diese Koevolution ist im engeren Sinne auf eine parallele Entwicklung bezogen, aber höchstwahrscheinlich im weiteren Sinne der Anpassung an und der Entwicklung mit einander zu sehen (McGeoch, Rixon *et al.* 2006). Bezüglich dieser Anpassung kann besonders ein Herpesvirus, das Cytomegalovirus, als eine Art Paradebeispiel für eine umfassende und rigorose Regulation der Wirtszellen mit der nahezu perfekten Kontrolle dieser angesehen werden (Noriega, Redmann *et al.* 2012).

1.1.2 Das humane Cytomegalovirus (HCMV)

Wie bereits erwähnt, ist HCMV als Herpesvirus strikt wirtsspezifisch (in diesem Fall humanspezifisch) und gehört zur Unterfamilie der β -Herpesviren. Beim Betrachten infizierter Zellkulturen durch das Mikroskop wird der Name Cytomegalovirus schnell verständlich. Zellen (auch *kýtos*, altgriechisch für Kammer/Höhle) welche infiziert sind, unterscheiden sich durch ihren angeschwollenen (also großen, im Altgriechischen *mégas*) Zellkörper stark von gesunden Zellen. Die Durchseuchung mit HCMV ist, wie bei vielen Herpesviren, mit bis zu 99% infizierten Menschen (etwa in Entwicklungsländern) hoch, wobei eine Infektion in immunkompetenten Menschen in der Regel asymptomatisch verläuft. Bei Immunsupprimierten, etwa während der Behandlung von Leukämien und Tumorerkrankungen, nach einer Transplantation oder durch eine HIV-Infektion, kommt es dagegen vermehrt zu Komplikationen und auch tödliche Verläufe sind möglich. AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*)-Patienten können durch HCMV ihr Augenlicht

Einleitung

verlieren (Jabs, Enger *et al.* 1989) und Transplantationspatienten droht der Verlust des transplantierten Organs (Reusser, Riddell *et al.* 1991). Auch während einer Schwangerschaft ist die (Primär)Infektion kritisch, da es nach einer intrauterinen Infektion des Fetus nicht nur in seltenen Fällen zu Aborten kommen, sondern die Infektion auch folgenschwere Fehlbildungen (wie Taubheit, Hepatosplenomegalie und Mikrocephalie) des Neugeborenen zur Konsequenz haben kann (Fowler, Stagno *et al.* 1992, van der Strate, Harmsen *et al.* 2001). Auf zellulärer Ebene vermitteln die Glykoproteine (g für *glycoprotein*) gM (UL100), gN (UL73), gB (pp65 bzw. UL83), gH (UL75), gL (UL115) und gO (UL74) die initiale Bindung an die sowie folgend die Verschmelzung mit der Wirtszelle (Compton 2004). Tegumentproteine sorgen folgend nicht nur für die Translokation des Kapsids zum Nukleus, sondern anschließend vermutlich auch für die Freigabe des viralen Genoms in denselben (Kalejta 2008 a, Kalejta 2008 b). Dort beginnt die Expression der viralen Proteine, welche in *immediate early* (IE), die sehr früh, *early* (E), die früh und *late* (L), die spät exprimierten Proteine unterteilt werden kann. Das Genom des humanen Cytomegalovirus besitzt eine ungefähre Größe von 230.000 Basenpaaren (Chee, Bankier *et al.* 1990) und damit im Schnitt mehr als ein Viertel der Kodierungskapazität von symbiontischen Bakterien, darunter zum Beispiel *Mycoplasma genitalium* mit 470 kodierenden Genen (Fraser, Gocayne *et al.* 1995, Moran and Wernegreen 2000). In Anbetracht der Gendichte und der Möglichkeit der erheblichen Unterschätzung der tatsächlichen Kodierungskapazität von HCMV durch überlappende offene Leserahmen (*open reading frames, ORFs*), durch Nutzung verschiedener Transkriptionsstartstellen, Spleißereignisse und nicht herkömmliche Translationsstart und -endpunkte dürfte die tatsächliche Anzahl an funktionellen Proteinen und RNAs weit darüber liegen (Biegalka, Lester *et al.* 2004, Cao and Geballe 1996, Gatherer, Seirafian *et al.* 2011, Grainger, Cicchini *et al.* 2010, Qian, Xuan *et al.* 2008, Stamminger, Gstaiger *et al.* 2002, Zhang, Raghavan *et al.* 2007). Neuere Ergebnisse lassen im Vergleich vom symbiontischen Bakterium *Buchnera* sp. CCE mit 396 Proteinen (Gil, Sabater-Muñoz *et al.* 2002) und HCMV mit 751 transkribierten offenen Leserahmen (Stern-Ginossar, Weisburd *et al.* 2012) die Aussage zu, dass HCMV eine höhere Kodierungskapazität besitzt als dieser einfache Prokaryont.

Diese Fülle an offenen Leserahmen erhöht nicht nur die generelle Möglichkeit von HCMV eine infizierte Zelle umprogrammieren zu können, sondern lässt auch Spielraum für die Kodierung immunevasiver Produkte wie miRNAs und Proteine. Diese sind für die lebenslange Persistenz des Virus im jeweiligen Wirt essenziell, denn nur durch die Kontrolle des Immunsystems kann diese gewährleistet werden (Noriega, Redmann *et al.* 2012).

Einleitung

Aber mit der Kontrolle der Immunantwort nicht genug, so werden zur Replikation unter anderem solche Organe (deren Zelltypen) infiziert, welche nur eine schwache Immunantwort erlauben, bzw. welche nur eine minimale Präsentation von Antigenen erreichen (wie etwa Epithelzellen der Speicheldrüse) und zudem die Verbreitung von HCMV über Körperflüssigkeiten erleichtern. Schlussendlich wird in der latenten (dauerhaften) Infektion die Expression viraler Proteine soweit wie möglich heruntergefahren, so dass eine sehr geringe Menge an Antigenen produziert wird und damit die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion des Immunsystems minimal ist. Nötig wird dies auch durch die zuvor erwähnte große Kodierungskapazität, welche gleichwohl auch für eine hohe Anzahl an möglichen Antigenen sorgt. Damit würde die Präsentation zahlreicher viraler Peptide, einhergehend mit einer schnellen Eliminierung infizierter Zellen und damit HCMV, möglich (Hengel, Brune *et al.* 1998).

1.2 Die MHC Klasse I Antigenpräsentation

Die Aktivierung von CD8-positiven T-Killerzellen stellt einen wesentlichen und für die (Immun-)Kontrolle von HCMV entscheidenden Mechanismus der antiviralen Immunantwort dar und wird durch die MHC Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation gewährleistet (Borysiewicz, Graham *et al.* 1988, Reusser, Riddell *et al.* 1991). Dabei werden proteasomal abgebaute Antigene, als Peptide, mit Hilfe des Peptidbeladungskomplexes (PLC, *peptide loading complex*) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dort sorgt der PLC für die Selektion und Beladung geeigneter antigenen Peptide in die Peptidbindungstasche der MHC Klasse I Komplexe. Diese können folgend als ternäre Komplexe mittels Golgivesikeln aus dem ER an die Zelloberfläche gebracht werden (Lie, Myers *et al.* 1990). Dieser Vorgang muss, in Anbetracht der schnellen Gen-Expression von Pathogenen, ausreichend rasch erfolgen. Der Peptid Pool, aus dem nur wenige Peptide (0,1%) tatsächlich präsentiert werden und nicht wie die Restlichen wiederverwertet und als Aminosäuren der Translationsmaschinerie zugeführt werden, kann dabei auf zwei Arten gebildet werden (Yewdell, Reits *et al.* 2003). Zum Ersten fließen komplett gefaltete und intakte Proteine, zum Zweiten aber auch so genannte fehlerhafte ribosomale Translationsprodukte (DRiPs für *defective ribosomal products*) in den Pool von Peptiden ein. Für virale Infektionen und damit Proteine scheint Letzteres der Weg zu sein, auf dem virale Peptide (umgehend) in den Pool gelangen (Esquivel, Yewdell *et al.* 1992, Khan, de Giuli *et al.* 2001).

Einleitung

Auf molekularbiologischer Ebene beginnt durch die Interaktion des membrangebundenen Chaperons Calnexin mit der N-Glykosylierungsstelle (Sequon) der MHC Klasse I schweren Kette (auch HC für *heavy chain*) der Aufbau des PLCs. Das lösliche beta-2-Mikroglobulin (β_2m) wird mittels dieser Bindung zur schweren Kette geleitet und es bildet sich der MHC Klasse I Komplex (Paulsson and Wang 2003). Durch die Modulation der räumlichen Anordnung dieses Komplexes kommt es schließlich zur Trennung vom Calnexin, welches durch das lösliche Chaperon Calretikulin ersetzt wird. Diese Interaktion bringt synchron Tapasin und die Oxidoreduktase ERp57 ein (Danilczyk, Cohen-Doyle *et al.* 2000, Zhang and Salter 1998), um so schließlich zusammen mit dem heterodimeren TAP-Transporter (TAP1/2) den Peptidbeladungskomplex zu vervollständigen.

Tapasin hat im PLC mehrere entscheidende Rollen. Es stabilisiert die Transporteruntereinheiten TAP1 und TAP2 (Bangia, Lehner *et al.* 1999), welche als TAP-Transporter die Peptide ins ER leiten. Durch die Verbindung des Transporters, über Tapasin, mit den MHC Klasse I Komplexen wird dann die Beladung der Komplexe mit Peptiden möglich. Weiterführend erlaubt Tapasin es, die reduzierende Wirkung von ERp57 auf die MHC Klasse I HC kontrollierbar zu machen, in dem es über eine Disulfidbrücke an die Oxidoreduktase ERp57 bindet. Dieses Heterodimer kann damit im PLC schließlich die essenzielle Auswahl von optimalen Peptiden, für die MHC Klasse I Komplexe, vollführen (Kienast, Preuss *et al.* 2007). Optimal oder suboptimal bestimmt sich dabei aus der Affinität der Peptidbindungstasche der MHC Klasse I HC für die Peptide. Nur die Optimalen werden durch Tapasin, aus dem Pool aller Peptide, auf den MHC I Komplex geladen (Howarth, Williams *et al.* 2004) und stabilisieren diesen in der Folge (Wearsch and Cresswell 2007). Ein weiterer Mechanismus, der scheinbar ebenfalls zur Peptidoptimierung führt (Paulsson, Jevon *et al.* 2006), ist der retrograde Transport der ternären Komplexe vom Golgi zum Endoplasmatischen Retikulum und damit verbunden wiederholte Durchgänge der MHC Klasse I Komplex Beladung im PLC. Auch dieses wird durch Tapasin vermittelt, indem es über ein Doppel-Lysinmotiv mit COPI (*coat protein I*) wechselwirkt (Paulsson, Kleijmeer *et al.* 2002).

1.2.1 Inhibition der MHC Klasse I Antigenpräsentation durch HCMV

Wie schon erwähnt erlaubt die verhältnismäßig (für Viren) große Menge an offenen Leserahmen von HCMV die Kodierung zahlreicher immunevasiver Produkte. Um etwa die Kontrolle der Immunantwort durch T-Killerzellen (und auch NK-Zellen (Farrell, Vally *et al.* 1997)) zu erreichen wird so der MHC Klasse I Antigenpräsentationsweg, als wichtiger Faktor dieser Immunevasion, durch HCMV stark beeinflusst (Ahn, Angulo *et al.* 1996). Vier Inhibitoren (die Genprodukte von US2, US3, US6 und US11) die diesen Einfluss vermitteln sind bereits detailliert beschrieben worden. Dies sowohl außerhalb (in Überexpressionssystemen) als auch im Viruskontext selbst (Hansen, Powers *et al.* 2010):

Die exakte Wirkungsweise, durch die das US3-Genprodukt die Antigenpräsentation inhibiert, konnte bisher nicht entschlüsselt werden. Gezeigt wurde aber, dass es in der Lage ist mit Tapasin und den MHC Klasse I Komplexen zu interagieren wodurch eine optimale Beladung dieser verhindert wird (Ahn, Angulo *et al.* 1996, Jones, Wiertz *et al.* 1996, Park, Kim *et al.* 2004).

Für das US6-Genprodukt wurde als biochemischer Vorgang bereits früh die, durch eine fehlende ATP-Bindung verursachte, Arretierung des TAP-Transporters und in der Konsequenz ein Abbruch des Peptidtransportes vorgeschlagen (Hengel, Koopmann *et al.* 1997). Es konnte gezeigt werden, dass gpUS6 dafür an die ER-luminal exponierten Bereiche der Transmembrandomänen von TAP1 und TAP2 bindet (Hewitt, Gupta *et al.* 2001).

Die US11- und US2-Genprodukte interagieren jeweils mit der MHC Klasse I HC, um sie retrograd ins Cytosol zu transportieren und so eine Präsentation von Peptiden zu verhindern. Nach dieser Translokation wird die MHC Klasse I HC schließlich gpUS11- beziehungsweise gpUS2-vermittelt dem Proteasom zugeführt (Jones, Wiertz *et al.* 1996).

1.2.2 Tapasin und eigene Vorarbeiten

Zur Untersuchung des Peptidbeladungskomplexes während der HCMV-Infektion wurde für Vorarbeiten eine HCMV-Deletionsmutante genutzt, welche die Gene *US2-US11* (siehe oben) nicht kodiert. Dieses Virus sollte auf Grund des fehlenden Genclusters die Fähigkeit verloren haben den Peptidbeladungskomplex in seiner Funktion zu stören. Tatsächlich zeigten durchgeführte Experimente während der Infektion (Deletionsmutante), dass dort eine aberrante Zusammensetzung des PLCs vorlag, also (mindestens) ein weiterer Mechanismus der Immunevasion zu den zuvor bereits beschriebenen (siehe 1.2.1) vermutet werden konnte (Halenius, Hauka *et al.* 2011).

Für detaillierte Analysen dieses Ergebnisses wurden Immunpräzipitate des PLCs aus Zelllysaten HCMV-infizierter und metabolisch markierter (sowie unmarkierter) Zellen untersucht. Diese Bedingungen erlaubten es im Experiment auch neusynthetisierte Proteine zu analysieren, da diese dem radioaktiven „*labeling*“ unterliegen und daher gesondert betrachtet wurden. So konnte zum Ersten gezeigt werden, dass in den untersuchten PLCs reduzierte Tapasinmengen vorlagen und zum Zweiten eine verminderte Neusyntheserate von Tapasin detektiert werden. Diese Reduktion begann 24 Stunden nach Infektion und wurde kontinuierlich stärker.

Auf Grund dieser verminderten *de novo* Synthese von Tapasin wurden folgend die Transkriptmengen der PLC-Komponenten mittels Northernblotting analysiert. Dabei konnte eine ebenfalls verminderte RNA-Menge von Tapasin gefunden werden (Halenius, Hauka *et al.* 2011). Um die Ursache dieser Regulation näher beschreiben zu können, sollte eine umfassende Analyse des Tapasintranskriptes vorgenommen werden. Beginnend beim 3'UTR und einer möglichen Interferenz von destabilisierenden Proteinen oder der Bindung einer negativ interferierenden miRNA (Stabilität der RNA), über die Integrität der mRNA, also etwaige Spleißeffekte, bis hin zu der Transkription selbst (mittels Promotoranalysen). Dazu wurde im Labor ein Reporterassay, die Methodik der mRNA Markierung sowie *knock downs* möglicher interferierender Proteine und Chromatin Immunpräzipitationen (ChIP) etabliert, um so die Regulation der Tapasintranskription in der Infektion aufzuschlüsseln.

1.3 Promotoren

Die Transkription von mRNA wird durch den Promotor kontrolliert. Blickt man auf die Forschung mit, an und über Promotoren, führt dieser Weg indirekt zurück zu dem Mann, der schon früh versuchte, die Viren zu entschlüsseln und zu verstehen, André Lwoff. Auch treffen sich dort Bakterien und Viren; durch die Forschungen an Bakteriophagen schuf sein Doktorand, Francois Jacob, die ersten Ergebnisse auf denen das heutige Verständnis und die Nomenklatur basieren (Jacob 1966). So wurde für Bakterien der Begriff des Operons erstmals für eine Gruppe von gleichregulierten Genen (die Expressionsstärke betreffend) vorgeschlagen (Jacob and Monod 1961, Monod and Jacob 1961). Zur Expression des Operons bzw. der Gene wurde von Jacob und seinen Mitarbeitern bald der Begriff des Promotors als induzierendes/kontrollierendes „genetisches Element“ gewählt (Jacob, Ullman *et al.* 1964) und auch weitestgehend übernommen, wengleich Epstein und Kollegen die Begrifflichkeit „genetisch“ strikt für ein exprimierbares, „funktionales cytoplasmatisches Produkt“ abgrenzen wollten (Epstein and Beckwith 1968). Nichtsdestotrotz blieb der Promotor die Sequenz, die die Initiation der Transkription ermöglicht. Der Transkriptionsstartpunkt in Bakterien (aber auch des SV40-Virus und Bakteriophagen: Lambda-Phage, fd-Phage und T7-Phage) wurde fast zeitgleich von vier Arbeitsgruppen im Frühjahr 1975 beschrieben (Pribnow 1975, Schaller, Gray *et al.* 1975, Sugimoto, Okamoto *et al.* 1975, Walz and Pirrotta 1975). Im Sommer desselben Jahres beschrieb David Pribnow, zusammen mit Heinz Schaller, eine Sequenz 10 Nukleotide vor der Startstelle, die sogenannte -10-Box bzw. Pribnow-Schaller-Box; zeitgleich konnte er die vorherigen Daten zum Transkriptionsstartpunkt zusammenfassen (Pribnow 1975). Nur ein Jahr später wurde ein weiteres Motiv, die sogenannte -35-Box gefunden, welche ebenfalls stark konserviert ist und mit der vorigen zusammen den Promotor von *E. coli* bildet (Rosenberg and Court 1979, Seeburg, Nüsslein *et al.* 1977, Takanami, Sugimoto *et al.* 1976). Doch dieser augenscheinlich einfache Aufbau lässt nicht zwangsläufig auf einen universellen Mechanismus schließen. So bindet jeweils einer von sieben unterschiedlichen Sigmafaktoren (σ -Faktor) an die Polymerase und bestimmt mit über die generelle Art des Promotors; dazu kommen mehr als 300 mögliche zusätzlich bindende Transkriptionsfaktoren (Ishihama 2012). Weiterhin finden sich zwei zusätzliche DNA-Sequenzen, das erweiterte -10 Element sowie das *Up*-Element und weitere Faktoren, die nicht DNA-bindend sind, aber mit Sigmafaktoren selbst assoziieren und die Transkription negativ oder positiv beeinflussen können (Browning and Busby 2004, Haugen, Ross *et al.* 2008). Promotoren vermeintlich einfacher Organismen sind somit in keinster Weise leicht zu

beschreiben oder einfach zu entschlüsseln bzw. vorauszusagen. Einhergehend damit steigt die Komplexität der Promotoren mit der des Organismus weiter an, vom Mykobakterium (*M. tuberculosis* und *M. smegmatis*) über die Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) bis zur Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) (Mencia, Moqtaderi *et al.* 2002, Newton-Foot and Gey van Pittius 2012, Ohler, Liao *et al.* 2002).

1.3.1 Promotoren der Invertebraten und Vertebraten

Bei der Beschreibung der Promotoren von Vielzellern (Metazoa) muss man zunächst eine Einteilung zwischen dem sogenannten distalen Promotor, dem proximalen Promotor sowie dem Kernpromotor treffen. Sowohl der distale als auch der proximale Promotor sind streng genommen nur vereinzelte oder auch in Clustern angeordnete regulatorische Elemente, welche die Aktivität des eigentlichen Promotors (Kernpromotors) positiv oder negativ regulieren können.

1.3.1.1 Distale Promotoren der Invertebraten und Vertebraten

Distale Promotoren werden daher meistens nur als Verstärker (*enhancer*) oder Dämpfer (*suppressor*) bezeichnet und können, wie zum Beispiel für das *Sonic hedgehog* (*Shh*) Gen der Maus beschrieben, auch 1 Mb (1 *megabasepairs*) von der Transkriptionsstartstelle entfernt liegen (Lettice, Heaney *et al.* 2003). Diese Art der Regulation ist bei den meisten Vielzellern (Metazoa) gegeben und der Eigenschaft der spezialisierten Gewebe bzw. Zellen, bei stets identischem Genom, geschuldet. So ist es notwendig, dass ein bestimmtes Gen in den verschiedenen Zelltypen mit einer spezifischen Stärke exprimiert ist. Da aber das Gen stets gleich ist, bleibt eine Regulationsmöglichkeit der Transkription (unabhängig von post-transkriptionellen Modifikationen) nur dann gegeben, wenn trotz einer relativ kurzen Nukleotidsequenz des Kernpromotors dennoch die Voraussetzungen für eine spezifische Regulation gegeben sind. Daten, welche keine Korrelation zwischen Anzahl der Gene und der Komplexität des Organismus bzw. der Anzahl unterschiedlicher Zelltypen pro Organismus zeigten, können diese Erklärung unterstützen (Bulger and Groudine 2011).

Enhancer-Sequenzen wurden als erstes im viralen Kontext entdeckt und beschrieben (Banerji, Rusconi *et al.* 1981, Moreau, Hen *et al.* 1981). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie stets

einen positiven Einfluss auf die Promotoraktivität ausüben. Dies geschieht unabhängig von ihrer Orientierung und über weite Entfernungen. Verstärker können auch im Intron des regulierten Gens oder sogar in den Introns benachbarter Gene lokalisiert sein. Dies macht sie zu schwer vorhersehbaren und analysierbaren Elementen. Eine Möglichkeit solche Verstärker vorherzusagen, ist der Vergleich der vorgelagerten Nukleotidsequenz eines entsprechenden (zu untersuchenden) Gens bei möglichst vielen Spezies. Der Evolution folgend sind funktionsrelevante Sequenzen in verschiedenen Spezies konservierter als Sequenzen mit keiner oder geringer Funktionsrelevanz, da deren Mutationen weniger stark pönalisiert werden. Tatsächlich war es so möglich, verschiedene *Enhancer* zu finden (Noonan and McCallion 2010, Visel, Rubin *et al.* 2009). Allerdings ist auch ein Großteil der *Enhancer* durch diese Methodik nicht identifizierbar. Zum einen weisen bis zu 90% eine starke Speziesspezifität auf und machen damit einen Vergleich mit anderen Säugern oder sogar nur innerhalb einer Unterklasse, zum Beispiel den Plazentatieren, unmöglich. Zum anderen kann der phylogenetische Unterschied noch zu gering sein um eine Sequenz als nicht-konserviert zu erkennen. So lässt diese Methode nur einen Erfolg von 10% zu (Odom, Dowell *et al.* 2007). Aktuell rückt das Histon 3 (Lysin-4) in den Fokus bei der Suche nach Verstärkern. So scheint es, dass Verstärker eine Art Fußabdruck mit bevorzugter Monomethylierung anstelle einer Trimethylierung des Lysins im Chromatin besitzen. Doch auch hier sind erste Ergebnisse teils widersprüchlich, mindestens aber deuten sie darauf hin, dass es starke Unterschiede alleine schon zwischen zwei verschiedenen Zelllinien gibt (Bulger and Groudine 2011). Die biologisch sinnvolle Variabilität von solchen *Enhancern* scheint einer generellen Beschreibung dieser entgegenzustehen, so dass ein exaktes und spezifisches Modell für den jeweiligen Organismus nicht möglich ist und eine Kartierung wahrscheinlich nur auf eine bestimmte Zelllinie eines Organismus zutrifft.

1.3.1.2 Kernpromotoren der Invertebraten und Vertebraten

Der Kernpromotor ist verhältnismäßig leicht zu identifizieren. Er umfasst den Startpunkt der Transkription (TSS für *transcription start site*), die Bindestelle der Polymerase sowie generelle Transkriptionsfaktor-Bindestellen (kurz GTF, für *general transcription factors*). Ein Beispiel eines klar definierbaren Transkriptionsstartpunktes ist dabei das *Inr* (*initiator element*) mit der Konsensussequenz C/T-C/T(C)-A₊₁-N-T/A-C/T-C/T (Kadonaga 2002).

Einleitung

Wie schon für die prokaryontischen, wurde auch für eukaryontische Promotoren die TATA-Box bzw. das Analog zur Pribnow-Schaller-Box beschrieben (Lifton, Goldberg *et al.* 1978). Die TATA-Box ist hochkonserviert und zwischen -25 bis -35 Nukleotide oberhalb der TSS (+1 Position) gelegen. Die ehemals als universal eingestufte Box ist allerdings nach heutigen Studien lediglich in 35% aller humanen Kernpromotoren aufzufinden (Gershenson and Ioshikhes 2005, Kim, Barrera *et al.* 2005, Moshonov, Elfakess *et al.* 2008, Yang, Bolotin *et al.* 2007). Zwangsläufig wäre so die Einteilung in TATA-abhängige und TATA-unabhängige Kernpromotoren möglich. Eine Untersuchung von *Drosophila* Promotoren verstärkte diese Theorie durch interessante Ergebnisse, die eine Einteilung in DPE (*downstream core promotor element*)-abhängige und TATA-abhängige Promotoren vermuten ließ (Burke and Kadonaga 1996). Das DPE liegt in einem genau definiertem Abstand von +28 bis +32 Nukleotiden nach dem A₊₁ der *Inr* und wurde ursprünglich in *Drosophila* Promotoren beschrieben, aber auch in humanen Promotoren entdeckt (Burke and Kadonaga 1997, Zhou and Chiang 2001). Hierbei ergab sich, dass, wenn auch nicht zu 100%, DPE-abhängige Promotoren deutlich weniger TATA-Boxen besitzen und dieses umgekehrt ebenfalls zutrifft. Beide Kernpromotoren kommen mit einer Häufigkeit von etwa 30% vor, genauso häufig wie Kernpromotoren ohne eine der beiden Sequenzen, während nur 10% sowohl TATA- als auch DPE-Sequenzen aufwiesen. Die DPE-Box funktioniert ausschließlich in Kombination mit der *Inr* und in dem zuvor beschriebenen Abstand zu dieser (Burke and Kadonaga 1996). Damit war nach diesen Daten eine (wenn auch nicht eindeutige und zu 100% allgemeingültige Einteilung) in diese drei Klassen von Kernpromotoren gegeben.

Wie Butler und Kadonaga festhielten, gibt es bei den TATA-abhängigen Kernpromotoren weiterhin eine Unterscheidung von kanonisch (TATAAA) oder nicht-kanonisch (eine AT-reiche Region ohne klaren TATA-Konsensus), welche die Kernpromotoren in zwei Gruppen teilt (Butler and Kadonaga 2002). Nur eine davon, die mit kanonischer Sequenz, ist bis zu diesem Zeitpunkt ausführlich beschrieben und untersucht (Smale and Kadonaga 2003). Es bestätigte sich, dass der Kernpromotor die ausschlaggebende Größe ist; durch distale Effekte sind lediglich schwächere zusätzliche Regulationen möglich. Gleichzeitig wurden zudem zahlreiche Gene gefunden, die mehr als einen Kernpromotor bzw. mehrere Transkriptionsstartpunkte besitzen (Carninci, Sandelin *et al.* 2006).

Aktuell werden Kernpromotoren daher nicht in TATA-abhängig oder unabhängig unterteilt, sondern zunächst über den Transkriptionsstartpunkt (TSS) definiert. Die Unterscheidung erfolgt dann zwischen gebündelt (fokussiert), mit einer klaren TSS und verteilt (dispers) mit vielen verstreuten TSS. Einige Kernpromotoren vereinen offensichtlich sogar beide Systeme,

Einleitung

wobei die Definition einer klaren TSS in der direkten Umgebung mehrerer TSSs zwangsläufig schwer ist und die Grenzen verschwimmen, so dass vereinfacht betrachtet auch diese Kombination unter die Kernpromotoren mit verteilten TSS fällt. Fokussierte Kernpromotoren sind häufig in weniger komplexen Organismen zu finden (wobei die Grenzen von komplexen zu weniger komplexen Organismen zwischen Invertebraten und Vertebraten zu ziehen ist), bei denen die Rate bei etwa 70% liegt und die eine Präferenz für CpG-Inseln haben. Typischerweise besitzen eher die fokussierten Kernpromotoren klassische Elemente wie TATA-box, *Inr* und DPE (Abbildung 2), während sie den dispersen fehlen (Juven-Gershon, Hsu *et al.* 2008).

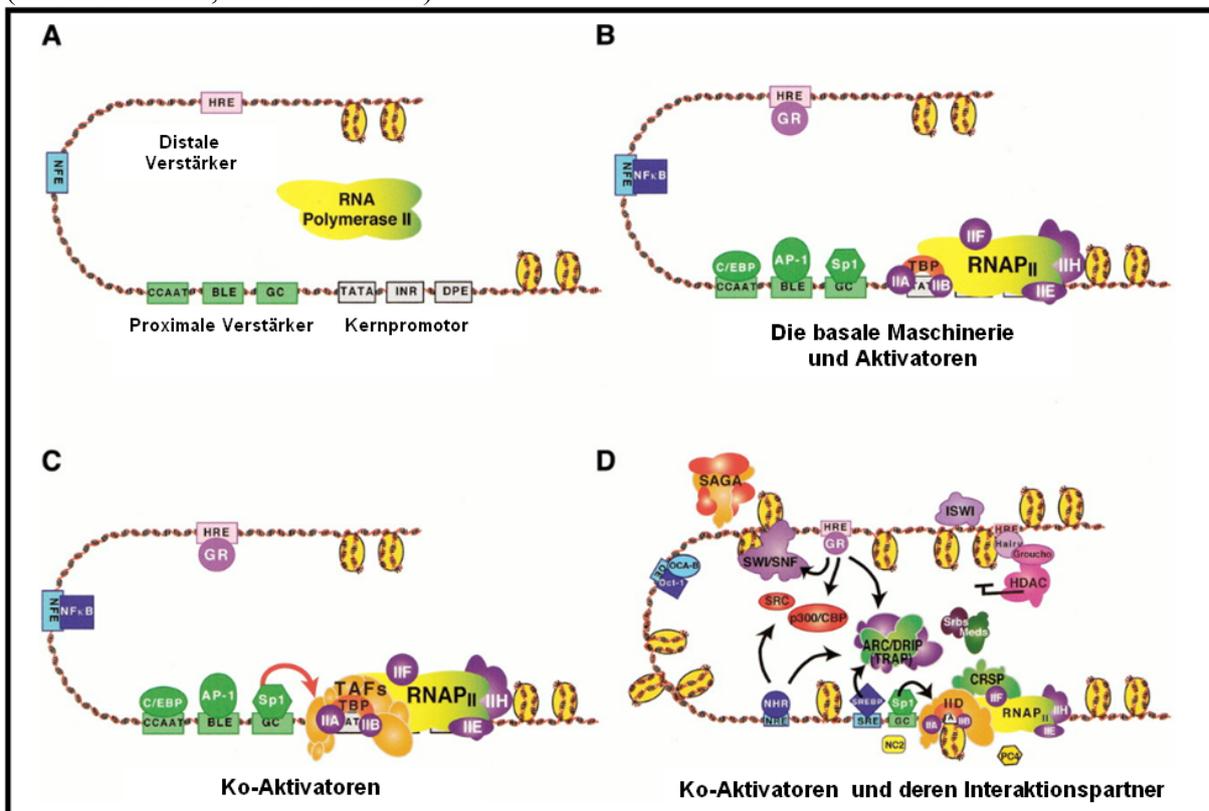


Abbildung 2: Skizzierte Lage und Interaktionen sowohl des Kernpromotors als auch der proximalen und distalen Verstärker. (A) Sequenzen (TATA, INR und DPE) der Kernpromotoren sowie verschiedene Elemente des proximalen Promotors (proximale Verstärker) sind gezeigt (BLE, GC- und CCAAT-Box in grün). Erste und vereinzelt Verstärker (distale Verstärker) sind in Form von NFE (NF- κ B bindendes Element) und HRE (*hormone responsive element*) skizziert. (B) Die basale Maschinerie sowie die bindenden aktivatorischen Proteine sind gezeigt, so C/EBP, AP-1 und Sp1 sowie NF- κ B und der *glucocorticoid receptor* (GR), welcher das HRE bindet. Weiter die Proteine der Initiationsmaschinerie der RNA-Polymerase II mit TPB (*TATA-box binding protein*) und die generellen Transkriptionsfaktoren (TF): IIA, IIB, IIE, IIF, IIH. (C) Der TFIID-Komplex mit den TAFs, welcher erst die volle Funktionalität gewährleistet, kann durch Verstärker des proximalen Promotors (Ko-Aktivatoren) induziert werden. (D) Weitere zahlreiche Ko-Aktivatoren, Repressoren und Aktivatoren sowie deren Interaktionen und Abhängigkeiten sind skizziert. Die Abbildung wurde aus Lemon and Tjian 2000 entnommen und Erläuterungen ins Deutsche übersetzt (Lemon and Tjian 2000).

Wie erwähnt, sind die meisten Studien an fokussierten Promotoren durchgeführt worden. Dort binden zunächst die generellen Transkriptionsfaktoren, die TFIIs (*transcription factor for RNA polymerase II*), von denen -A, -B, -D, -E, -F und -H vorkommen. Die Transkription kann

Einleitung

erst nach der Bildung des PIC (*preinitiation complex*) beginnen, welcher aus den genannten TFIIs und der Polymerase selbst besteht (Abbildung 2D). Bleiben wir bei den beiden Arten der fokussierten Promotoren (TATA-Box oder DPE) und betrachten dort die Bildung des PIC an der TATA-Box: Diese wird durch das TBP (*TATA-box binding protein*) gebunden, welches selbst Bestandteil von TFIID (einer speziellen Art dieses großen Proteinkomplexes) ist. Diese Bindung erfolgt durch die Unterstützung von TFIIA. Weiterhin sind TAF-1 und -2 (*TBP associated factor*) in TFIID gebunden und vermitteln ihrerseits die Bindung der *Inr*-Sequenz und so kann, nachdem auch TFIIIB an den Kernpromotor gebunden hat, der PIC seine funktionelle Konformation annehmen. Schlussendlich sorgen TFIIIE, TFIIIF und TFIIH für das Entwinden der DNA (Thomas and Chiang 2006).

Durch die Verdrängung des TBP durch NC2 (*negative cofactor 2*) und Mot1 (auch BTAF1, ATP-abhängige Helikase) wird die Bindung durch TAF-6 und -9 an die DPE-Sequenz favorisiert und die Rekrutierung von TFIID kann dorthin erfolgen (Hsu, Juven-Gershon *et al.* 2008, Thomas and Chiang 2006, van Werven, van Bakel *et al.* 2008). Somit kann NC2 die Nutzung von DPE-abhängigen Kernpromotoren vermitteln (Hsu, Juven-Gershon *et al.* 2008, Sikorski and Buratowski 2009, Willy, Kobayashi *et al.* 2000).

Innerhalb der fokussierten Kernpromotoren scheint die Aktivität von NC2 stark abhängig von den jeweiligen Elementen. So reduziert die Kombination aus TATA-box und *Inr* die Regulation durch NC2, beziehungsweise ist ein Vorkommen von NC2 an fokussierten TATA-box Promotoren dadurch geringer (Albert, Grote *et al.* 2010, Malecova, Gross *et al.* 2007). Jedoch nicht nur innerhalb der fokussierten Kernpromotoren scheint NC2 eine differenzierende und essenzielle Rolle zu spielen. So konnten Albert und Kollegen generell feststellen, dass unter starken Kernpromotoren NC2 hauptsächlich an dispersen Promotoren assoziiert ist (Albert, Grote *et al.* 2010).

1.3.1.3 Proximale Promotoren der Invertebraten und Vertebraten

Der proximale Promotor ist im Vergleich zum Kernpromotor von noch höherer Komplexität und Variabilität, so dass aktuell keine Studie gefunden werden konnte die schätzt wie viele mögliche Bindestellen für wie viele Transkriptionsfaktoren existieren. Die Länge des proximalen Promotors wurde mit ungefähr 200 Nukleotiden vor dem Transkriptionsstartpunkt beschrieben (Harvey Lodish 2000).

Einleitung

Der proximale Promotor umfasst dabei auch Bindestellen für eher generelle Transkriptionsfaktoren (Lemon and Tjian 2000). So etwa die BLE (*basal level enhancer*) Sequenz, welche von AP-1 (*activator protein 1*) gebunden wird und eine generelle Aktivierung vermittelt (Lee, Haslinger *et al.* 1987). Auch die GC-box, welche durch den Sp1 (*specificity protein 1*) Transkriptionsfaktor und die CCAAT-box, welche vom C/EBP (*CCAAT-enhancer binding protein*) gebunden wird, bilden allgemein aktivierende Interaktionen (Dyran and Tjian 1983, Johnson and McKnight 1989). Wie bereits erwähnt, finden sich spezifische Transkriptionsfaktor-Bindestellen auch weit entfernt vom Kernpromotor im distalen Promotorbereich. Diese Bindestellen, wie etwa für NF- κ B, oder die Hormon-responsiven Elemente und Faktoren zur Induktion Interferon-stimulierter Gene regulieren die Genexpression auf eine sehr spezifische Weise. Sie können auch im proximalen Promotor oder an der Grenze zu diesem liegen (Lemon and Tjian 2000).

Nachdem der Kernpromotor von der Polymerase II und ihren Kofaktoren gebunden wurde, die generellen Faktoren des proximalen Promotors sowie die distalen Verstärker ihren Einfluss geltend gemacht haben, kann die Polymerase mit der Synthese der prä-mRNA beginnen. Dazu muss nur noch eine abschließende Hürde, eine Art Polymerase-Pause, überwunden werden. Wie der Promotor ist auch dieser Mechanismus weit von einer kompletten Entschlüsselung entfernt. Es ist jedoch evident, dass durch die pausierende Polymerase eine weitere große Modulation erfolgen und der Promotor nicht zwangsläufig eine alleinige Aussage über die Stärke der Expression geben kann. Eventuell ist auch die Bindung der dortigen Faktoren ebenfalls in die Regulation der Polymerase-Pause eingebunden (Adelman and Lis 2012).

1.3.2 Promotoren und deren veränderte Aktivität nach Virus-Infektionen

Promotoren gehören zu den Zielen von Viren, nicht zuletzt da virale Promotoren ähnliche Bindestellen besitzen wie ihre Wirte. So können Viren (jene, welche im Kern replizieren) die Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle zweckentfremden. Hier sei nur an C/EBP und Sp1 (als generelle Aktivatoren) erinnert. Ob die Promotoren viraler Gene angepasst wurden oder Viren möglicherweise Promotoren in eukaryontische Zellen eingebracht haben, bleibt eine Frage der Evolutionsgenetiker und wird aktuell kontrovers diskutiert (Moreira and Lopez-Garcia 2009, Raoult 2009).

Einleitung

Für das Epstein Barr Virus (EBV) ist gezeigt worden, dass das EBNA1 (*EBV nuclear antigen 1*) die Expression von immunregulatorischen Genen restringiert, während es etwa solche für Zellwachstum oder Migrationsfähigkeit induziert; nicht überraschend daher, dass vier verschiedene Konsensussequenzen in den humanen Promotorsequenzen (etwa 100 unterschiedliche Sequenzen können von EBNA1 gebunden werden) existieren. Zusätzlich ist die gebundene Sequenz im EBV-Genom ebenfalls differenziell zu allen vier im humanen Genom (Canaan, Haviv *et al.* 2009). EBV ist somit in der Lage durch einen einzigen Transkriptionsfaktor gegensätzliche Funktionen auszuführen.

Ein Protein, welches die virale Latenz des KSHV (*Kaposi sarcoma-associated Herpesvirus*) reguliert, ist LANA-1 (*latency-associated nuclear antigen 1*). LANA-1 stört den Aufbau des IFN β Enhanceosoms: Es verhindert die Bindung von IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) und reduziert die Expression von CBP (*cAMP response element-binding protein*) (Cloutier and Flamand 2010).

Auch das humane Cytomegalovirus greift in die Promotorregulation ein. So exprimiert es das IE-Protein (pp72), welches Daxx bindet und damit zum Beispiel dessen Bindung an den LUNA (*latency-associated transcript*) Promotor verhindert, so dass dieser nicht von Daxx inhibiert werden kann (Reeves, Woodhall *et al.* 2010).

Durch diese drei Beispiele aus dem Bereich der Herpesviren wird deutlich, dass diese humane Promotoren gezielt steuern können.

1.4 Spleißen – eine kurze Übersicht

Beim Spleißen werden die Exons, also kodierenden Sequenzen der prä-mRNA, miteinander verknüpft und die dazwischenliegenden Introns herausgeschnitten (Abbildung 3B). Dieses passiert aktiv durch das so genannte Spleißosom, chemisch gesehen durch zwei Transesterifizierungen.

Zuerst attackiert das Adenosin (A) des Verzweigungspunktes (*BP, branchpoint*) (beide skizziert in Abbildung 3A) mit seiner 2'Hydroxylgruppe die Phosphodiesterbindung der 5'Spleißstelle (Spleißdonor, bzw. 5'SS). Bei diesem ersten Schritt bildet sich eine Intron-Lariat-Struktur an der 3'Spleißstelle (Spleißakzeptor bzw. 3'SS) sowie die freie 5'Spleißstelle (Abbildung 3B, Übergang *complex B* zu *C*). Diese attackiert anschließend mit ihrer 3'Hydroxylgruppe die Phosphodiesterbindung der 3'Spleißstelle, so dass beide Exons verschmelzen können und folgerichtig die Intronsequenz als Lariatstruktur ausgeschnitten

Einleitung

wird. Die involvierten snRNPs U2, U5 und U6 werden recycelt und der Bildung von neuen Spleißosomen zugeführt; das Intronlariat wird abgebaut. Für eine detailliertere Erläuterung wird der aktuelle Stand der Forschung von Wahl und Kollegen rezensiert (Wahl, Will *et al.* 2009).

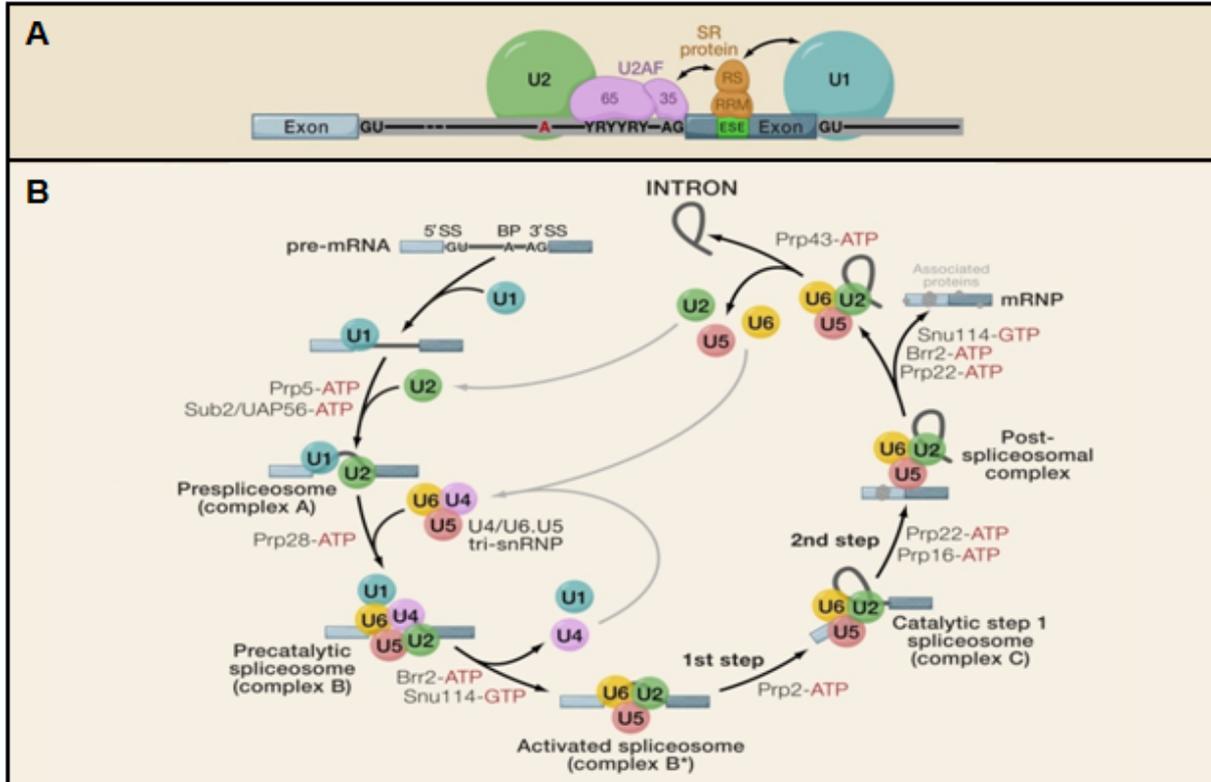


Abbildung 3: mRNA Spleißen und das Spleißosom. (A) Skizziert ist die Bindung durch ein SR-Protein an einen exonischen Verstärker (ESE für *exonic enhancer element*) mit seiner Arginin-reichen Sequenz (RS) über das RRE (*RNA recognition element*). Außerdem sind der Polypyrimidintrakt (YRYRYR, mit Y für Pyrimidin-Basen und R für Purin-Basen), der Verzweigungspunkt (A) und die Bindung der snRNP U1 und U2 sowie die Untereinheiten des U2AF gezeigt. (B) Gestützt durch SR-Proteine (*serine/arginine-rich proteins*) bindet die U1 snRNA komplementär an die 5'Spleißstelle. Synchron bindet der SF1/BBP (*splicing factor 1 / branchpoint binding protein*) Komplex und U2AF (*U2 auxiliary factor*) an den Polypyrimidintrakt und den Verzweigungspunkt. U2AF35 bindet das AG-Dinukleotid der 3'Spleißstelle und U2AF65 den Polypyrimidintrakt. Damit ist sowohl die 5' als auch die 3'Spleißstelle des Introns definiert und der spleißosomale E (*early*) Komplex gebildet. Unter ATP-Verbrauch (*adenosine triphosphate*) wird die U2 snRNA und somit der U2 snRNP an die Verzweigungssequenz rund um den Verzweigungspunkt gebunden. Diese Bindung wird sowohl durch Proteinuntereinheiten SF3a und SF3b (*splice factors 3a and 3b*) des U2 snRNP als auch des U2AF65 gestützt und bildet den spleißosomalen A Komplex (Gozani, Feld *et al.* 1996, Valcárcel, Gaur *et al.* 1996). Der bereits gebildete Komplex aus den snRNPs U4/U6/U5 wird abschließend gebunden, sodass der spleißosomale B Komplex entsteht. Dieser ist zu diesem Zeitpunkt noch inaktiv, erst nachdem die snRNPs U1 und U4 dissoziiert sind ist der Komplex aktiv (B*). Dieser katalysiert die erste Transesterifizierung und bildet dadurch Komplex C, welcher in der zweiten Transesterifizierung schließlich beide Exons verknüpft. Die Abbildung wurde aus Wahl, Will *et al.* 2009 entnommen und bildet einen Auszug der dortigen Abbildung.

1.4.1 G-run-reguliertes Spleißen

Beim alternativen Spleißen entstehen zusätzlich zu der klassisch gespleißten mRNA mRNA-Spezies, die Variationen in ihrem Aufbau aufweisen, so zum Beispiel Teile von oder

ganze Exons verloren haben oder zusätzliche Introns und/oder Intronteile besitzen. Durch ein solches Vorkommnis können auch mRNAs entstehen, bei denen der Protein-Leserahmen verschoben ist oder bei denen ein verfrühtes STOP-Kodon entstanden ist. Letztere RNAs werden meist mittels NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) abgebaut (Maquat 2004). Nicht jedes alternative Spleißen passiert jedoch ohne Ziel. Immer mehr Transkripte mit diversen alternativ gespleißten Exons und Introns werden entdeckt und deren kritische Rolle in der Entwicklung von Organismen und der Regulation spezifischer Zellfunktionen entschlüsselt (Kim, Magen *et al.* 2007). *G-runs* (Guanosincluster, mit einem G-Triplett (GGG als Kernsequenz)) können durch Spleißfaktoren gebunden werden und dadurch eine ergänzende Funktion für generelle Spleißfaktoren vermitteln. Sie bilden somit Bindestellen/Sequenzen des alternativen Spleißens. Sie können nicht nur die Bindung des U1 snRNP Komplexes direkt vermitteln, sondern können die Bindung des Spleißosoms generell verstärken (McCullough and Berget 2000, Wang, Mueller *et al.* 2011). Liegen die *G-runs* im Intron direkt nach der 5'Spleißstelle, haben sie häufig einen positiven Einfluss auf die Stärke der Spleißstelle. Diese Wirkung scheint bei Spleißstellen mittlerer Stärke am effektivsten zu sein (Xiao, Wang *et al.* 2009). Auf der prä-mRNA-Ebene werden solche *G-runs* von hnRNP-F oder -H Proteinen (*heteronukleäre Ribonukleoproteine*) gebunden, welche ihrerseits, abhängig von der Lage zur Spleißstelle, die Stärke dieser beeinflussen (Wang, Dimova *et al.* 2007).

1.5 miRNAs

Nicht nur die Stärke des Promotors oder das Spleißen haben Einfluss auf die Expression eines Gens, posttranskriptionell spielen miRNAs (*micro RNAs*) eine wichtige Rolle bei der Regulation der Translation. Erstmals wurden miRNAs 1993 im Fadenwurm *C. elegans* bei Studien zur Larvenentwicklung beschrieben (Lee, Feinbaum *et al.* 1993, Wightman, Ha *et al.* 1993). miRNAs sind in prozessierter Form ca. 20-25 Nukleotide lang. Aktuell geht man von etwa 800 verschiedenen miRNAs im Menschen aus; dieses entspricht in etwa der geschätzten Anzahl an Transkriptionsfaktoren (Krol, Loedige *et al.* 2010). Ähnlich der Regulation durch diese Faktoren sind auch miRNAs spezifisch für jeden Zelltypen. Zusammen mit der Möglichkeit (einer einzelnen miRNA) 100 bis 200 verschiedene mRNAs regulieren zu können (Brennecke, Stark *et al.* 2005, Krek, Grün *et al.* 2005), bilden sie ein Werkzeug der abgestimmten Expressionsregulation in der Entwicklung oder Spezialisierung einer Zelle

bzw. eines Gewebetyps (Lewis, Burge *et al.* 2005). miRNAs binden hauptsächlich im 3'UTR (*3' untranslated region*) von mRNAs. Dort ist die Konservierung der miRNA-Bindestellen im Laufe der Entwicklung offensichtlich gestiegen (Friedman, Farh *et al.* 2009).

Kodiert werden miRNAs in miRNA-Genen, welche auffällig weit von „normalen“ proteinkodierenden Genen entfernt liegen und eventuell sogar eigene Transkriptionseinheiten bilden (Bartel 2004). Andere, etwa ein Viertel der humanen miRNAs, liegen in Introns (nur teilweise in Exons) von mRNAs kodiert (Lagos-Quintana, Rauhut *et al.* 2003).

Nachdem die sogenannte pri-miRNA synthetisiert wurde, wird sie durch eine RNase III Endonuklease (Drosha) prozessiert, so dass ein Intermediat entsteht (ein etwa 60-70 Nukleotide umfassender *stem loop*), welches die pre-miRNA bildet (Lee, Ahn *et al.* 2003, Zeng and Cullen 2003). Nach dem Transport der pre-miRNA aus dem Nukleus wird diese durch Dicer, einer weiteren RNase III Endonuklease, editiert (Lund, Güttinger *et al.* 2004, Yi, Qin *et al.* 2003). Dicer sorgt dafür, dass am Ende dieser Prozedur nur noch ein kurzer RNA-Duplex übrigbleibt, der bereits zuvor den Doppelstrang gebildet hatte und nun vom *Loop* befreit ist (Bartel 2004). Abschließend wird der funktionale Einzelstrang in den RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut, um die Ziel-mRNA nach Bindung durch die dort enthaltenen Endonukleasen abzubauen oder das Ablesen der mRNA zu verhindern, also die Translation zu blockieren (Filipowicz, Bhattacharyya *et al.* 2008, Hammond, Boettcher *et al.* 2001).

1.6 Der Tapasinpromotor

Bei der ersten Analyse des Tapasings 1998, welches sich im erweiterten MHC Klasse II Locus befindet, ist nur wenig über den Tapasinpromotor publiziert worden. Zwar wurde bereits beschrieben, dass durch Interferon gamma (IFN γ) die Expression erhöht wird und dass sich dort spezifische Bindestellen, wie GAS (*gamma-Interferon activated sequence*) und ISRE (*interferon stimulated response element*) für IFN-induzierte Transkriptionsfaktoren finden lassen, jedoch wurden diese nicht weiter analysiert (Herberg, Sgouros *et al.* 1998). Weitere funktionale Untersuchungen wurden 2000 durchgeführt und zeigten einen Anstieg der Tapasin-mRNA nach Behandlung mit Interferon und/oder Tumornekrosefaktor alpha (TNF α). Für einzelne Stimuli zeigte sich IFN γ am potentesten, während eine Kostimulation bei der Kombination von IFN γ und TNF α die größtmögliche Induktion zeigte (Johnson and Mook-Kanamori 2000). Wenig später folgten erste Daten zur

Einleitung

Transkription in verschiedenen Tumorzellen und die Erweiterung der positiven Stimuli um Interferon alpha (IFN α) und Interleukin-4 (IL-4). GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) ist dagegen nicht in der Lage, die Tapasintranskription zu steigern (Seliger, Schreiber *et al.* 2001). In der Forelle zeigte sich in Untersuchungen mit dem IHN Virus (IHNV, *Infectious hematopoietic necrosis virus*) als Stimulans eine Induktion der mRNA-Menge bereits sechs Stunden nach Infektion (Landis, Palti *et al.* 2006). Daten bezüglich der IFN γ - und TNF α -Induzierbarkeit konnten auch in der Maus gefunden werden. Eine starke Abhängigkeit von sekundär IFN γ -induzierten Transkriptionsfaktoren konnte nicht eindeutig gezeigt werden (Abarca-Heidemann, Friederichs *et al.* 2002). Folgend wurden Daten aus der Maus publiziert und Experimente in Mauszellen durchgeführt. Diese Daten können als Anhaltspunkt dienen und sogar teilweise auf humane Zellen übertragbar sein, jedoch ergab sich in verschiedenen eigenen Vorarbeiten, dass die Transkription in humanen Zellen nur bedingt mit der in murinen korreliert (Halenius, Hauka *et al.* 2011). Dieses wird bestätigt durch eine geringe Homologie von 60% zwischen beiden Promotorsequenzen (Herrmann, Trowsdale *et al.* 2003). Aktuelle Vergleichsmethoden ändern diesen Wert auf 65% geringfügig nach oben (Abbildung 44 und 45, Appendix).

Im murinen System konnten Herrmann und Kollegen verschiedene Informationen zum Tapasinpromotor finden. So etwa, dass ein Transkriptionsstartcluster auf 50 Nukleotide (-10 bis -60) knapp vor dem ATG (Translationsstart) lokalisiert werden konnte und die meisten Transkripte dabei von den Positionen -53, -56, -58 und -59 starteten (Herrmann, Trowsdale *et al.* 2003). Diese Beobachtungen konnten so detailliert für den humanen Promotor bisher nicht gezeigt werden. Es scheint allerdings nach den Ergebnissen aller publizierten 5'UTR-Untersuchungen für humane Tapasin-mRNAs im „*Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway*“ möglich, dass mehrere auch weit auseinanderliegende Transkriptionsstartpunkte vorhanden sind (Abbildung 49 und 50, Appendix). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine vorhergesagte NF- κ B Bindestelle etwa 400 Nukleotide vor dem genannten Transkriptionsstartcluster funktional ist, während eine direkt an diesem Cluster liegende Bindestelle keine Funktionalität zeigte. Interessante Ergebnisse ergaben sich für die vorhergesagte IRF-1/2 Bindestelle und deren Umgebung. Bei einer Punktmutation dieser Bindestelle erhöhte sich die Aktivität des Promotors auf ein Maximum (von 400%), doppelt so hoch wie die des wildtypischen Promotors durch Interferonstimulation. Eine Stimulation mit IFN γ erzielte keinen zusätzlichen Effekt. Wurde die Sequenz großräumig deletiert, erhöhte sich die Aktivität dieser Promotormutante (166%), obwohl sie formal keine Transkriptionsstartstelle besitzt (Herrmann, Trowsdale *et al.* 2003).

Einleitung

Zusammenfassend blieb der humane Tapasinpromotor bisher ohne detaillierte Analyse und daneben zeigte sich für den murinen Tapasinpromotor ein unklarer Phänotyp, der viele Fragen bezüglich einer Regulation offen ließ. Weiter wurde mit Hilfe von E2F-überexprimierenden Tumorzellen in der Maus (HER-2/neu⁺) eine relativ moderate Abhängigkeit von E2F gezeigt (Bukur, Herrmann *et al.* 2010), die schon in früheren Publikationen von Herrmann und Kollegen zu erkennen war. Neuerliche Ergebnisse, die eine Abhängigkeit der Tapasintranskription von der β_2m -Expression zeigen sollen, sind an dieser Stelle auch zu nennen. Die Mechanismen, die zu dieser Induktion führen könnten, sind bisher nicht bekannt geworden. Ferner ist eine unabhängige Bestätigung der Induktion bisher ausgeblieben (Simone, Smith *et al.* 2012).

Für die Überexpression von PRDM1 (*PR domain-containing 1, with ZNF domain*, auch *Blimp-1, B lymphocyte-induced maturation protein-1*) ist eine deutliche Reduktion der Induktion von Tapasin durch IFN γ , aber auch der normalen Transkriptionsrate gezeigt. In PRDM1 *knock down* Experimenten ist eine leicht erhöhte Transkriptionsrate um das etwa 3-fache durch Doody und Kollegen gezeigt worden, wobei die Effekte durch die PRDM1 „*loss of function*“ (siRNA *knock down*) stets moderater sind als die des „*gain of function*“ (Überexpression) (Doody, Stephenson *et al.* 2007).

2 Ergebnisse

Mit Blick auf die stetige Ko-Evolution von Cytomegaloviren mit ihren Wirtsspezies, überrascht die feine Regulierung der menschlichen MHC-Antigenpräsentation durch das humane Cytomegalovirus mit einem regelrechten Orchester an Inhibitoren kaum. Philosophisch betrachtet dürfte das Hauptaugenmerk eines Virus, welches eine latente Infektion etabliert, natürlicher Weise darauf liegen, vom Wirtsorganismus nicht erkannt und eliminiert zu werden. Auch Zellen, welche nach der viralen Replikation, beim *Budding* (englisch für Knospung, also die Freisetzung neuer Viren), lysiert werden, müssen dieser Erkennung entzogen werden. Die Zeit von der Infektion bis zu dieser Freisetzung kann je nach Zelltyp mehr als eine Woche dauern (Smith and de Harven 1973); eine lange Zeit für das Immunsystem, die infizierte Zelle anzugreifen. Doch wie wird eine solche Regulation erreicht?

Im Gegensatz zum α -Herpesvirus Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1), welches die gesamte Proteinbiosynthese der Wirtszelle inhibiert und auch bereits transkribierte mRNA abbaut (Kwong, Kruper *et al.* 1988), agiert HCMV auf mehreren Ebenen. Es reguliert sowohl die Transkription und Translation als auch mRNA und Proteine selbst so, dass sie reduziert, stabilisiert oder auch induziert werden.

2.1 Die MHC Klasse I vermittelte Antigenpräsentation wird von HCMV durch zahlreiche Inhibitoren kontrolliert

Ein wichtiger Faktor der Immunantwort, gerade im Falle einer HCMV-Infektion, ist der MHC Klasse I vermittelte Antigenpräsentationsweg, welcher zur Aktivierung von $CD8^+$ T-Killerzellen führt. Tapasin ist ein entscheidender Bestandteil des hierfür notwendigen Peptidbeladungskomplexes (PLC). Der PLC selbst wird durch verschiedene HCMV-kodierte Inhibitoren in seiner Funktion gehindert. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden sowohl für MCMV (murines Cytomegalovirus) als auch HCMV zum Beispiel US2, US6 und US11 untersucht und charakterisiert (Benz and Hengel 2000, Halenius, Momburg *et al.* 2006, Hengel, Koopmann *et al.* 1997, Hengel, Lucin *et al.* 1994, Hengel, Reusch *et al.* 2000). Die genannten Genprodukte agieren alle stets auf der Ebene der Proteine, ohne jedoch die Transkription zu beeinflussen.

2.2 HCMV reduziert die Tapasintranskriptmenge

In eigenen Vorarbeiten wurde eine reduzierte Expression von Tapasin gefunden. Da synchron erhaltene Daten (Appendix, Abbildung 52 und 53) eine gezielte Kontrolle der Transkriptmengen zweier immunregulativer Gene gezeigt hatten, ergab sich in der Konsequenz daraus die Vermutung, dass diese Art der Regulation eventuell auch auf andere immunregulatorische Gene und damit Tapasin zutrifft (Zimmermann, Hauka *et al.* 2013). Tatsächlich konnte für Tapasin, (auch) bezogen auf andere PLC-Komponenten, darunter TAP1 und TAP2, in den zuvor erläuterten Untersuchungen (siehe 1.2.2), eine deutlich verminderte RNA-Menge bestätigt werden (Halenius, Hauka *et al.* 2011). Eine erste Analyse des Tapasinpromotors war, auf Grund geringer Kompatibilität des transienten Reporterassays mit der HCMV-Infektion, stark eingeschränkt und der genaue Mechanismus der Regulation blieb damit ungeklärt (eigene Vorarbeiten, Diplomarbeit).

2.2.1 Bestätigung der reduzierten Tapasintranskriptmenge mittels qPCR

Die Ergebnisse der Vorarbeiten wurden zunächst mit der sensitiven Methodik der qPCR bestätigt und quantifizierbar gemacht. Dazu wurden MRC-5 Zellen für 8, 24, 48 und 72 Stunden mit HCMV (Laborstamm AD169 und Deletionsmutante Δ US2-11) infiziert und weitere Zellen (als Positivkontrolle) mit $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ induziert. Mit der Behandlung von $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ konnte zunächst die Regulation der immunregulatorischen PLC-Komponenten kontrolliert werden; für alle Komponenten stieg die Transkriptmenge in der Zeitkinetik stetig an. Die TAP1-Untereinheit (Abbildung 4, TAP1) zeigte dabei die stärkste Induzierbarkeit, während das beta-2-Mikroglobulin (Abbildung 4, β_2m) nur leicht induziert wurde. In HCMV-infizierten Zellen zeigte sich dagegen ein deutlich differenzierteres Bild für die verschiedenen PLC-Komponenten. Die Vergleichbarkeit und Aussagekraft der Daten wurde durch den Abgleich gegen die 18SrRNA gewährleistet und ist stellvertretend durch die konstant gleichbleibende Quantifizierung von GAPDH gezeigt (Abbildung 4, GAPDH). Zum direkten Nachweis der Infektion und aktiven Replikation des Virus diente die mRNA von UL37 (*envelope glycoprotein UL37*). UL37, welches größtenteils für das pUL73x1 (für Exon 1) beziehungsweise vMia (*viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis*) Protein kodiert, wurde als passende Kontrolle angesehen, da es sowohl während der kompletten Infektion exprimiert (*immediate early*, *early* und *late* (IE, E und L)) als auch

Ergebnisse

gespleißt wird (Mavinakere and Colberg-Poley 2004, Pari, Field *et al.* 1995, Smith and Pari 1995). Die großen Mengen an viraler DNA in HCMV-infizierten Zellen erhöhen das Risiko einer falsch positiven Detektion in der quantitativen PCR, so dass auf ein gespleißtes Transkript zurückgegriffen wurde, um nur komplett prozessierte RNA zur Kontrolle der Infektion zu betrachten. Zur besseren Veranschaulichung ist UL37 als einzige Ausnahme in x-facher Induktion gegenüber der mittleren Transkriptmenge aller Zeitpunkte der Infektion dargestellt. Der Anstieg in der Infektionskinetik verdeutlichte die fortschreitende Replikation.

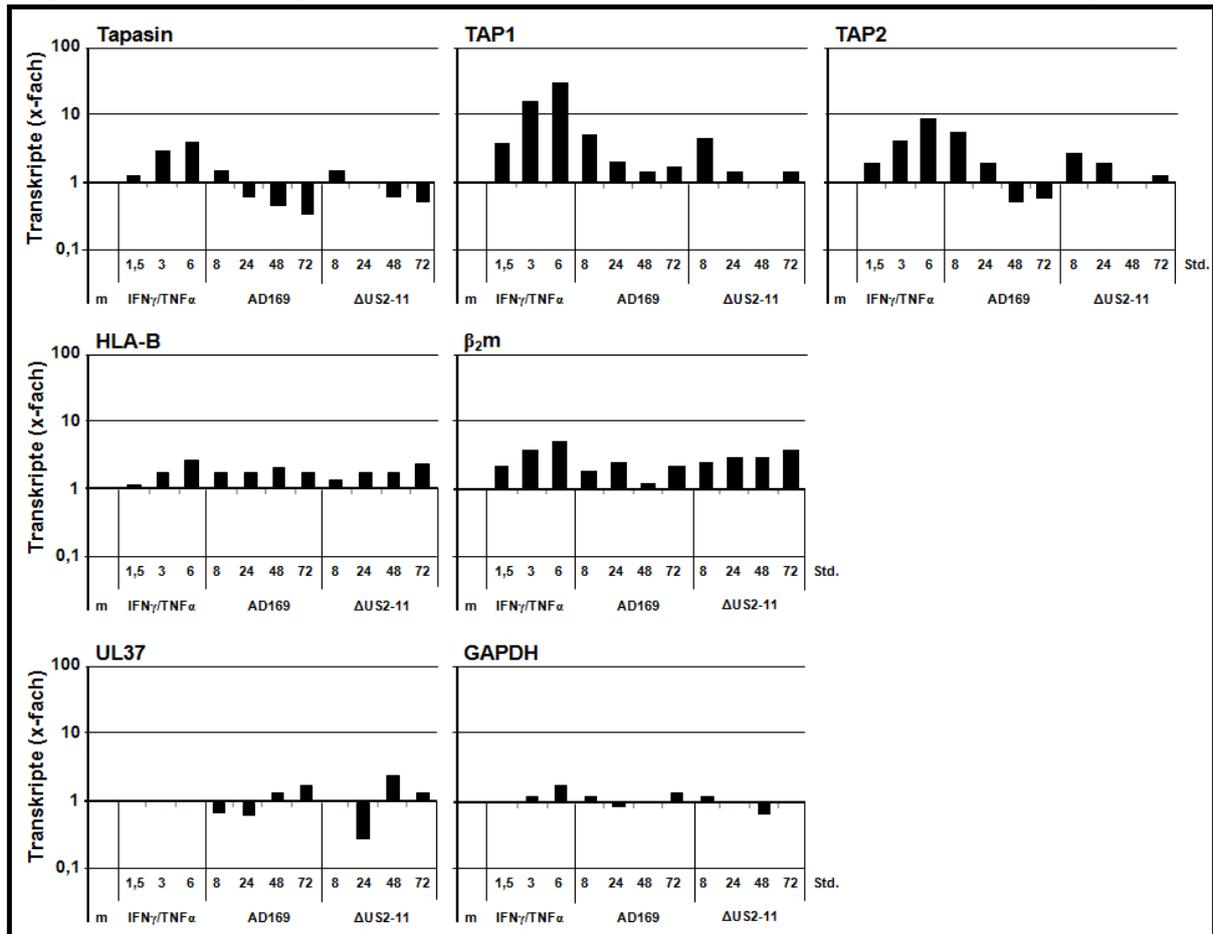


Abbildung 4: Relative Transkriptmengen verschiedener PLC-Komponenten in infizierten Zellen. MRC-5 Fibroblasten wurden mit dem HCMV-Laborstamm AD169 und der Deletionsmutante Δ US2-11 infiziert (MOI 5). Synchron wurden Kontrollzellen mit 500 U/mL IFN γ und 25 ng/mL TNF α oder mock behandelt. Die Zellen wurden 8, 24, 48 und 72 Stunden, respektive 1,5, 3 und 6 Stunden nach Infektion/Stimulation lysiert, die RNA extrahiert, revers transkribiert und mittels qPCR mit spezifischen Primern für die angegebenen Transkripte analysiert. Transkriptmengen sind in x-fach gegenüber mock dargestellt. Gezeigt ist repräsentativ für mindestens drei biologische Replikate ein typisches Ergebnis der qPCR, jeweils abgeglichen gegen RNA der 18S rRNA (Halenius, Hauka *et al.* 2011). Zur Berechnung der x-fachen Änderung des viralen UL37 Transkriptes wurde der Mittelwert der Transkriptmenge aller infizierten Zellen und Zeitpunkte gebildet und als Referenzwert gesetzt.

Die auf Transkriptebene erwartete Induktion des HLA-B Allels (MHC Klasse I HC, *heavy chain*) und β_2 m konnte auch hier beobachtet werden (Halenius, Hauka *et al.* 2011). Eine minimal stärkere Responsivität von β_2 m nach dem IFN γ /TNF α -Stimulus war auch durch die Infektion zu sehen und scheint ein genereller Effekt auf die Transkription zu sein, unabhängig des Stimulus, der hier verwendet wurde (Abbildung 4, HLA-B und β_2 m). Für Tapasin war

Ergebnisse

während der frühen Infektion, nach 8 Stunden, zunächst keine Reduktion der Transkriptmenge zu detektieren; tatsächlich aber, wie bei allen untersuchten Komponenten des Peptidbeladungskomplexes, eine erhöhte Menge an Transkripten. Jedoch sank nach dieser Induktion die mRNA-Menge bereits 24 Stunden nach Infektion (24 Std. n. I. bzw. h.p.i. für *hours post infection*) deutlich ab, um im Verlauf der Infektion immer weiter, bis auf ein Minimum von 30% der ursprünglichen Transkriptmenge zu sinken (Abbildung 4, Tapasin). Die späte Regulation (24-48 Stunden nach Infektion) spiegelte sich sowohl für Tapasin als auch für TAP1 und TAP2 wider (Abbildung 4, TAP1 und TAP2). Das finale Absinken der Transkriptmenge nach 72 Stunden wurde für Tapasin exklusiv beobachtet, wie auch die nur marginale Induktion 8 Stunden nach Infektion. Die Reduktion der Tapasin-mRNA war damit mittels qPCR bestätigt worden und trat innerhalb der untersuchten PLC Komponenten mit spezifischem Phänotyp auf.

2.2.2 Wie wird die Tapasintranskriptmenge reguliert?

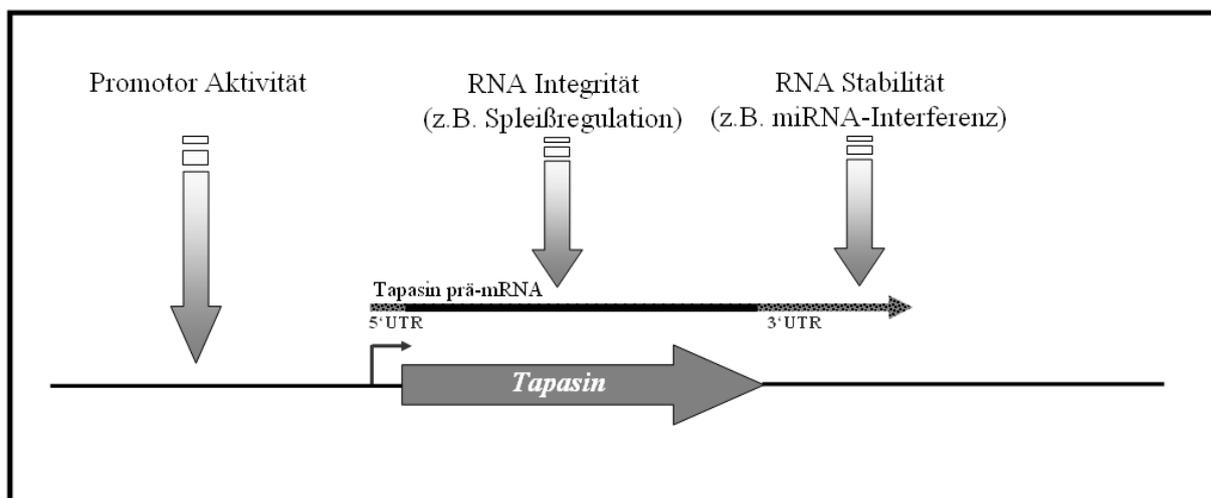


Abbildung 5: Auflistung aller untersuchten, die Transkriptmenge beeinflussenden, Faktoren. In der skizzierten Darstellung (Längen des 3' und 5'UTRs (*untranslated regions*) sind nicht maßstabsgetreu) der Synthese des Tapasintranskriptes sind schematisch der Tapasinpromotor (mit einer *transcription start site* (TSS) als Pfeil) sowie die Tapasin prä-mRNA mit 5'UTR, Intronsequenzen und 3'UTR aufgezeigt. Über die drei Faktoren; Promotor Aktivität, RNA Integrität und RNA Stabilität kann die Menge eines spezifischen Transkriptes einer Zelle beeinflusst werden.

Die Regulation der Tapasintranskriptmenge kann drei verschiedene Ursachen haben, da, wie in Abbildung 5 gezeigt, drei Faktoren maßgebend für die Menge einer spezifischen mRNA sind.

Ergebnisse

Diese sind:

- 1) Die Syntheserate der mRNA, gleichbedeutend mit der Promotoraktivität.
- 2) Die RNA-Integrität, unter anderem bestimmt durch Spleißereignisse und deren korrekten Ergebnissen (da andernfalls ein Abbau mittels NMD (*nonsense mediated mRNA-decay*) erfolgt).
- 3) Die Stabilität, die maßgeblich durch die Länge der mRNA (des 3'UTRs) und damit einhergehende mögliche Bindestellen für regulatorische Faktoren, beeinflusst wird.

2.2.3 Die HCMV-kodierte miRNA US25.2 reduziert die Tapasinexpression nicht

Vor der Analyse der RNA-Stabilität selbst wurde zunächst der Einfluss eines viralen miRNA-Gens auf die Tapasinexpression untersucht. Den Vorhersagen folgend hätte die von diesem Gen (*miR-US25.2*) transkribierte miRNA möglicherweise das Tapasintranskript binden können. Zusammen mit anderen miRNA-Genen wurde dieses Gen von unserem Kooperationspartner (Ofer Mandelboim, Tel Aviv) durch *in silico* Analysen vorhergesagt.

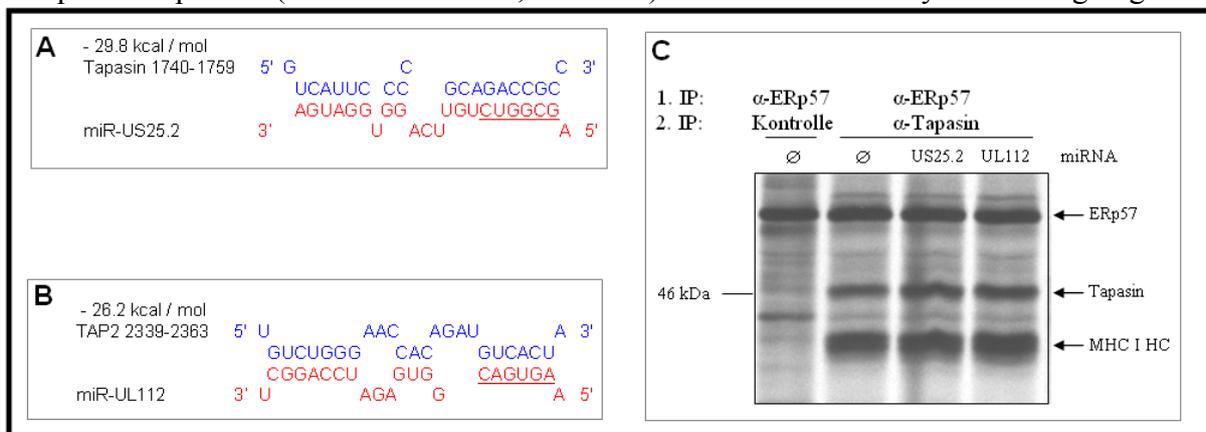


Abbildung 6: Einfluss der miRNA US25.2 und UL112 auf die Tapasinexpression. (A) Bindungsenergie, komplementäre Nukleotide und Kernbindungsbereich (unterstrichen) der miR-US25.2 an das Tapasintranskript. (B) Bindungsenergie, komplementäre Nukleotide und Kernbindungsbereich (unterstrichen) der miR-UL112 an das TAP2-Transkript. (C) Immunpräzipitation (IP). miRNA-Gene wurden in HeLa-Zellen lentiviral transduziert. Anschließend wurden alle exprimierten Proteine für 2 Stunden mit radioaktivem Schwefel (^{35}S in Methionin/Cystein) markiert. ^{35}S -markierte Proteinlysate aus nicht (\emptyset) und miRNA-Gen transfizierten Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiografisch detektiert. Präzipitiert wurde mit Anti-ERp57 (*mouse ascitic fluid*, Upstate) und Anti-Tapasin (STC, (Tan, Kropshofer *et al.* 2002)) oder Kontrollantikörpern.

Da die RNA-Stabilität nur durch die Interaktion mit einer degradierenden miRNA beeinflusst wird, während eine nicht-degradierende miRNA ohne Effekt auf die RNA-Stabilität bleibt, wurde hier die Proteinexpression untersucht, um beide Arten des miRNA-Einflusses beobachten zu können. Dazu wurde die miRNA nach lentiviraler Transduktion von

Ergebnisse

HeLa-Zellen überexprimiert und die Expression von Tapasin mittels Immunpräzipitation analysiert. Dazu wurden die neusynthetisierten Proteine für 2 Stunden mit radioaktivem Schwefel (^{35}S in Methionin/Cystein) markiert. Die erste Präzipitation wurde mit ERp57 durchgeführt und zeigte für alle Lysate die gleichen (eingesetzten) Proteinmengen an. Die zweite Präzipitation wurde mit Tapasin- oder Kontroll-Antikörpern durchgeführt. Die Präzipitation von ERp57-Ko-präzipitiertem Tapasin ist in Spur 2 (Abbildung 6C) zu erkennen und wurde weder durch die miRNA UL112 in Spur 4 (welche als miRNA Kontrolle genutzt wurde) noch durch die potenziell Tapasin-mRNA bindende miRNA US25.2 in Spur 3 in der Expression reduziert. In der reinen Ko-Präzipitation war nur eine geringe Menge an Tapasin detektierbar, welche für eine quantitative Aussage nicht ausreichend war (Spur1) und eine Tapasin-IP notwendig machte. Schlussendlich ergab sich aus diesem Experiment kein Hinweis auf die Regulation von Tapasin durch die analysierten viralen miRNAs.

2.2.4 Das Tapasin 3'UTR und ein frühzeitiges alternatives PolyA-Signal

Die durchschnittliche Länge eines 3'UTRs (*3'-untranslated region*) humaner mRNAs liegt bei etwa 1.000 Basenpaaren (Pesole, Mignone *et al.* 2001). Damit ist das 3'UTR von Tapasin mit 2.066 Basenpaaren überdurchschnittlich lang. Eine Vorhersage über die dadurch möglicherweise erhöhte oder verminderte Stabilität ist jedoch nicht möglich. Gleichwohl verhält es sich so, dass eine längere Sequenz mehr Möglichkeiten einer positiven/negativen Regulation bedingt. Für Tapasin ergeben sich so zum Beispiel potenzielle Bindestellen für regulatorische miRNAs (wie zuvor bereits teilweise analysiert), welche negativ mit der mRNA interferieren könnten. Diese Möglichkeit wurde unter 2.2.3 und wird unter 2.2.5 sowie 2.2.6 behandelt.

Weiter ist es denkbar, dass ARE-BPs (*AU-rich element-binding proteins*) mit dem 3'UTR interagieren und die Stabilität verändern. In Abbildung 7B sind mögliche Bindestellen skizziert, die das Ergebnis einer *AREsite Database* (siehe nachfolgende Referenz) Analyse des Tapasin 3'UTRs (als Voraussage aus der annotierten genomischen Sequenz) ergaben (Gruber, Fallmann *et al.* 2011). Darunter drei mögliche Konsensussequenzen mit der Kernbindestelle ATTTA und eine mit der erweiterten Bindestelle WWWATTTAWWW (wobei W für *weak* und damit die schwachen Wasserstoffbrückenbindungen von Adenosin und Thymin steht). Die Möglichkeit einer Bindung von negativ interferierenden ARE-bindenden Proteinen, die die Stabilität und damit die Halbwertszeit des

Ergebnisse

Tapasintranskriptes beeinflussen könnten, ist demnach gegeben. So wäre die reduzierte Transkriptmenge von Tapasin mit einer verminderten mRNA-Stabilität erklärbar. Die Stabilität und Halbwertszeit während der Infektion, explizit die Veränderungen dieser, wird unter 2.2.5 geklärt werden.

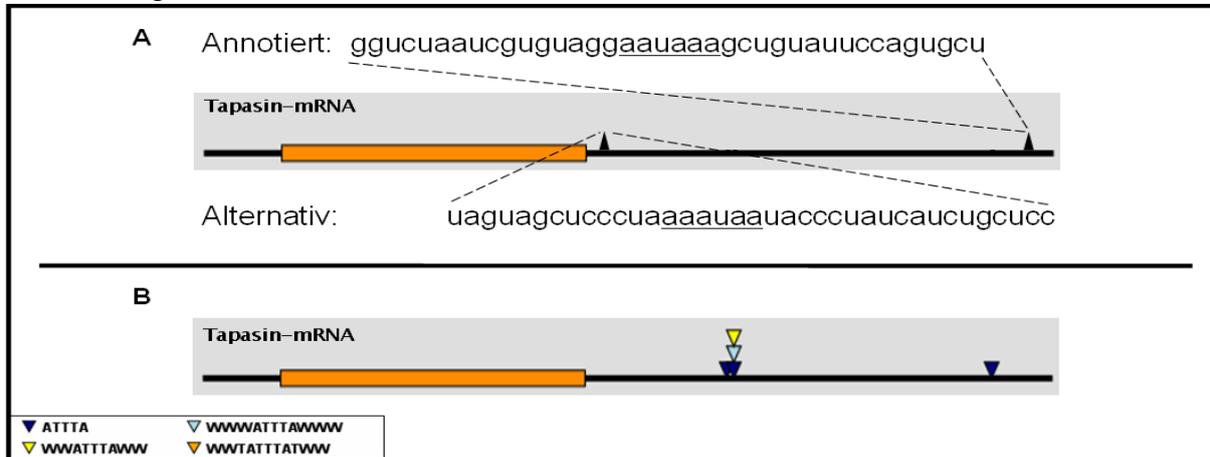


Abbildung 7: Lokalisation eines alternativen Poly-Adenylierungssignals und AREs (*AU-rich elements*) im 3'UTR des Tapasintranskriptes. (A) Gezeigt ist (anhand der Grafik der unten genannten Analysemaschine), in genomischer Sequenz (U=T), die umgebende Sequenz des annotierten bzw. alternativen Poly-Adenylierungssignals der Tapasin-mRNA. 66 Basenpaare hinter dem STOP-Codon liegt das möglicherweise alternative Poly-Adenylierungssignal (AAAUAA), während das annotierte Poly-Adenylierungssignal 2.000 Basenpaare davon entfernt lokalisiert ist (AAUAAA). (B) Die *AREsite Database* (Gruber, Fallmann *et al.* 2011) Analyse ergab im 3'UTR drei Elemente mit der Kernkonsensussequenz ATTTA, von der eine die erweiterte Sequenz von WWWATTAWWW (mit W als A bzw. T) aufwies. In *downstream* Richtung errechneten sich dabei Wahrscheinlichkeiten einer nicht durch Sekundärstrukturen blockierten und damit möglicherweise Protein/RNA-Interaktionen zulassenden RNA von: 0,77; 0,76 und 0,57.

Wie von Barreau und Kollegen gezeigt, bedeuten diese möglichen Bindestellen jedoch keinesfalls, dass ausschließlich Proteine (ARE-BPs) gebunden werden, welche die Stabilität reduzieren. Diese altherkömmliche, klassische Annahme einer ausschließlich schwächenden Regulation konnte widerlegt werden (Barreau, Paillard *et al.* 2005). Vielmehr können auch Proteine dort binden, die die Stabilität des Transkriptes fördern. Tapasin besitzt neben dem annotierten Poly-Adenylierungssignal (PolyA-Signal) ein zusätzliches möglicherweise alternatives Signal (Abbildung 7B). Würde dieses putative (frühzeitige) Poly-Adenylierungssignal genutzt werden und dadurch das 3'UTR verkürzt, ergäbe sich ebenfalls eine Möglichkeit, die Reduktion der Tapasintranskriptmenge zu erklären. Um festzustellen, ob dieses Poly-Adenylierungssignal tatsächlich genutzt wird, wurden die Primer dieser PCR so *upstream* und *downstream* der Poly-Adenylierungssignale positioniert, dass sie Änderungen in der Nutzung aufzeigen konnten. Die Amplifikation von gDNA-Hintergrund (genomische DNA) war über den Einschluss des Intron 7 in der Analyse ausgeschlossen.

In den PCRs wurde unter Nutzung aller erwähnten Kontrollen jedoch kein Hinweis auf die Nutzung dieses Signals gefunden (nicht gezeigte Daten). Somit ergaben sich keine Hinweise auf eine Regulation der Tapasintranskriptmenge über die Verkürzung des 3'UTRs.

2.2.5 Die Stabilität des Tapasintranskriptes ist während der HCMV-Infektion unverändert

Wie bereits erwähnt (2.2.3), wird durch die Analyse der Stabilität der Tapasin-mRNA gleichzeitig der Effekt einer möglicherweise degradierenden miRNA untersucht. Eine „nicht-degradierende“ miRNA würde dagegen im Widerspruch zu den Ergebnissen der RNA-Analyse (2.2.1), explizit dem Phänotyp der reduzierten RNA-Menge, stehen. Dort wären auch vermeintlich miRNA-gebundene, nicht-abgebaute mRNAs in der PCR detektiert worden. Folgend hätte es durch sie nicht zu einer reduzierten mRNA-Menge kommen können, so dass für den Phänotyp der reduzierten mRNA-Menge nur eine miRNA-Regulation einer degradierenden miRNA möglich gewesen war.

Um einen Überblick über die allgemeine Stabilität, also die Halbwertszeit der Tapasintranskripte während der Infektion zu erhalten, wurden Zellen infiziert und kontrollbehandelt. 36 Stunden nach Infektion begann für 0, 5, 10 und 24 Stunden die Behandlung mit Actinomycin D beziehungsweise DMSO (Dimethylsulfoxid), welches als Lösungsmittel diente (Abbildung 8A). Actinomycin D ist ein potenter Inhibitor der RNA-Polymerase II und verhindert so umgehend die Neusynthese aller Polymerase II-abhängigen Transkripte (so auch die der meisten miRNAs). Somit gibt die RNA-Menge nach der Behandlung mit Actinomycin D Hinweise auf die Stabilität der vorhandenen RNA. Das Transkript des *SOCS3* (*Suppressor of cytokine signaling 3*) Gens besitzt eine Halbwertszeit, die geringer als 30 Minuten ist (Ehling, Lai *et al.* 2007) und sollte die Effektivität der Transkriptionshemmung wider spiegeln (Abbildung 8B, SOCS3). Nach der Behandlung mit Actinomycin D sank die Nachweisbarkeit von SOCS3-mRNA zu allen Zeitpunkten auf ein absolutes Minimum. Die Behandlung mit DMSO zeigte keinen Einfluss auf die analysierten Transkripte im Vergleich zum Zeitpunkt 0 ohne DMSO. Zur Kontrolle der Linearität der PCR und der in dieser Analyse Tapasin-spezifischen Reduktion während der Infektion wurde eine β_2m -PCR mit geringer (25x) und erhöhter (30x) Zyklenzahl durchgeführt. Im Vergleich der mock- und HCMV-Infektion für DMSO und Actinomycin D behandelten Zellen war die β_2m -Transkriptmenge in den HCMV-infizierten Zellen erhöht. Dieses spiegelte die bereits

Ergebnisse

bekannten Ergebnisse der vorherigen RNA-Analyse wider (Abbildung 4, β_2m). Die Halbwertszeit des β_2m -Transkriptes war länger, als der in diesem Versuch analysierte Zeitraum, so dass das β_2m -Transkript als Kontrolle (optischer Abgleich in der sqRT-PCR) gegenüber dem GAPDH-Transkript, mit einer Halbwertszeit von 8 Stunden, bevorzugt wurde. So konnten auch zu späteren (als 8 Stunden) Zeitpunkten die eingesetzten RNA-Mengen kontrolliert werden (Dani, Piechaczyk *et al.* 1984).

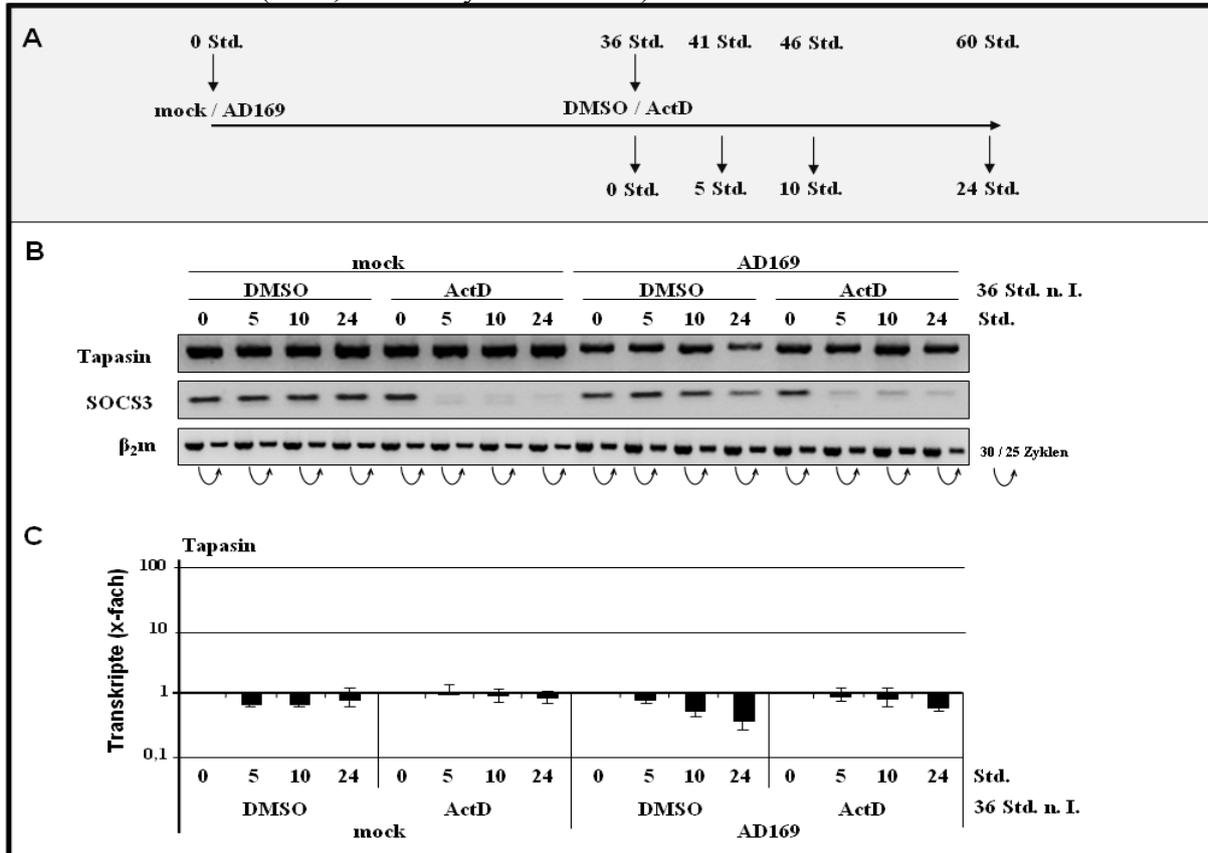


Abbildung 8: Die Halbwertszeit des Tapasintranskriptes ist in infizierten Zellen nicht vermindert. (A) MRC-5 Zellen wurden mock- oder HCMV-infiziert und 36 Stunden nach Infektion oder Kontrollbehandlung für 0, 5, 10 und 24 mit DMSO oder Actinomycin D (ActD, 4 $\mu\text{mol/mL}$) behandelt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurde die RNA extrahiert und per RT-PCR analysiert. (B) 50 ng RNA wurden mittels semiquantitativer RT-PCR und Primerpaaren für Tapasin, SOCS3 und beta-2-Mikroglobulin (β_2m) analysiert. (C) 500 ng RNA wurden mittels Tapasin-Primern quantifiziert. Dabei sind hier die Ergebnisse ohne Abgleich gegen eine Kontrolle gezeigt, um auch minimale Rechenfehler durch die gegebene Regulation der Kontrollen zu verhindern. Die Verhältnisse wurden intern für jede Behandlung zum 0 Stunden-Wert verrechnet.

Auch die Halbwertszeit der Tapasin-mRNA lag in diesem Versuch außerhalb des Messfensters von 24 Stunden, dies war in der absoluten Quantifikation (Abbildung 8C, mock und ActD Behandlung) besonders gut sichtbar. Bei infizierten Zellen war die fortschreitende Reduktion der Tapasintranskriptmenge erkennbar (DMSO behandelte Zellen), während in ActD behandelten Zellen diese typische Reduktion durch HCMV reduziert war. Die Halbwertszeit der Tapasin-mRNA war während der Infektion zu keiner Zeit signifikant verringert, wodurch eine Regulation über stabilitätsbeeinflussende Proteine durch dieses Experiment ausgeschlossen werden konnte.

Ergebnisse

Die Interferenz durch eine degradierende miRNA konnte hier nicht vollständig aufgeschlüsselt werden. So könnten die leicht verminderten Mengen der Tapasin-mRNA in infizierten Zellen nach Actinomycin D Behandlung (Abbildung 8C) durch eine verringerte Interferenz einer miRNA (welche selbst durch Actinomycin D gehemmt ist und deshalb nur geringfügig mit der Tapasin-mRNA interferiert) begründet sein (Punkt 3.2 der Diskussion). Um (unter anderem) dieses zu verifizieren, wurde folgende Analyse bei gehemmter Translation durchgeführt.

2.2.6 Die Verhinderung von NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) kann die Tapasintranskriptmenge nicht wiederherstellen

Eine negativ-regulative Interaktion von destabilisierenden Proteinen an die ARE-Konsensussequenzen war, wie zuvor beschrieben, nicht gegeben. Die negative Regulation durch eine nicht-degradierende miRNA war, den Ergebnissen folgend, ebenfalls nicht zu vermuten und für die reduzierten Transkriptmengen nicht verantwortlich. Folglich könnte ein anderer Punkt der Regulation (Abbildung 5) dafür verantwortlich sein, das Spleißen.

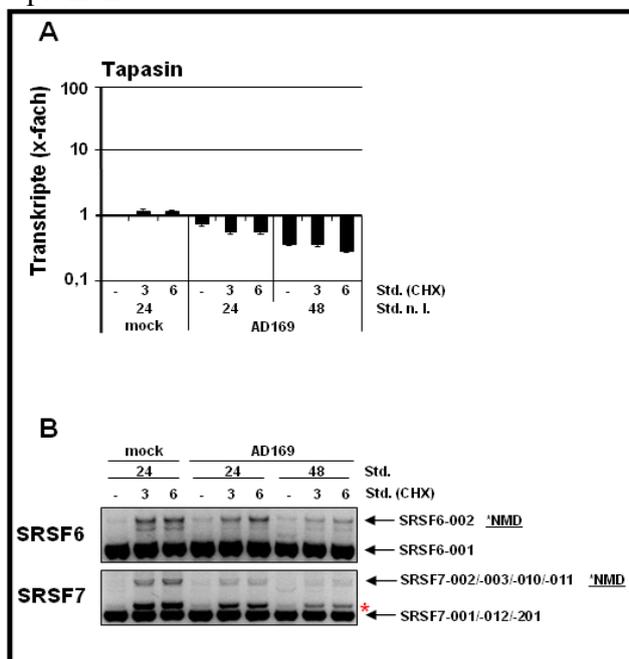


Abbildung 9: Unveränderte Reduktion der Tapasintranskriptmenge bei inhibiertem NMD. MRC-5 Fibroblasten wurden mock und HCMV-infiziert. Nach 24 und 48 Stunden wurden für die angegebenen Zeiten Cycloheximid (100 µg/mL CHX) ins Medium gegeben, die Zellen geerntet und die RNA extrahiert. (A) 150ng RNA wurden mittels Tapasin-spezifischen Primern und qRT-PCR analysiert. Dabei sind die Ergebnisse ohne Abgleich gegen eine Kontrolle gezeigt. So wurde ein Einfluss durch die Regulation der Kontrollen selbst auf das Ergebnis vermieden. Die Mengenänderung der Transkripte ist gegenüber unbehandelten Zellen (mock 24 Std. (-)) in x-fach dargestellt. (B) 250 ng RNA wurden mittels SRSF6 und SRSF7 Primern in einer semi-quantitativen *one-step* RT-PCR analysiert. Die proteinkodierenden Varianten SRSF6-001 und SRSF7-001/-012/-201 sind durchgehend detektierbar, die NMD-Varianten (*NMD) nur unter Verhältnissen inhibierter Translation. Eine weitere bisher nicht annotierte Version konnte für SRSF7 gefunden werden (*).

Durch ein verändertes Spleißverhalten kommt es in den Fällen, in denen ein Exon (nicht durch drei teilbar) heraus- oder ein Intron (nicht durch drei teilbar oder inklusive eines im Leserahmen liegenden STOP-Codon) hineingespleißt wird, zum Abbau der RNA durch den Kontrollmechanismus des *nonsense-mediated mRNA decay*, kurz NMD. Dieser Abbau

Ergebnisse

könnte, da er mechanistisch unmittelbar an das Spleißen anschließt, mitunter so schnell erfolgen, dass er nicht im Experiment zur Bestimmung der Halbwertszeit (2.2.5) messbar ist. So wäre die Transkriptmenge verringert, bevor diese Analyse (genauer die PCR) messen würde. Das Ergebnis der Halbwertszeitanalyse wäre jeweils gleich, unabhängig ob NMD vorliegt oder nicht. Lediglich der Startpunkt, also die RNA-Menge zu Beginn, wäre im NMD-Fall reduziert. Eng verknüpft mit dem NMD ist der Mechanismus degradierender miRNAs, so dass die endgültige Analyse von degradierenden miRNAs (da eine Interferenz wie zuvor erwähnt, experimentell nicht eindeutig geklärt werden konnte) mit dem folgenden Experiment ebenfalls untersucht werden konnte. Um einen vermeintlichen NMD-Effekt messbar zu machen, bedient man sich der Inhibition der Translation, genauer der Ribosomen. Sind diese nicht mehr aktiv, so ist auch kein NMD mehr möglich (Nicholson, Yepiskoposyan *et al.* 2010).

Unter den Bedingungen einer inhibierten Translation mittels Cycloheximid (CHX) und damit verhindertem NMD war die bekannte Reduktion der Tapasintranskriptmenge erneut deutlich gegeben. Mit fortlaufender Infektion nahm, wie bereits beschrieben (Abbildung 4, Tapasin), die Reduktion weiter zu und zeigte sich in CHX-behandelten Zellen unverändert (Abbildung 9A). Um zu kontrollieren, dass der NMD unter den gewählten Konditionen inhibiert war, wurden die Transkripte von SRSF6 und SRSF7 (*serine/arginine-rich splicing factors*) analysiert (Abbildung 9B). Für das Transkript von SRSF6 ist bekannt, dass es eine Variante (002) besitzt, die durch NMD abgebaut wird (*Ensembl project genome database: ensembl.org., TranscriptID: ENST00000244020 und ENST00000483871*) (Lareau, Inada *et al.* 2007). In Abbildung 9B war diese Variante in den CHX-behandelten Zellen deutlich detektierbar und zeigte die Inhibition des NMD an. Für SRSF7 sind mehrere Varianten bekannt, welche normalerweise durch NMD abgebaut werden. Diese waren, wie bei SRSF6, unter Konditionen der inhibierten Translation ebenfalls detektierbar (Abbildung 9B, SRSF7-002/-003/-010/-011). Eine zusätzliche, bisher nicht beschriebene Variante (Abbildung 9B, roter Asterix), welche ebenfalls durch NMD abgebaut wird, wurde nicht weiter analysiert.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass es für die Tapasin-mRNA weder durch das Spleißen noch durch eine miRNA-Interferenz zum NMD während der Infektion kommt. Alle weiteren Szenarien (bezüglich des Spleißens), die nicht zu NMD führen, sind durch flankierende Primer detektierbar und hätten bereits in den Vorarbeiten entdeckt werden müssen. Nichtsdestotrotz wurde diese PCR zur Bestätigung im Folgenden wiederholt.

2.3 NeTT – *New Tapasin Transcript*

Um einen generellen Überblick über die Spleißereignisse der Tapasin-mRNA zu erhalten, bei denen es nicht zum Abbau der mRNA kommt, wurden in eigenen Vorarbeiten bereits Primer genutzt, die den Bereich zwischen dem ersten und dem letzten Exon für Analysen erfassen. Bei der erneuten Analyse der Spleißereignisse in infizierten Zellen ergab sich dabei nach wie vor ein „unverändertes Spleißmuster“. Das heißt, die Anzahl der unterschiedlichen Banden (gleichbedeutend mit Transkriptvarianten) änderte sich in der PCR zwar nicht, es kam aber erneut zu einer erhöhten Transkriptmenge einer kürzeren Transkriptvariante, bei welcher sich nach einer Sequenzanalyse das Fehlen von Exon 3 ergeben hatte (eigene Vorarbeiten, Diplomarbeit).

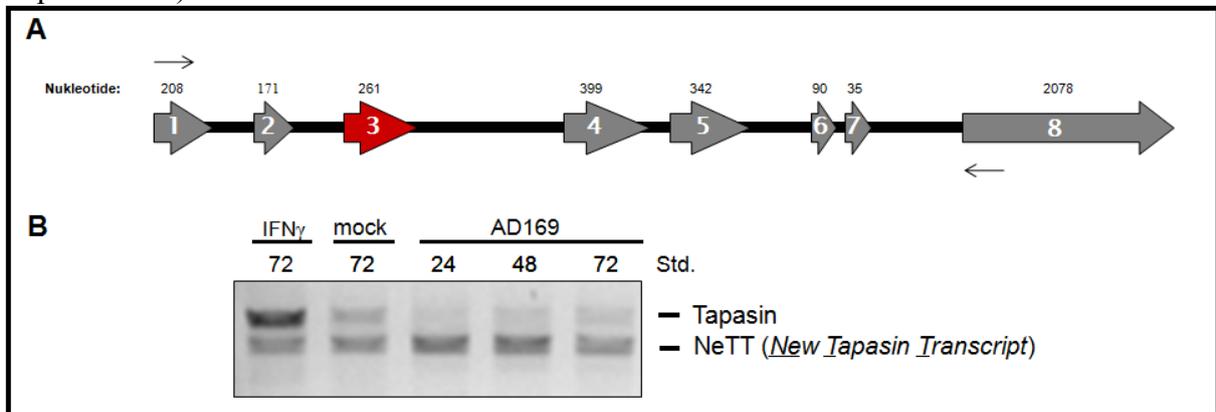


Abbildung 10: In infizierten Zellen ist die NeTT-Transkriptmenge induziert. (A) Das Schema zeigt skizziert die Exons/Introns des Tapasintranskriptes, gibt die Größe der Exons an und zeigt die Lage der Primer zur Amplifikation des ganzen Transkriptes (NM_003190.4). (B) MRC-5 Fibroblasten wurden IFN γ -induziert und mock- beziehungsweise HCMV-infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert, die RNA extrahiert und mittels semiquantitativer RT-PCR und Tapasin-spezifischen Primern (Pfeile in A), die zu Beginn des Exon 1 und 8 binden, das Spleißmuster in je 150 ng RNA analysiert.

Der Verlust von Exon 3 führt zu einem unveränderten Leserahmen, da Exon 3 selbst 261 Nukleotide umfasst und impliziert einen Verlust des dort kodierten, für die Bindung zu ERp57 essenziellen, Cystein 95. Synchron zur ersten Detektion dieses neuen Tapasintranskriptes (*New Tapasin Transcript*, NeTT (bzw. Δ Exon3)) wurde die Sequenz bereits in die Datenbank des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) eingetragen und später mit differenziellen Ergebnissen zu den folgenden Daten publiziert (Belicha-Villanueva, Golding *et al.* 2010).

2.3.1 NeTT modifiziert die MHC Klasse I Oberflächenexpression

In silico Analysen ließen den Schluss zu, dass NeTT auf Grund des fehlenden Exon 3 und damit einhergehend dem Verlust von Cystein 95 nicht in der Lage ist, mit ERp57 zu interagieren (Abbildung 11A und B). Diese Interaktion ist jedoch essenziell für die Funktion von Tapasin bezüglich der Peptidbeladung der MHC-Klasse I HC/ β_2m Heterodimere im PLC. Abbildung 11B zeigt die Kristallstruktur von Tapasin (Dong, Wearsch *et al.* 2009); gelb markiert ist in Abbildung 11A (Molekülprojektion) Exon 3, welches dem NeTT-Protein fehlt. Abbildung 11B zeigt die kovalente Bindung zwischen ERp57 und Tapasin; die Bedeutung dieser Interaktion wurde hinlänglich beschrieben (Dong, Wearsch *et al.* 2009, Panter, Jain *et al.* 2012) und führte zu der Hypothese, dass ein mögliches NeTT-Protein die Interaktion von Tapasin und ERp57 kompetitiv hemmen und somit einen negativen Einfluss auf die Tapasinfunktion und damit die MHC-Peptidbeladung haben könnte.

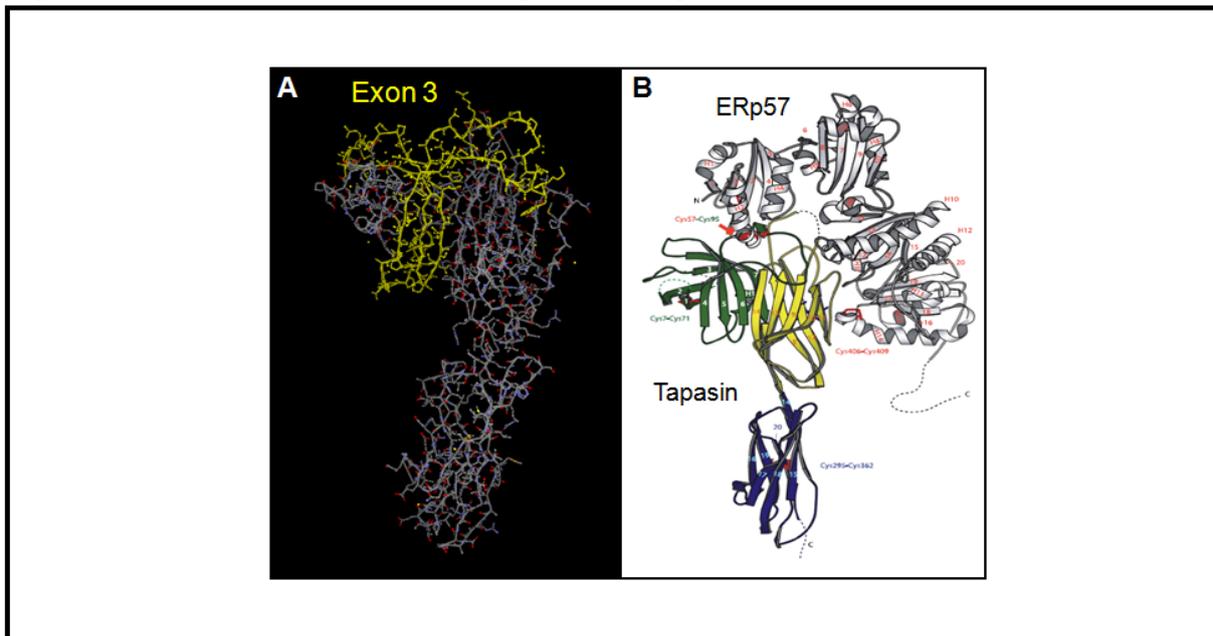


Abbildung 11: Tapasin, Exon 3 (NeTT) sowie die essenzielle Schwefelbrücke zwischen Tapasin und ERp57. (A) *In silico* Projektion der Struktur von Tapasin durch die *3D Molecule Viewer Software* (Vector NTI Advance 10, Life Technologies) mittels der Daten der *RCSB Protein Databank* (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3F8U>). In gelb ist die von Exon 3 kodierte Region des Proteins gezeigt. (B) Strukturanalyse der Interaktion von Tapasin und ERp57, als Auszug übernommen und beschriftet (ERp57 und Tapasin) aus Dong, Wearsch *et al.* 2009. Markiert (roter Pfeil auf Cys57-Cys95) ist die essenzielle Schwefelbrücke zwischen Tapasin und ERp57, die in dem Bereich des Proteins liegt, welcher von Exon 3 kodiert ist.

Die Expression des NeTT-Proteins nach transienter Transfektion und stabiler Transduktion der cDNA sowie die Stabilität des Proteins konnten anschließend in der Arbeitsgruppe untersucht werden (Beutler, Hauka *et al.* 2013). Es ergab sich dabei wie erwartet keine Interaktion des NeTT-Proteins mit ERp57. Die Interaktion mit dem TAP-Transporter war im

Ergebnisse

Vergleich zu Tapasin gleich effizient. So konnte zusammenfassend die Ausgangshypothese zu diesem Protein, als negativ mit Tapasin interferierend, erhärtet werden. Die Fähigkeit von NeTT, die Funktion von Tapasin zu reduzieren, konnte in HLA-B*44:02 (Tapasin-abhängiges MHC-Allel) transfizierten Zellen gezeigt werden. Auch im Kontext unabhängiger beziehungsweise aller zellulären MHC I Allele, zeigte sich eine Veränderung des „Ligandoms“. So waren in (HeLa-) Zellen, in denen NeTT zur Expression gebracht wurde, ein Verlust von etwa 40% Diversität, die präsentierten Peptide betreffend, zu beobachten. Außerdem fand sich ein Pool von NeTT-spezifisch präsentierten Peptiden, was zusammen mit den zuvor beschriebenen Daten eine deutliche Änderung des präsentierten Peptidpools durch die Expression von NeTT anzeigte (Beutler, Hauka *et al.* 2013). Weiterhin ergab sich die interessante Möglichkeit, die bisher noch nicht abschließend geklärte Stöchiometrie des PLCs weiter aufzuschlüsseln. Denn tatsächlich bindet, den Ergebnissen der Immunpräzipitationen folgend, an alle Komplexe mit gebundenem NeTT auch stets ein Tapasin-Molekül (Beutler, Hauka *et al.* 2013).

Nachdem die postulierte Funktion von NeTT in Überexpressionsexperimenten bestätigt werden konnte, erhärtete sich die Theorie, dass HCMV die Expression von NeTT während der Infektion erhöht. Durch eine stabile beziehungsweise induzierte Expression könnte HCMV die optimale Antigenpräsentation möglicherweise stören. Um zu bestimmen, ob die NeTT-mRNA-Mengen während der HCMV-Infektion verändert sind, wurde mit modifizierten PCR-Programmen und spezifischen Primern (um eventuelle Bevorzugungen kleiner (NeTT) oder großer (Tapasin) Varianten vorzugreifen) eine detaillierte Quantifizierung der Tapasin- und NeTT-mRNA-Mengen durchgeführt.

2.3.2 Erhöhte Mengen NeTT in HCMV-infizierten Zellen

Um die in der semi-quantitativen PCR gefundenen, erhöhten NeTT-Transkript-Mengen (Abbildung 10) genau quantifizieren zu können, wurden Primer so entworfen, dass sie nur solche Transkripte erfassen, die entweder Exon 3 enthalten, also vollständige Tapasintranskripte sind, oder solche die das Exon 3 nicht besitzen, also ausschließlich NeTT erfassen. Die Spezifität der Primerpaare wurde durch linearisierte Tapasin und NeTT cDNA-Vektoren in 500 ng RNA Tapasin-defizienter Zellen (.220 B-Lymphozyten) (Greenwood, Shimizu *et al.* 1994, Tan, Kropshofer *et al.* 2002) getestet (Abbildung 12 A1 und A2).

Ergebnisse

Mit den Quantifizierungs-Primern konnte die zuvor beobachtete Regulation von Tapasin (Abbildung 4) reproduziert werden (Abbildung 12B). Die Regulation durch HCMV wurde sogar deutlicher, wenn für die Quantifikation ein Primer benutzt wurde, der im Exon 3 bindet. Die NeTT-Transkript-Mengen dagegen blieben während der Infektion stabil, nachdem sie bereits früh erhöht waren (Abbildung 12C). Unabhängig von der Expression der Gene *US2-US11* wurde dieselbe Regulation detektiert (Vergleich AD169 und Deletionsmutante Δ US2-11). Nachdem die Transkripte von Tapasin und NeTT in jeweils 500 ng RNA bestimmt worden waren, wurde nicht nur die x-fache Veränderung berechnet, sondern auch zu allen Zeitpunkten die prozentuale Konzentration der NeTT-Variante zu Tapasin. Dabei ergab sich für nicht-infizierte Zellen ein Wert von 1,5%; dieser Wert stieg durch die stabile Menge an NeTT-Transkripten und die gleichzeitige Reduktion von Tapasin auf einen Maximalwert von 7,5% (Abbildung 12D, Δ US2-11, 48 Stunden nach Infektion).

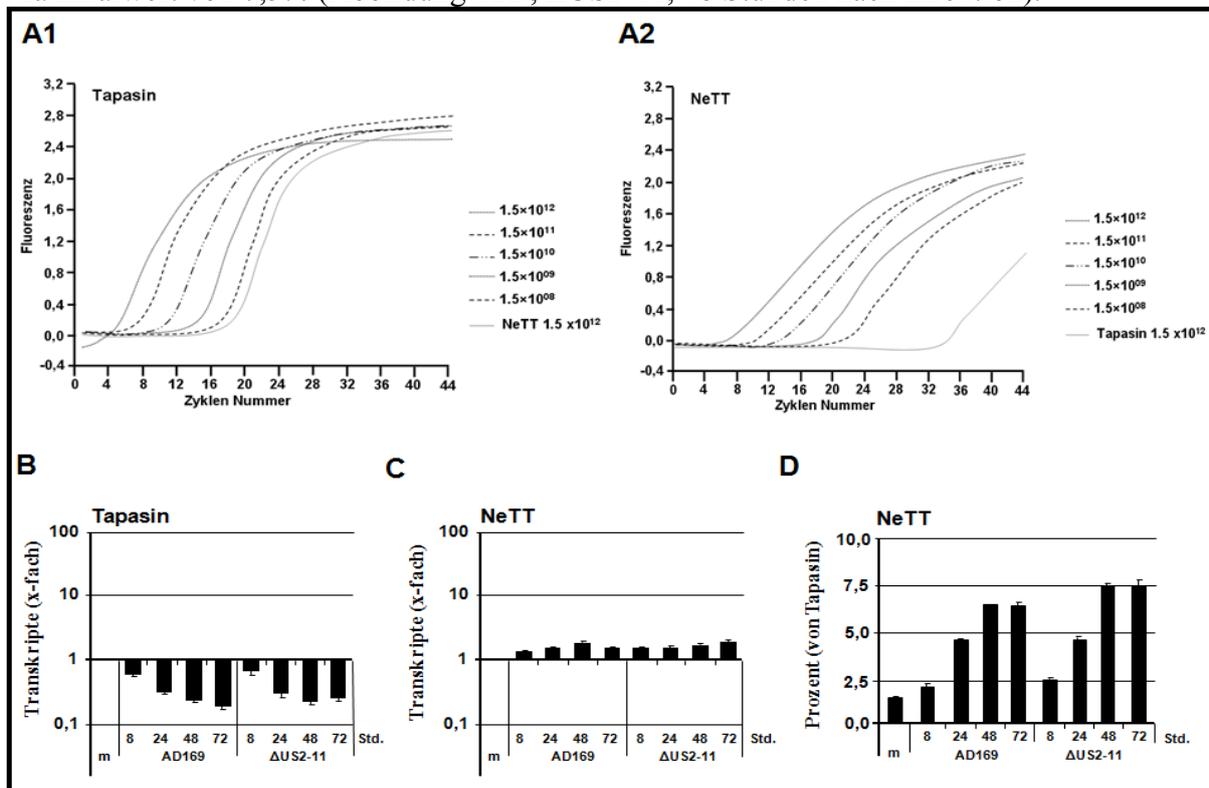


Abbildung 12: Absolute Quantifizierung der NeTT- sowie Tapasintranskriptmengen in infizierten Zellen mittels Transkript-spezifischer Primer. MRC-5 Fibroblasten wurden für eine 72 Stunden Kinetik mit HCMV infiziert (MOI 3). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA extrahiert und anschließend 500 ng RNA mittels qRT-PCR analysiert. (A) Tapasin-defiziente .220 Zellen wurden geerntet und die RNA extrahiert. 500 ng dieser RNA dienten als Hintergrund zur Kontrolle der Spezifität der Tapasin und NeTT Primerpaare. Als Template dienten linearisierte Expressionsvektoren, die cDNA von Tapasin beziehungsweise NeTT kodierten. (A1) PCRs mittels der Tapasinprimer auf eine Tapasinvektor-Verdünnungsreihe. Die Negativkontrolle mit NeTT als Template ergab dieselbe Quantifizierungskurve wie 500 ng RNA aus .220 Zellen. (A2) NeTT-PCR mit einer NeTT-Vektor-Verdünnungsreihe. Als Negativkontrolle diente ein Tapasin-Template, welches dieselbe Quantifizierungskurve wie 500 ng RNA aus .220 Zellen ergab. (B-C) qRT-PCR mittels Tapasin- und NeTT-spezifischer Primer. Die Diagramme zeigen die x-fache Veränderung der spezifischen mRNA im Vergleich zu mock behandelten Zellen. (D) Das Diagramm zeigt prozentual die NeTT-Transkripte der Gesamt-Tapasin-mRNA (bestimmt mit den Primern Tapasin und NeTT, 4.1.6, Oligonukleotide I).

Da die Reduktion von Tapasin augenscheinlich nicht auf die Entstehung von NeTT zurückzuführen war (NeTT ist zwar stabil, nicht aber stark induziert), blieb die Frage nach der Regulation von Tapasin weiter bestehen. Im Umkehrschluss ergab sich die Frage, wie es zu den stabilen NeTT-Transkriptmengen kommt und einhergehend damit, ob diese Regulation eventuell durch einen Mechanismus geschieht, der in anderen Zelllinien als den hier genutzten Fibroblasten bereits aktiv ist. In diesem Fall würde eine per se erhöhte NeTT-Expression (verglichen mit den zuvor untersuchten Fibroblasten) vorliegen, wodurch möglicherweise ein Rückschluss auf den Mechanismus hinter dieser Regulation gegeben wäre.

2.3.3 Fibroblasten zeigen minimal höhere NeTT-Transkriptmengen als andere Zellen

In einem anschließenden Screening (Abbildung 13) von NeTT-Transkripten wurden verschiedene Zelllinien analysiert, darunter primäre sowie Tumor-Zellen, welche teilweise wie gekennzeichnet stimuliert wurden. Dabei wurde das Verhältnis von NeTT zu Tapasin betrachtet, die Quantifizierung von NeTT ist im Folgenden dargestellt. Für Fibroblasten (MRC-5) Zellen ergab sich das bekannte Bild der leichten Induktion durch HCMV. Bei den untersuchten Epithelzellen (HeLa und RPE) ergaben sich im Vergleich zu MRC-5 Zellen per se geringere NeTT-Mengen, gleichzeitig war für RPE-Zellen eine erhöhte Menge nach $\text{IFN}\gamma$ -Behandlung detektiert worden. Unter den weiteren Epithelzellen zeigten 293T Zellen (*Human Embryonic Kidney*, HEK, embryonale Nierenzellen) eine geringere NeTT-Menge, während SKOV-3 (humane Ovarialkarzinom Zellen) und JEG-3 (Zellen eines humanen Chorioepithelioms der Plazenta) ähnliche NeTT-Mengen, wie schon die ersten Epithelzellen (HeLa und/oder RPE) generierten; für die NeTT-Transkript-Mengen in JEG-3 Zellen war es dabei unerheblich, ob diese HCMV-infiziert wurden oder nicht. Auch von Hepatozyten abstammende Tumorzellen (HuH-7, Hepatom-Zellen) und Nabelschnur Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs), letztere sowohl infiziert als auch uninfiziert, zeigten ähnliche Mengen wie Epithelzellen (RPE).

In myeloiden Zellen der Linie K562 (Erythrozytenleukämie-Zelllinie) wurden die geringsten NeTT-Mengen detektiert.

Aus PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) generierte Monozyten (adhärente Zellfraktion der PBMCs) zeigten NeTT-Transkript-Mengen auf der Ebene der Epithelzellen, während in THP-1 Zellen (humane Zelllinie einer Monozytenleukämie) kein NeTT

Ergebnisse

nachweisbar war. Bei den Makrophagen (U937 Zellen) war ein deutlicher Abfall von naiven zu aktivierten Zellen (Abbildung 13, U937 akt.) zu erkennen. In Monozyten oder differenzierten (nach Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) Behandlung) dendritischen Zellen waren NeTT-Mengen auf der Ebene der Epithelzellen detektierbar.

In den lymphoiden Zellen sind aufsteigende NeTT-Mengen von B-Zellen wie Daudi (Humanes Burkitts Lymphom) über LCL- (Lymphoblastoide Zellen) und RPMI-Zellen (lymphoblastoide B-Zellen) bis hin zu immortalisierten T-Zellen (Jurkat) mit Mengen ähnlich denen der Epithelzellen detektiert worden.

Maus NIH 3T3-Fibroblasten und Tapasin-negative .220-B-Lymphozyten dienten als Negativkontrollen des Screenings und zeigten keine NeTT-Transkripte an. NeTT-transduzierte .220-Zellen dienten als Positivkontrolle. Dort lag die Menge bei knapp über 100.000.000 Transkripten pro 1µg RNA (im Verhältnis zu etwa 1.000 Transkripten in normalen Fibroblasten).

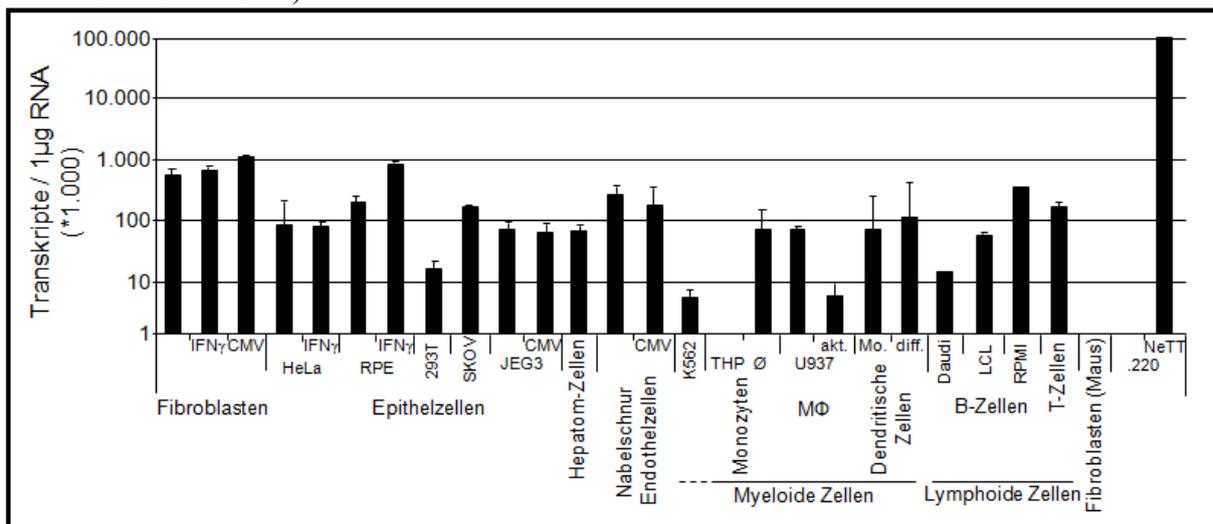


Abbildung 13: NeTT-Transkriptmengen in verschiedenen Zelllinien. Angegebene Zellen wurden für 48 Stunden kultiviert und anschließend lysiert, die RNA wurde extrahiert und 500 ng mit den zuvor beschriebenen NeTT-Primern (2.3.2) mittels qRT-PCR analysiert. Kontrolliert wurde anhand der Quantifizierung von GAPDH. Analysiert wurden humane: Fibroblasten (MRC-5) mit IFN γ und H(CMV) stimuliert/infiziert, Epithelzellen (HeLa und RPE) stimuliert mit IFN γ , weitere Epithelzellen wie 293T, SKOV-3 und JEG3 (infiziert mit H(CMV)), Hepatom-Zellen (HuH7), Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs) infiziert mit H(CMV), myeloide Zellen (Erythrozyten-Linie, K562), weitere myeloide Zellen wie Monozyten aus PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*, Ø) und THP-1 Zellen (THP), U937-Zellen (Makrophagen (MΦ)) stimuliert mit PMA (*phorbol-12-myristate-13-acetate*) sowie weitere Monozyten (Mo.) und daraus differenzierte (diff.) dendritische Zellen, lymphoide Zellen darunter B-Zellen, wie RPMI-, Daudi-, LCL-Zellen, T-Zellen (Jurkat). Als Negativkontrolle dienten Maus-Fibroblasten (NIH 3T3) und humane Tapasin-defiziente .220 Zellen (B-Lymphozyten). Transfiziert mit einem NeTT Expressionssystem ergaben diese eine Positivkontrolle.

Von allen untersuchten Zellen zeigte sich in keiner Linie eine verstärkte Menge an NeTT; die größten Mengen waren dabei in MRC-5 Zellen und RPE-Zellen (Epithelzellen) gefunden worden.

Ergebnisse

Nichtsdestotrotz sind NeTT-Transkripte in allen (außer THP-1) untersuchten Zellen (Zellen verschiedener Gewebe) detektiert worden. NeTT-Transkripte kommen dabei in den bisher untersuchten Zellen in geringen Mengen (zwischen 1-3% der Tapasintranskripte) vor.

Da keine der untersuchten Zelllinien einen Hinweis auf eine etwaige Regulation ergab, sollte der Frage nach den stabilen Transkriptmengen von NeTT bei reduzierten Mengen für Tapasin während der HCMV-Infektion auf einem weiteren Weg nachgegangen werden.

2.3.4 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) können NeTT nicht erklären

Als erstes erfolgte die Untersuchung von Exon 3 und seiner Umgebung, um eventuell genetische Variationen in diversen Zelllinien und Populationen zu finden. Dazu dienten die Informationen des *Genome Browsers* der Universität von Kalifornien (*UCSC Genome Browser* (SNP Nummer 1 und 2 in Abbildung 39 Appendix)). So konnten zwei konservierte SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) gefunden werden, die in den Bereich von Exon 3 fallen und somit das veränderte Spleißverhältnis von Tapasin und NeTT erklären könnten.

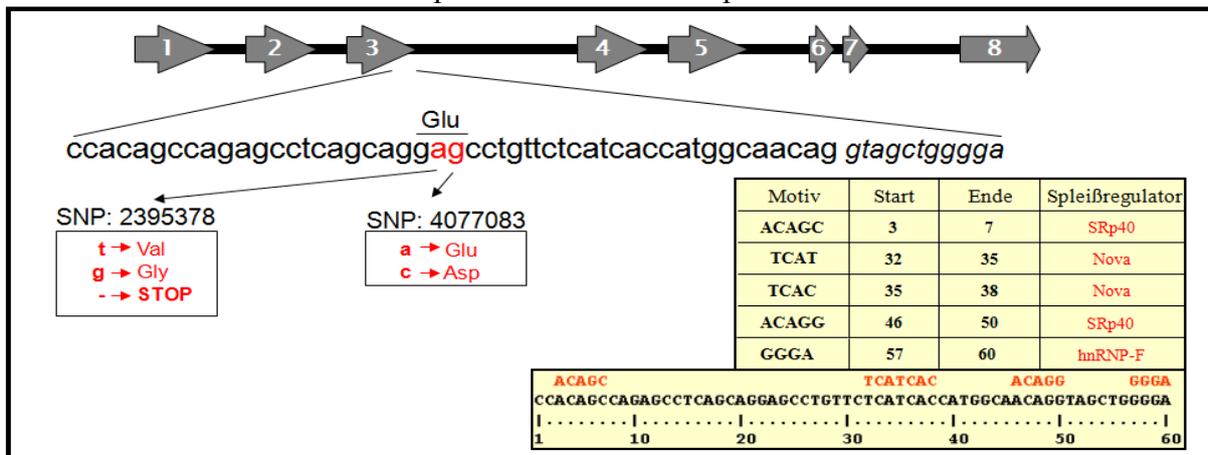


Abbildung 14: Die SNPs 2395378 und 4077083 sowie ihre möglichen Konsequenzen für das Exon 3. Beide SNPs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) sind im selben Codon des Exon 3 lokalisiert. Alle Sequenzen sind genomisch gezeigt, das heißt auf der Transkriptebene sind Thymidine (t) durch Uridine (u) zu ersetzen. Der Übergang von Exon zum Intron (*kursiv*) ist durch einen weiteren Abstand zwischen dem AG des Exons und der Intronsequenz gekennzeichnet. SNP 2395378 ist mit drei verschiedenen Mutationen bekannt, zwei davon führen auf der Translationsebene zu einem Aminosäureaustausch von Glutaminsäure (Glu) zu Valin (Val) bzw. Glycin (Gly), während es auch bekannte Mutationen gibt, die zu einem frühen Stop-Codon führen. Für die RNA-Sequenz ergeben sich Mutationen von: Adenosin (a) zu Thymin (t), Guanin (g) oder zu einer Deletion. SNP 4077083 führt auf der Proteinebene nur zu einem Aminosäureaustausch von Glutaminsäure (Glu) zur Asparaginsäure (Asp), auf der Transkriptebene ergeben sich Austausche von Guanin (g) zu Adenosin (a) oder Cytidin (c). Die Tabelle einer Suchmaschine für spleißregulatorische Proteine (<http://esrsearch.tau.ac.il>) zeigt mögliche Bindestellen, welche durch die SNPs nicht verändert werden.

Beide SNPs (2395378 und 4077083) stehen für verschiedene Mutationen der hier gezeigten Sequenz an der Stelle der Basenpaare 23 und 24 (Abbildung 14). Dadurch kommt es in einem Fall zu einer Deletion und in vier Fällen zu einem Austausch (Substitution). Darunter die

Ergebnisse

Adenosin (a) zu Thymin (t) sowie Guanosin (g) zu Cytidin (c) Transversion und die Adenosin (a) zu Guanosin (g) und Guanosin (g) zu Adenosin (a) Transition. Die Auswertung der Suchmaschine für Bindestellen spleißregulatorischer Proteine (*ESRsearch*, <http://esrsearch.tau.ac.il>) ergab in der unmutierten Sequenz keinen Treffer. Bei der Analyse aller eventuellen Mutationen konnte ebenfalls keine Neuentstehung (einer solchen Bindestelle) gezeigt werden, so dass ein Einfluss der bekannten SNPs auf das Spleißen des Tapasintranskriptes höchst spekulativ wäre. Weshalb im Weiteren nach möglichen regulatorischen Elementen in den Exon 3-umschließenden (intronischen) Sequenzen gesucht wurde.

2.3.5 *G-runs* in direkter Umgebung der 5'Spleißstelle des Exon 3

Um die Umgebung des Exon 3 *in silico* weiter zu untersuchen, wurde erneut die Suchmaschine für potenzielle Bindestellen von spleißregulatorischen Proteinen genutzt. Dabei konnten zwei auffällige Guanosin-Wiederholungen (*G-runs*) *downstream* des Exon 3 gefunden werden (Abbildung 15). Die *upstream* des Exon 3 (also am Ende von Intron 2) gelegenen Sequenzen ergaben keine auffälligen Bindemotive.

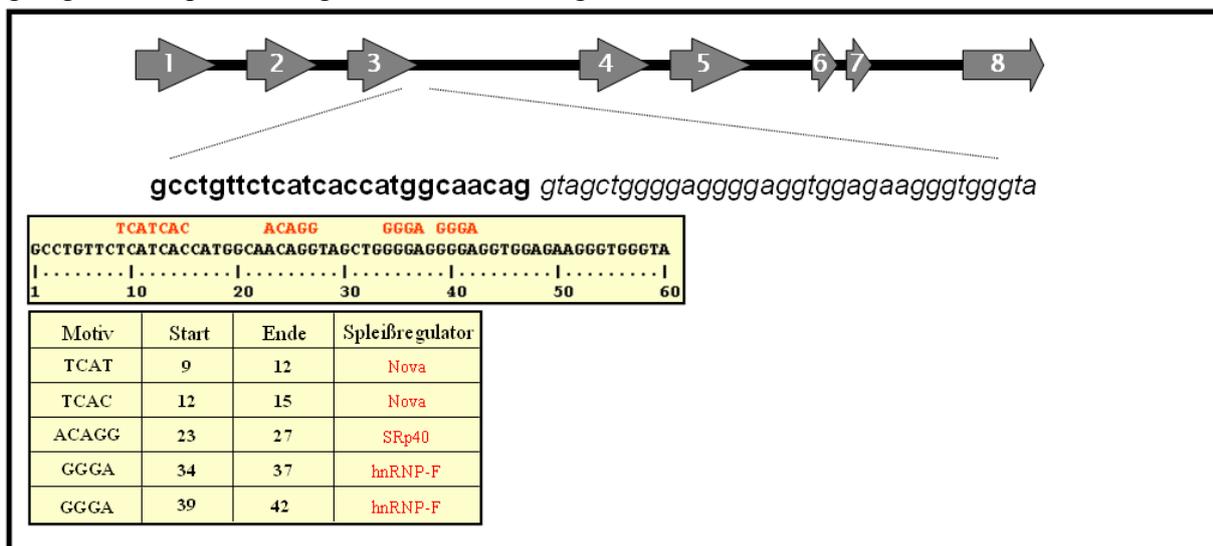


Abbildung 15: Zwei *G-runs* finden sich in direkter Umgebung der 5'Spleißstelle des Exon 3. Der Übergang von Exon 3 (**fett**) in Intron 3 (*kursiv*) ist durch die Lücke in der Nukleinsäuresequenz markiert. Das „AG“ (bzw. hier „ag“) der 5'Spleißstelle sind die letzten beiden Nukleotide des Exons. Die *ESRsearch*-Maschine (nummerierte Sequenz 1-60) gibt *G-runs* als Sequenzen an, die von hnRNP-F Proteinen gebunden werden können (Tabelle) und welche hier in direkter Nähe der Spleißstelle des Exon 3 liegen (<http://esrsearch.tau.ac.il>, Option: *Additional RNA binding sites*). Die Grafik der nummerierten Sequenz wurde von der *ESRsearch*-Maschine übernommen und die Tabelle nach entsprechenden Ergebnissen angefertigt.

Die erwähnten *G-runs* sind als Bindestellen für hnRNP-F und -H Proteine (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H*) bekannt, welche positionsabhängig das Spleißen positiv oder

negativ beeinflussen können (Garneau, Revil *et al.* 2005, Jablonski, Buratti *et al.* 2008, Talukdar, Sen *et al.* 2011). Die eindeutig unterstützende Wirkung von *G-runs*, die innerhalb von Intronsequenzen liegen und in direkter Umgebung von 5'Spleißstellen lokalisiert sind, ist publiziert (Schaub, Lopez *et al.* 2007). Dieser Befund war maßgeblich für die Hypothese, dass die Funktion von hnRNP-F/H durch HCMV reguliert und ipso facto die 5'Spleißstelle in ihrer Stärke während der Infektion reduziert sein könnte. Mit der möglichen Konsequenz einer verminderten Exon-Erkennung, welche die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Exon 3-*Skippings* (Ausschlusses) erhöhen würde. Wird das Exon 3 beim Spleißvorgang nicht in das Tapasintranskript eingebunden, würde so NeTT generiert werden und das prozentual erhöhte Vorkommen in infizierten Zellen wäre auf diese Weise erklärt.

Eine Regulation der hnRNP-F/H Funktion war bereits von verschiedenen Zellen bzw. Tumorzelllinien bekannt (Chou, Rooke *et al.* 1999) und sollte anschließend in einem Minigensystem für Tapasin analysiert werden. Zudem hatte die bekannte Regulation durch hnRNP-F/H zusätzlich den zuvor beschriebenen Screen (2.3.3) begründet, in welchem mit Hilfe der bereits validierten NeTT und Tapasin PCR (Abbildung 12) verschiedene Zellen auf erhöhte NeTT-Konzentrationen untersucht wurden, ohne eine auffällige Zelllinie zu finden.

2.3.6 *G-runs* können die Entstehung von NeTT beeinflussen

Um der Hypothese der Regulation des Spleißens von Tapasin durch *G-run* bindende Proteine direkt nachzugehen, wurde durch die Arbeitsgruppe ein Minigensystem etabliert. Dazu wurde in einen Tapasin Expressionsvektor (Tapasin cDNA) die Sequenz des Exon 3 durch die Sequenz von Intron 2, Exon 3 und je die ersten und letzten 200 Nukleotide von Intron 4 ersetzt (Beutler, Hauka *et al.* 2013). So konnte gewährleistet werden, dass alle möglichen spleißregulatorischen Elemente, die am Spleißen des Exon 3 beteiligt sind, im Minigen vorhanden waren (Majewski and Ott 2002, Sorek and Ast 2003, Wang and Burge 2008).

Ein möglichst natürliches Spleißergebnis ist damit möglich und über die Proteinexpression messbar. Zusätzlich zum wildtypischen Minigen (Abbildung 16, Minigen (wt)) wurde ein Minigen (Abbildung 16, rote Nukleotide in der Minigensequenz (mut)) geschaffen, in dem durch zwei Punktmutationen die *G-runs* entfernt wurden. So sollte die putative hnRNP-F/H Protein-Bindung verhindert werden und im Vergleich beider Minigene der Einfluss der *G-runs* im Bereich der 5'Spleißstelle des Exon 3 analysiert werden. Zur Kontrolle wurden Zellen nicht nur mit diesen beiden Minigenen, sondern auch mit Tapasin (Tpn), NeTT und

Ergebnisse

EGFP (Kontrolle) transfiziert. Als Beladungskontrolle der jeweiligen Ansätze wurde Calreticulin im Westernblot detektiert.

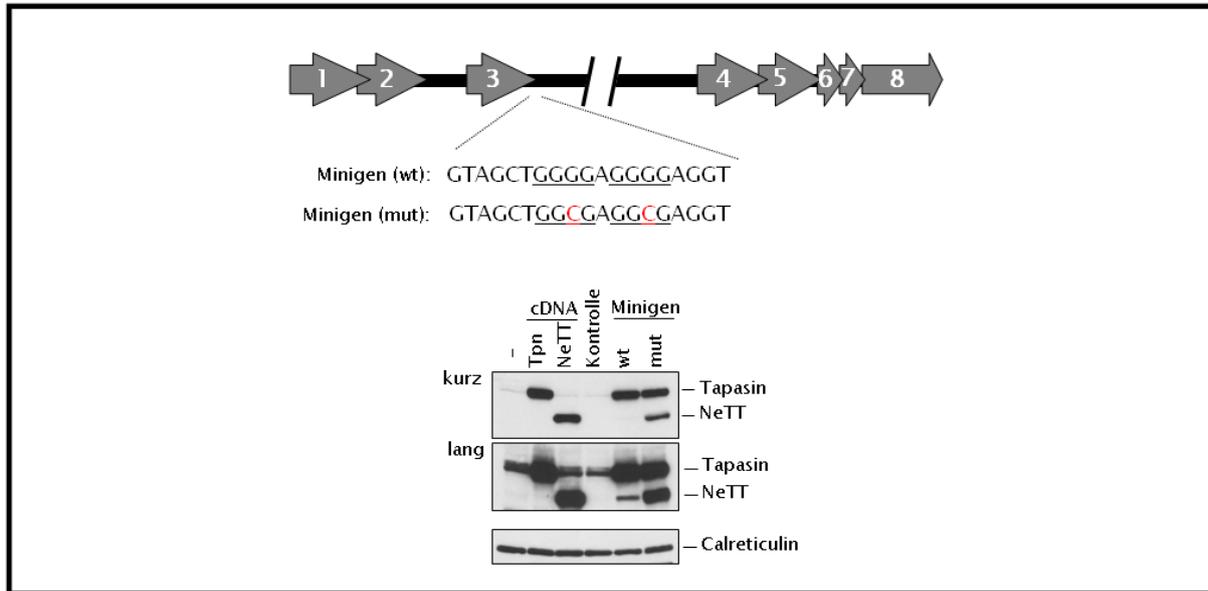


Abbildung 16: Expressionsmuster der Tapasin-Minigene. Die gezeigten Minigene mit wildtypischer (wt) und mutierter (mut) *G-run*-Konsensussequenz wurden in der Arbeitsgruppe, durch Insertion des Intron 2, Exon 3 mit den folgenden 200 intronischen Nukleotiden sowie den letzten 200 Nukleotiden des Intron 4, in die cDNA-Sequenz des Tapasings generiert (Beutler, Hauka *et al.* 2013). HeLa Zellen wurde mit den Minigenen der wildtypischen Sequenz (wt), einer mutierten Sequenz (mut), in der die *G-runs* unterbrochen wurden, den Kontrollen für Tapasin (Tpn), NeTT (NeTT), eGFP (Kontrolle) und nicht (-) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteine im Westernblot analysiert. Ein Calreticulin-reblot diente zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren in der Gelektrophorese.

In nicht- (-) oder kontrolltransfizierten (Kontrolle) Zellen ergab sich eine geringe Detektion von endogenem Tapasin, während NeTT-Proteine nicht nachweisbar waren. Die Tapasin- und NeTT-Überexpression zeigte jeweils die spezifische Bande beider Proteine an. Das wildtypische Minigen (wt) exprimierte ebenso stark Tapasin wie die Tapasin-transfizierten Zellen (kurze Exposition). In der längeren Belichtung (Abbildung 16, lang) war auch die NeTT-Expression nachweisbar. Da es sich bei diesem Minigen um die Überexpression der endogenen Transkription handelte, spiegelte dieses das Verhältnis von Tapasin/NeTT auf Proteinebene wider (welches endogen bei etwa 1,5% auf der Transkriptebene lag (2.3.2)). Auf Grund der nur geringen, quantitativen Aussagekraft von Westernblots ist auf der Proteinebene (Abbildung 16) lediglich von einem starken Unterschied in der Expression von NeTT zu Tapasin zu sprechen. Die Expression des mutierten Minigens (mut) zeigte somit ein deutlich verändertes Verhältnis von Tapasin/NeTT, wobei zusätzlich die geringe Halbwertszeit (etwa 3 Stunden) des NeTT-Proteins in Betracht gezogen werden muss (Beutler, Hauka *et al.* 2013). Die Mutation der beiden *G-runs* führte zu einer erhöhten Menge an NeTT, kann dessen Entstehung also maßgeblich positiv regulieren. Im Gegensatz scheint der Einfluss auf die Tapasinproteinmenge marginal.

2.3.7 Transkriptmengen von hnRNP-F und -H in infizierten Fibroblasten

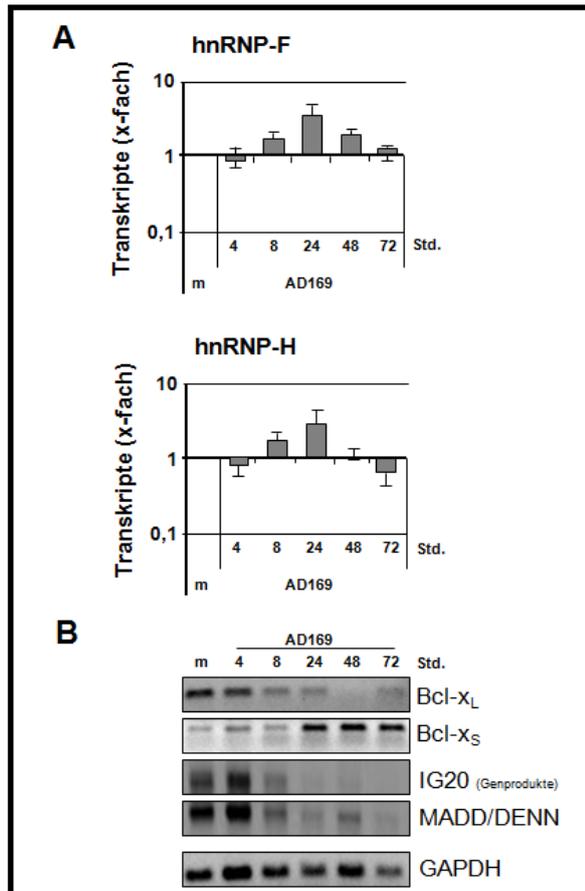


Abbildung 17: Erhöhte hnRNP-F und hnRNP-H Transkriptmengen in infizierten Fibroblasten. MRC-5 Fibroblasten wurden HCMV (AD169, MOI 5) und mock (m) infiziert und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert, die RNA extrahiert und analysiert. (A) 500 ng RNA wurden mittels spezifischer Primer für hnRNP-F und -H via qRT-PCR analysiert. (B) 150 ng RNA sind per sqRT-PCR und mit spezifischen Primern für Bcl-x_{L/S}, IG20, MADD/DENN und GAPDH analysiert worden.

Wie bereits in den vorherigen Experimenten gezeigt wurde, scheint das Spleißen in infizierten Zellen nicht für die stark reduzierten Tapasinmengen verantwortlich und wie erwähnt (2.3.6) der Effekt der *G-runs* auf Tapasin nur minimal. Dennoch blieb die Tatsache, dass NeTT während der Infektion stabile Transkriptmengen aufwies und über *G-runs* reguliert wurde. *G-runs*, spleißregulatorische Proteine betreffend, werden aus der Familie der hnRNP Proteine ausschließlich von hnRNP-F/H Proteinen gebunden (Garneau, Revil *et al.* 2005, Jablonski, Buratti *et al.* 2008, Talukdar, Sen *et al.* 2011). Durch die Mutationen der *G-runs* und dem daraus resultierenden Effekt auf das Tapasintranskript lag die Vermutung nahe, dass hnRNP-F/H Proteine diese Regulation während der HCMV-Infektion vermitteln könnten. Sollte HCMV die Synthese von NeTT auf diesem Weg forcieren, könnte möglicherweise während der Infektion sowohl die hnRNP-F/H

Transkriptmengen, als auch etwaige *downstream*-Effekte differenziell zu uninfizierten Zellen sein. Zur Untersuchung der hnRNP-F/H Transkriptmengen wurden Primer entworfen, welche die meisten annotierten Spleißvarianten abdecken. Sollten die Proteine (hnRNP-F/H), zusammen oder einzeln, die Transkriptmengen von NeTT negativ beeinflussen, müssten folglich deren Transkriptmengen (ähnlich der von Tapasin) während der Infektion negativ reguliert sein um eine erhöhte NeTT-Menge (während der Infektion) erklären zu können. Interessanterweise ergaben sich für beide Transkripte entgegen dieser Annahme erhöhte Raten während der HCMV-Infektion in Fibroblasten. Besonders deutlich war dieses für hnRNP-F zum Zeitpunkt von 24 Stunden nach der Infektion zu erkennen (Abbildung 17A).

Ergebnisse

Während der frühen Infektion stieg die Transkriptmenge langsam bis zu diesem Maximum an, um abschließend wieder leicht zu sinken. Für hnRNP-H ergab sich eine nahezu identische Kinetik, wenngleich die Induktion zu den jeweils untersuchten Zeitpunkten geringer war. Eine erhöhte Transkriptmenge widerspricht dabei zunächst der Hypothese der hnRNP-F/H Regulation von NeTT, lässt sich jedoch mit einer mutmaßlichen posttranskriptionellen Regulation von hnRNP-F/H erklären. Um dies zu überprüfen, wurden (Abbildung 17B) bekannte Effekte von hnRNP-F/H auf die Transkripte von Bcl-x (Garneau, Revil *et al.* 2005), IG20 und MADD/DENN analysiert (Lefave, Squatrito *et al.* 2011).

Sowohl für hnRNP-F als auch -H ist bekannt, dass es bei Überexpression zum Beispiel „endogen“ durch eine dysregulierte Expression in Tumoren (aber auch durch transiente Überexpression *in vitro*) zu einem veränderten Spleißverhalten der mRNA des apoptoseassoziierten Proteins Bcl-x kommt (Garneau, Revil *et al.* 2005). So ist in normalen Gewebezellen die lange Variante des Bcl-x Proteins transkribiert, Bcl-x_L. In Tumorzellen dagegen ist die kurze Variante (Bcl-x_S) verstärkt transkribiert. Die Genesis des kürzeren Transkriptes wird exklusiv durch eine erhöhte Expression von hnRNP-F/H Proteinen mediiert (Garneau, Revil *et al.* 2005). Zeitversetzt mit den erhöhten Transkriptmengen von hnRNP-F/H, stieg im Verlauf der HCMV-Infektion synchron die Menge an Bcl-x_S-Transkripten stark an (Abbildung 17B). Damit zeigte sich in infizierten Zellen derselbe Phänotyp wie in nachweislich hnRNP-F/H überexprimierenden Zellen. Dieser Befund schließt eine posttranskriptionelle Regulation dieser Proteine in infizierten Zellen weitestgehend aus.

In hnRNP-H überexprimierenden Tumorzellen wurde gezeigt, dass das IG20 Genprodukt MADD/DENN das favorisierte Spleißprodukt ist (Lefave, Squatrito *et al.* 2011). Auch dieser Phänotyp konnte in einer HCMV Infektionskinetik (Abbildung 17B) beobachtet werden.

Zusammenfassend sprechen die Analysen der hnRNP-F/H-Transkriptmengen sowie die Funktionsanalysen beider Proteine dafür, dass diese während der Infektion stärker exprimiert werden und aktiv sind und daher das relativ erhöhte Entstehen von NeTT nicht erklären können. Es bleibt schließlich die Möglichkeit der verstärkten NeTT-Synthese infolge einer verminderten hnRNP-F/H Bindung an *G-runs* durch bisher noch unbekannte und zu untersuchende Mechanismen.

2.4 Tapasin – Sein Promotor und dessen Regulation

Nachdem alle bisher untersuchten möglichen Mechanismen (Abbildung 5) der reduzierten Transkriptmenge von Tapasin in HCMV-infizierten Zellen keine plausible Begründung ergaben, blieb der Promotor als weiterer möglicher Angriffspunkt von HCMV. Um diese Möglichkeit zu verifizieren, wurde sich der Methodik der RNA-Markierung bedient, um die Syntheserate von Tapasin-mRNA in infizierten Zellen zu analysieren (Dolken, Ruzsics *et al.* 2008).

2.4.1 Die GAPDH-mRNA wird während der HCMV-Infektion konstant transkribiert

Wie bereits in 2.2.5 gezeigt, ist die Halbwertszeit der Tapasin-mRNA mit mehr als 24 Stunden sehr lang und erschwert eine zeitlich engere Analyse der Regulation in infizierten Zellen. Den Einblick in die Syntheserate der Tapasin-mRNA ermöglichte die Methodik der RNA-Markierung. Dabei wird die zelluläre RNA (mittels Zugabe von 4-Thiouridin zu vitalen Zellen) einer biosynthetischen Markierung (60-minütig) unterzogen, anschließend aufgereinigt und biotinyliert. Die biotinylierte RNA gewährleistete durch die Präzipitation mittels Streptavidin-Metallkugeln eine spezifische Trennung der neusynthetisierten von der Gesamt-RNA. Die so isolierte RNA ist somit ausschließlich jene, welche innerhalb der gegebenen 60 Minuten markiert wurde und die jeweilige Syntheserate in diesem Zeitrahmen widerspiegelt.

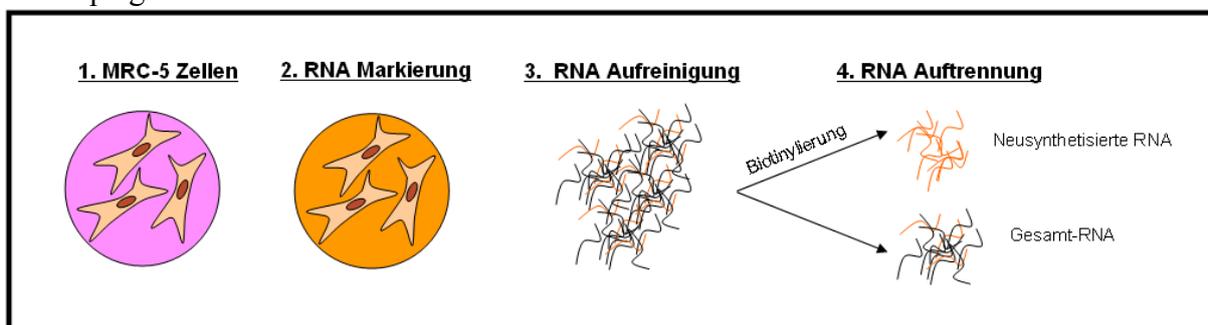


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Markierung neusynthetisierter RNA. Für 60 Minuten wurde 4-Thiouridin (finale Konzentration 200 μ M) ins Medium gegeben, um in die neusynthetisierte RNA eingebaut zu werden. Dann wurden die Zellen lysiert, die Gesamt-RNA aufgereinigt, biotinyliert und anschließend die biotinylierte RNA isoliert.

Zur Validierung der Methode für infizierte Zellen wurde die mRNA-Syntheserate von GAPDH analysiert und dabei gegen die Syntheserate der 18SrRNA abgeglichen

Ergebnisse

(Abbildung 19). Bei einer MOI von 5 war die Neusyntheserate von GAPDH in infizierten und auch IFN γ /TNF α -stimulierten Zellen, im Abgleich mit der 18SrRNA, konstant. Zur Vergleichbarkeit der Daten mit der Auswertung der Gesamt-RNA ist diese in Abbildung 19 ebenfalls aufgezeigt.

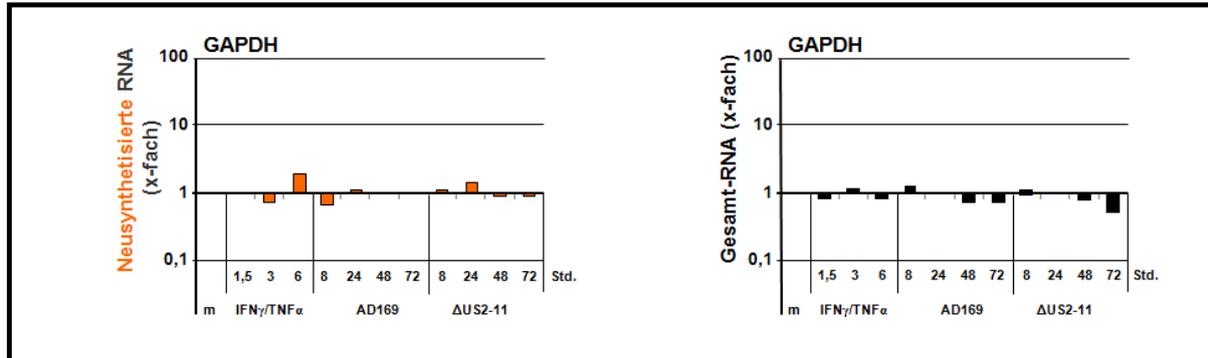


Abbildung 19: Neusynthetisierte- und Gesamt-mRNA von GAPDH in infizierten und stimulierten MRC-5 Fibroblasten. MRC-5 Fibroblasten wurden HCMV-infiziert (Laborstamm AD169 und Deletionsmutante Δ US2-11), IFN γ /TNF α (500 U/ml und 25 ng/ml) oder mock behandelt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurde, um die neusynthetisierte RNA zu markieren, dem Medium 4-Thiouridin (finale Konzentration 200 μ M) zugegeben. 60 Minuten später wurden die Zellen lysiert. Wie zuvor beschrieben wurde die neusynthetisierte und Gesamt-RNA zu den angegebenen Zeitpunkten gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde mittels qPCR analysiert und gegen die Werte von 18SrRNA verrechnet. Transkriptmengen sind in x-fach gegenüber mock dargestellt. Gezeigt ist repräsentativ für mindestens drei biologische Replikate, ein typisches Ergebnis der qPCR, jeweils abgeglichen gegen RNA der 18SrRNA (Halenius, Hauka *et al.* 2011).

2.4.2 Reduzierte Neu-Syntheserate des Tapasintranskriptes in HCMV-infizierten Zellen

Zur Analyse der Transkription von Tapasin in HCMV-infizierten Zellen wurde das Experiment im Vergleich zur Analyse der Gesamt-RNA (Abbildung 4) verändert. So wurde auf Grund der früheren Daten, bezüglich der leicht erhöhten Tapasin Gesamt-mRNA Menge nach 8 Stunden Infektion (Abbildung 4), die Infektionskinetik in den frühen Stunden detaillierter aufgeschlüsselt. MRC-5 Zellen wurden für 1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden infiziert, die Gesamt-RNA aufgereinigt, die markierte RNA separiert und diese analysiert. Gezeigt sind exemplarische Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen PCRs, welche jeweils die RNA aus zwei Experimenten (unterschiedlicher HCMV-Infektionen) analysierten. In den frühen Zeiten der Infektion stieg die Syntheserate der Tapasin-mRNA (Abbildung 20, Tapasin) ab Stunde 1 nach Infektion bis 4 Stunden nach Infektion leicht an, bevor sie nach 8 Stunden Infektion auf das Ausgangsniveau (mock) zurückging. Im weiteren Verlauf sank die Rate immer weiter ab und erreichte ein Minimum 72 Stunden nach Infektion.

Die TAP1-Transkriptionsrate (Abbildung 20, TAP1) erreichte nach einer frühen, minimalen Reduktion ein Maximum von 10-facher Induktion 4 Stunden nach Infektion. Nach 8 Stunden

Ergebnisse

Infektion war die Induktion leicht und nach 24 Stunden deutlich reduziert. Die beginnende Reduktion nach 8 Stunden ist durch unabhängige Experimente reproduziert worden und im Vergleich mit der Messung 4 Stunden nach Infektion signifikant. 48 und 72 Stunden nach Infektion wurde die Syntheserate in mock-behandelten Zellen erreicht. Auch die Transkriptionsrate von TAP2 (Abbildung 20, TAP2) war 4 und 8 Stunden nach Infektion leicht induziert, ging aber bereits nach 24 Stunden nahezu auf die Ausgangsrate (mock) zurück und wurde in der fortlaufenden Infektion nicht weiter reguliert. Der Unterschied der Induktion nach 8 Stunden ist zwischen TAP1 und TAP2, in unabhängigen Experimenten, als hoch signifikant (T-test; 0,005735) bestimmt worden.

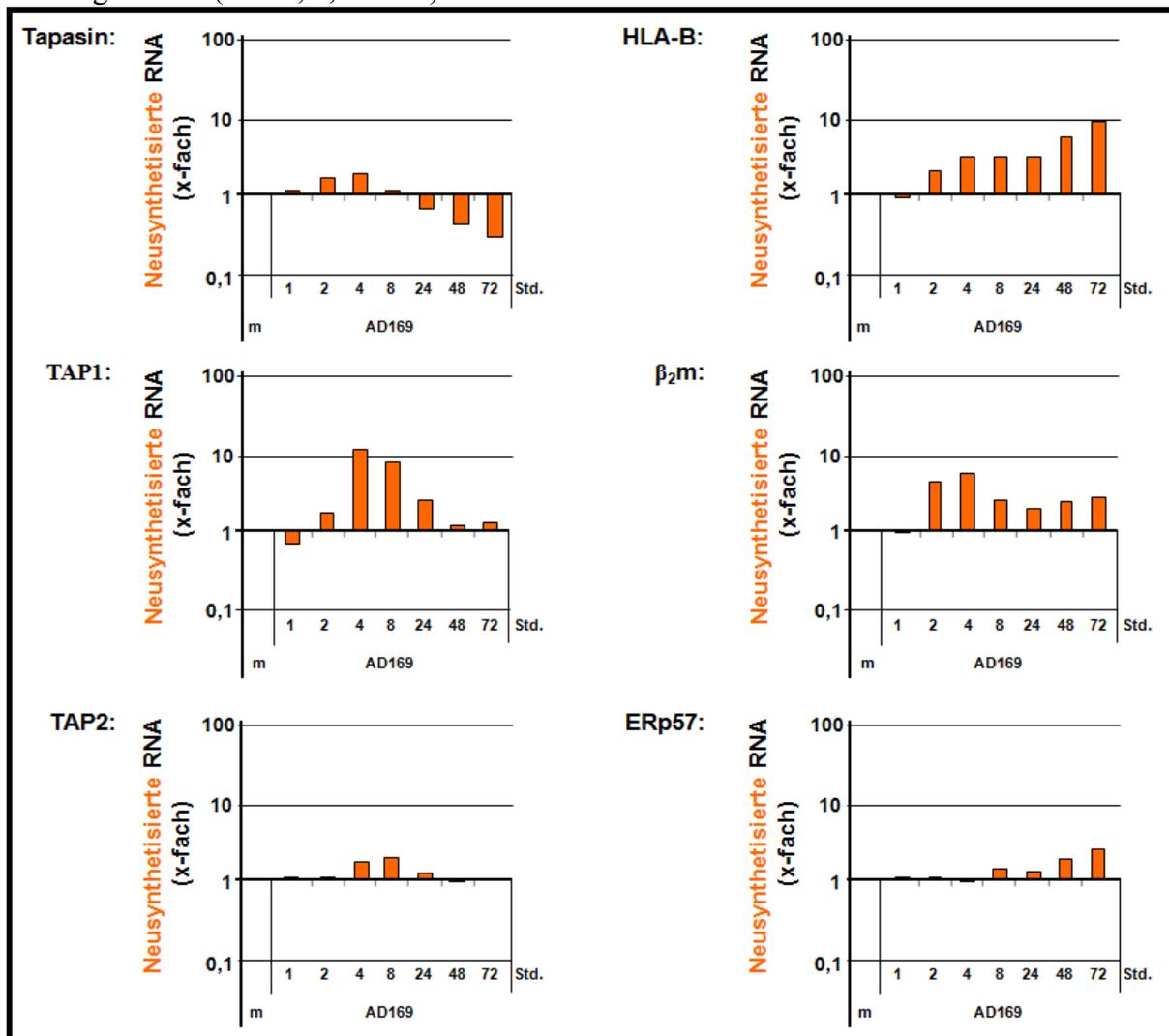


Abbildung 20: mRNA Neusyntheserate von Tapasin, TAP1, TAP2, HLA-B, β_2m und ERp57 in infizierten Fibroblasten. MRC-5 Fibroblasten wurden für 1, 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden infiziert und die neusynthetisierte RNA, wie unter 2.4.1 beschrieben, analysiert. Spezifische Primer für Tapasin, TAP1, TAP2, HLA-B, β_2m und ERp57 wurde genutzt, um die gezeigten Syntheseraten zu ermitteln. Transkriptmengen sind in x-fach gegenüber mock dargestellt. Gezeigt ist repräsentativ für mindestens drei biologische Replikate, ein typisches Ergebnis der qPCR, jeweils abgeglichen gegen RNA der 18SrRNA (Halenius, Hauka *et al.* 2011).

Die Transkriptionsrate des HLA-B Allels (MHC Klasse I HC, *heavy chain*) wurde zwischen 1 und 4 Stunden nach Infektion zum ersten Mal um bis zu 5-fach induziert und stieg 48 und 72

Ergebnisse

Stunden nach Infektion auf sein Maximum von 10-fach induzierter Transkription an. Zusammenfassend war die anfängliche Induktion der Tapasintranskription in den ersten Stunden (bis zu 8 Stunden) der HCMV-Infektion ebenfalls für die untersuchten PLC-Proteine TAP1 und TAP2 gegeben. TAP1 zeigte dabei eine deutlich stärkere Induktion der Transkriptionsrate. Bereits hier, in der frühen Infektion, bestand eine unterschiedliche Regulation der Tapasin- und TAP2- *versus* der TAP1-Transkription. Im weiteren Verlauf der Infektion sank die Transkriptionsrate von Tapasin kontinuierlich bis stark unterhalb der mock-Transkriptionsrate. Ab da unterschied sich Tapasin auch zu TAP2, welches gleich schwach induziert, aber nicht gleich stark reduziert war (Abbildung 20, Vergleich Tapasin und TAP2). Weitere Kontrollen waren ERp57, welches im Gesamtverlauf leicht induziert war, und β_2m mit stetiger Induktion. Im Rahmen der Analyse der Promotoraktivitäten der PLC-Komponenten zeigte sich Tapasin in der HCMV-Infektion somit als negativ und selektiv reguliert.

2.4.3 Der Einfluss der Infektionsdosis (MOI) auf die Regulation der Transkription während der frühen und späten HCMV-Infektion

Um einen möglichen Einfluss der Infektionsdosen in den unterschiedlichen Experimenten zu untersuchen, wurden unterschiedliche Dosen miteinander verglichen (Abbildung 21). Für die neusynthetisierte Tapasin-mRNA ergab sich zu der hier untersuchten frühen Infektionszeit (6 Std. n. I.) eine mit der Infektionsdosis zunehmende Induktion der Syntheserate, die bei einer MOI von 10 (höchste untersuchte Infektionsdosis) ein Maximum erreichte. Dieser Effekt war auf der Ebene der Gesamt-RNA deutlicher erkennbar, auch hier wurde die maximale Transkriptmenge bei einer MOI von 10 erreicht. TAP1 und TAP2 zeigten eine Induktion in gleichbleibender Stärke, unabhängig von der Infektionsdosis (Abbildung 21, Neusynthetisierte RNA, TAP1, TAP2). Nur für TAP2 ergab sich bei der Analyse der Gesamt-RNA mit steigender Infektionsdosis eine ähnliche Erhöhung der Transkriptmengen, wie bereits für Tapasin beschrieben (Abbildung 21, Gesamt-RNA, TAP2 und Tapasin). CEACAM1 wurde auf Grund bekannter Daten (siehe Appendix Abbildung 53) als Kontrolle für dieses Experiment ausgewählt und war zu frühen Infektionszeiten ebenfalls von der Dosis unabhängig induziert, sowohl für die neusynthetisierte als auch die Gesamt-RNA. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der hier analysierten frühen Infektion keine direkte

Ergebnisse

Korrelation zwischen der Infektionsdosis und der Transkriptionsrate (Neusynthetisierte RNA) bestand.

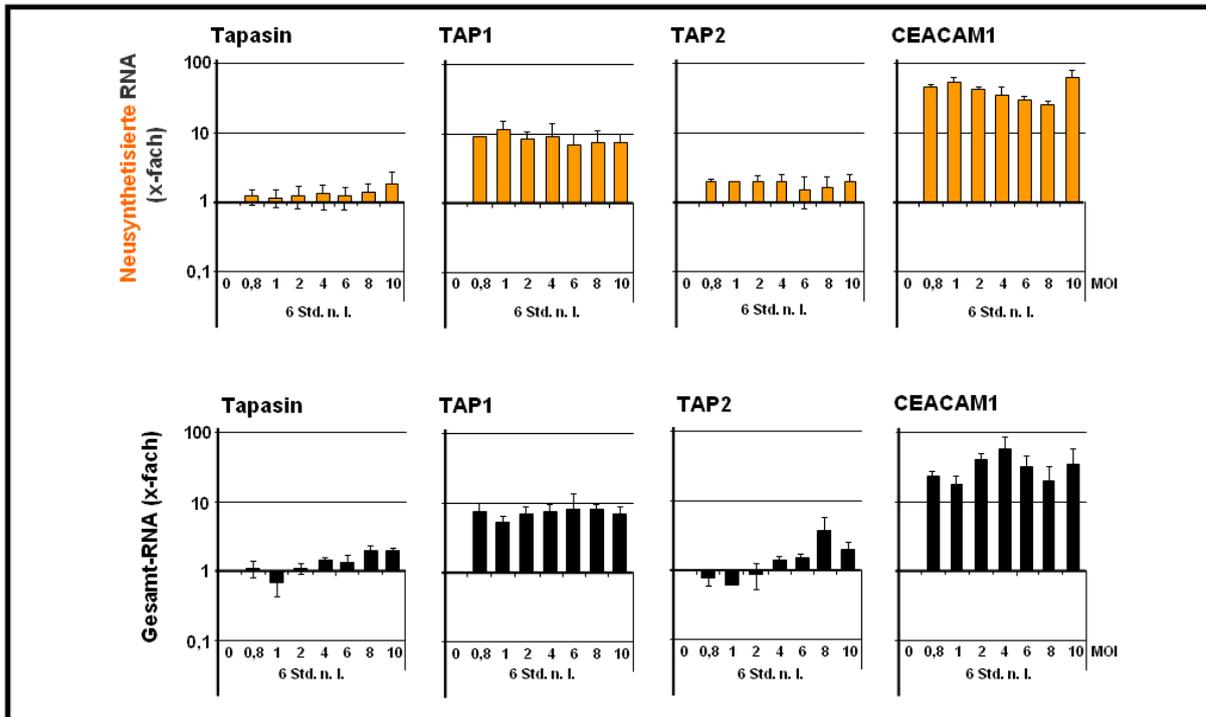


Abbildung 21: mRNA Neusyntheserate von Tapasin, TAP1, TAP2 und CEACAM1 bei verschiedenen Infektionsdosen. MRC-5 Fibroblasten wurden mit verschiedenen MOI (0,8 bis 10 und 0 als mock) infiziert und nach 6 Stunden Infektion lysiert und die RNA gewonnen. Die neusynthetisierte RNA (und Gesamt-RNA) wurde wie unter 2.4.1 analysiert. Dazu dienten spezifische Primer für Tapasin, TAP1, TAP2 und CEACAM1, abgeglichen wurde gegen GAPDH.

24 Stunden nach Infektion ergab sich ein leicht verändertes Bild, welches in Abbildung 22 dargestellt ist. Im Fall von Tapasin war ein marginaler Unterschied im Bereich niedriger Infektionsdosen (Abbildung 22, Neusynthetisierte RNA, Tapasin, MOI 0,1 bis 0,4) zu erkennen. Im weiteren Verlauf waren mit steigenden Infektionsdosen keine signifikanten Änderungen detektierbar. Auch auf der Ebene der Gesamt-RNA ergaben sich nur in den niedrigen Bereichen Unterschiede (Abbildung 22, Gesamt-RNA, Tapasin, MOI 0,1 bis 1). Die TAP1 Syntheserate war 24 Stunden nach Infektion dagegen stark Dosis abhängig und sank von einer starken Induktion (MOI 0,1) bis zur mock-Syntheserate bei einer MOI von 10 (Abbildung 22, Neusynthetisierte RNA, TAP1). Diese Tendenz zeigte sich, mit einer Ausnahme bei einer MOI von 10, auch auf der Ebene der Gesamt-RNA, so dass das Minimum bei einer MOI von 8 lag. Die Neusynthese von TAP2 war dagegen nicht von der Infektionsdosis abhängig (Abbildung 22). Für die Gesamt-RNA ergab sich, wie auch für TAP1 beobachtet, eine sinkende RNA-Menge, die bei einer MOI von 10 nur noch minimal oberhalb der Ausgangsmenge (mock) lag.

Ergebnisse

Auch CEACAM1 war 24 Stunden nach Infektion, bei den MOI von 2 bis 8 in der Neusynthese, leicht von der Infektionsdosis abhängig (nicht gezeigt). Für die Gesamt-RNA zeichnete sich diese Tendenz ebenfalls ab (nicht gezeigt).

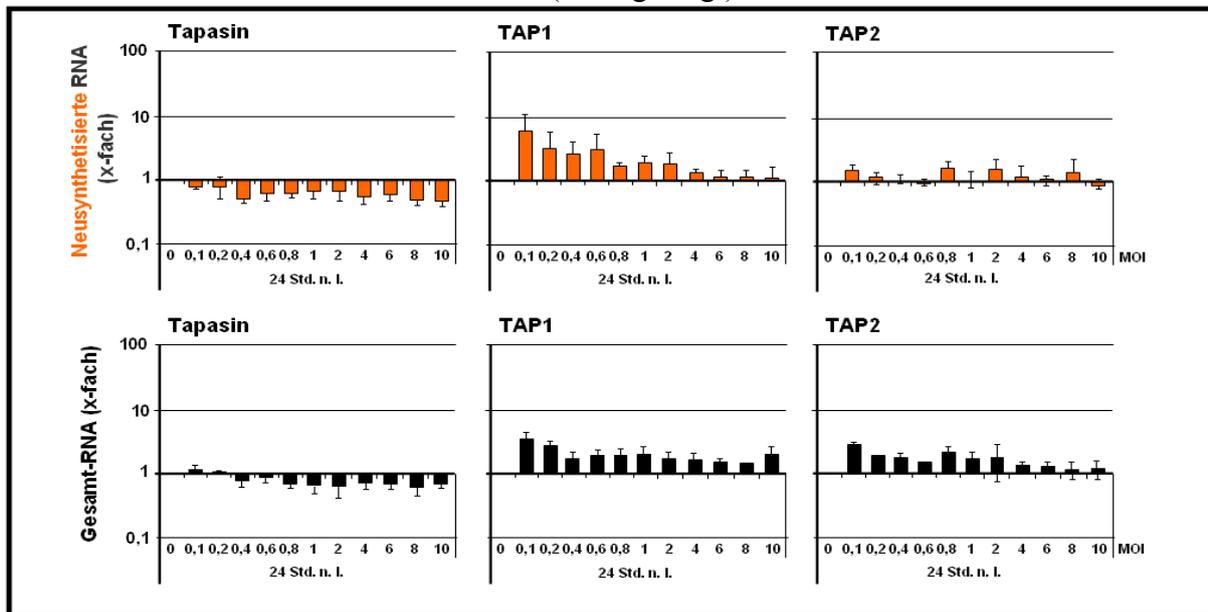


Abbildung 22: mRNA Neusyntheserate von Tapasin, TAP1 und TAP2 bei verschiedenen Infektionsdosen. MRC-5 Fibroblasten wurden mit verschiedenen MOI (0,1 bis 10 und 0 als mock) infiziert und nach 24 Stunden Infektion lysiert sowie anschließend die RNA gewonnen. Die neusynthetisierte RNA (und Gesamt-RNA) wurde wie unter 2.4.1 analysiert. Dazu dienten spezifische Primer für Tapasin, TAP1 und TAP2, abgeglichen wurde gegen GAPDH.

Im Vergleich der Abhängigkeiten von Tapasin, TAP1 und TAP2 zeigte sich zusammengefasst (für 24 Std. n. I.), dass für Infektionsdosen ab MOI 1 (Gesamt-RNA) und MOI 0,4 (Neusynthetisierte RNA) die weitere Regulation von Tapasin verhältnismäßig gering war, während bei einer mittleren Dosis von MOI 2 bis 4 die Regulation etwa für TAP2 am stärksten war (Gesamt-RNA). Diese relative Stabilität des Effektes auf Tapasin, zusammen mit den stärkeren Effekten auf TAP1 und/oder TAP2 (auf der Ebene der neusynthetisierten RNA und/oder der Gesamt-RNA (Abbildung 22, Neusynthetisierte RNA und Gesamt-RNA)), kann (etwa im Vergleich zu TAP1) zu einer schwächeren Ausprägung des Tapasinphänotyps bei hohen Infektionsdosen führen. Dieses Ergebnis deckt sich abschließend mit leichten Schwankungen zwischen den verschiedenen Experimenten (schwankende Infektionsdosis).

Interessant war in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Beobachtung aus diesen sowie vorherigen Experimenten, dass die Syntheserate der GAPDH-mRNA (abgeglichen gegen 18SrRNA) leicht von der Infektionsdosis abhängig war und mit steigender MOI sank. Da hier gegen GAPDH abgeglichen wurde, ist dieses schon verrechnet und korrigiert die Syntheseraten aller Transkripte (mit steigender MOI) zusätzlich nach oben. Der Abgleich gegen GAPDH kann damit den zuvor beschriebenen Effekt (der schwächeren Ausprägung des Tapasinphänotypes bei höheren MOI) weiter verstärken.

2.4.4 Differenzielle Regulation der Transkription von Tapasin und seiner Nachbargene während der HCMV-Infektion

Das Tapasingen liegt auf Chromosom 6 auf dem kurzen (p) Arm 21.3 und ist im Negativ-Strang der DNA kodiert. Um dieses besser zu veranschaulichen, ist das skizzierte Stück von Chromosom 6 (Abbildung 23) „von rechts nach links“ kodierend dargestellt.

Da sich die Regulation von Tapasin im Vergleich zu den weiteren PLC-Genen während der HCMV-Infektion unterschied, stellte sich die Frage, ob seine Nachbargene Daxx, Rgl2 und Rps18 in gleicher Weise reguliert werden. Mit diesen und weiteren Genen liegt Tapasin im erweiterten MHC II Locus, fern des MHC I Locus (Horton, Wilming *et al.* 2004). Tapasin ist dabei von Gen-Loci umgeben, die für die HCMV-Infektion eine wichtige Rolle spielen könnten.

Upstream (oberhalb) von Tapasin ist Daxx (*death-domain associated protein*) kodiert, welches diverse Funktionen im Nukleus und dem Zytoplasma übernimmt. So interagiert es mit Histonen, dem Tumorsuppressor p53 (Protein 53) und dessen Regulator, der E3-Ligase (*E3 ubiquitin-protein ligase*) Mdm2 (*mouse double minute 2 homolog*), und besitzt ein SUMOylierungs-Signal (*Small Ubiquitin-related MOdifier Signal*). Eine weitere Funktion, welche von HCMV auf Proteinebene reguliert ist, ist die durch die Bindung des IE1-Protein induzierte Wirkung als negativer Transkriptionsfaktor für HCMV (Cantrell and Bresnahan 2005, Hwang and Kalejta 2007, Preston and Nicholl 2006, Saffert and Kalejta 2006, Woodhall, Groves *et al.* 2006).

Downstream (unterhalb) von Tapasin liegt Rgl2 (*ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 2*), welches die Guanosin-Bindung der sogenannten kleinen GTPasen stimuliert. Über eine Interaktion mit HCMV liegen für dieses Protein bisher keine Publikationen vor.

Weiter *downstream* liegt in inverser Orientierung Rps18 (*ribosomal protein S18*) kodiert. Dieses ist Teil der 40S Ribosomenuntereinheit und damit auf Grund seiner konstitutiven Funktion bei der Translation als Haushaltsgen anzusehen. Daher war es nicht unerwartet, dass die Rps18-Transkription (Abbildung 23, Rps18, Neusynthetisierte RNA) während der Infektion mit HCMV (sowohl AD169 als auch Δ US2-11) und auch durch die Kontrollstimulation mit IFN γ und TNF α nur marginal reguliert war. Zu späten Infektionszeitpunkten konnte eine leicht erhöhte Transkription festgestellt werden. Dies spiegelte sich ebenfalls bei der Gesamt-RNA wider, auch dort war keine signifikante Änderung der Transkriptmengen nachweisbar.

Ergebnisse

Neusynthetisierte Rgl2-Transkripte (Abbildung 23, Rgl2, Neusynthetisierte RNA) waren durch $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ deutlich induziert, diese Induktion erreicht ein Maximum nach 3 Stunden Stimulation. Für beide Infektionen (AD169 und $\Delta\text{US2-11}$) ergab sich ein stetiger Anstieg der Aktivität, der jeweils nach 72 Stunden ein Maximum erreichte. Auch hier ließ sich diese Regulation mit abgeschwächter Intensität auf Ebene der Gesamt-RNA nachweisen. Die Synthese von Daxx-mRNA (Abbildung 23, Daxx, Neusynthetisierte RNA) war, analog zu den Rps18-Transkripten, kaum reguliert und nur durch die positiven Stimuli $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ leicht induziert, während in beiden Infektionen (AD169 und $\Delta\text{US2-11}$) keine signifikante Änderung zu detektieren war. Für die Gesamt-RNA zeigte sich nach 3 und 6 Stunden $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ Behandlung eine leichte Erhöhung der Transkriptmengen, wie auch nach 24, 48 und 72 (AD169) beziehungsweise 24 und 48 Stunden ($\Delta\text{US2-11}$) HCMV-Infektion.

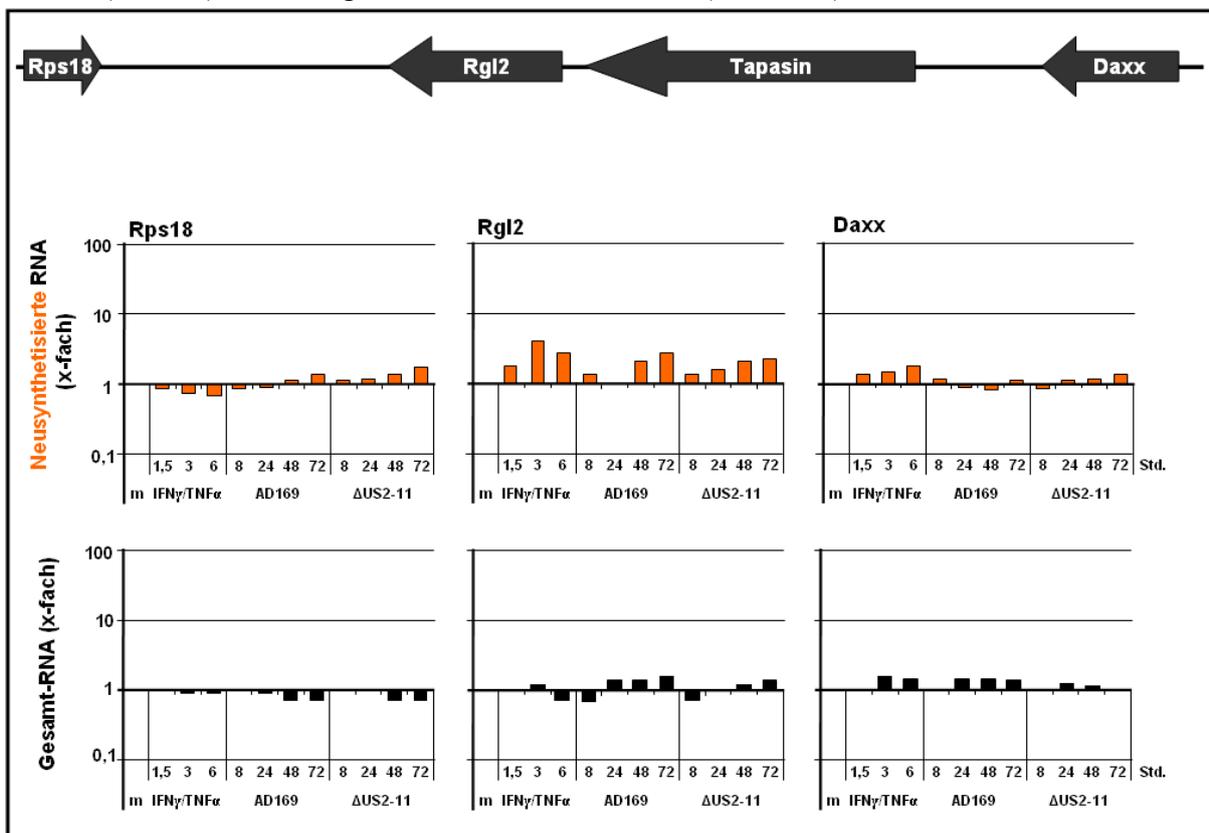


Abbildung 23: mRNA Neusyntheserate der Tapasin-umgebenen Gene. MRC-5 Fibroblasten wurden für 8, 24, 48 und 72 Stunden infiziert oder 90 Minuten, 3 und 6 Stunden $\text{IFN}\gamma$ /TNF α (500 U/ml und 25 ng/ml) stimuliert und die neusynthetisierte RNA und Gesamt-RNA, wie unter 2.4.1 analysiert. Die in cDNA umgeschriebene RNA wurde, mittels qPCR und spezifischen Primern für Rps18, Rgl2 und Daxx analysiert. Transkriptmengen sind in x-fach gegenüber mock dargestellt. Gezeigt ist repräsentativ für mindestens drei biologische Replikate, ein typisches Ergebnis der qPCR, jeweils abgeglichen gegen RNA der 18SrRNA (Halenius, Hauka *et al.* 2011).

Somit gab es letztendlich die benachbarten Gene des erweiterten MHC II Lokus betreffend keine Anzeichen, dass diese wie Tapasin reguliert werden. Auch in diesem Vergleich ergaben sich somit Unterschiede zur Tapasintranskription.

2.4.5 ChIP (Chromatin Immunpräzipitation) des Tapasinpromotors

Nachdem die negative Interferenz von HCMV durch die Analyse der RNA-Neusynthese auf den Promotor bestimmt werden konnte, galt es den genauen Mechanismus der Regulation und somit eine oder mehrere etwaige Transkriptionsfaktor-Bindestelle(n) herauszufinden.

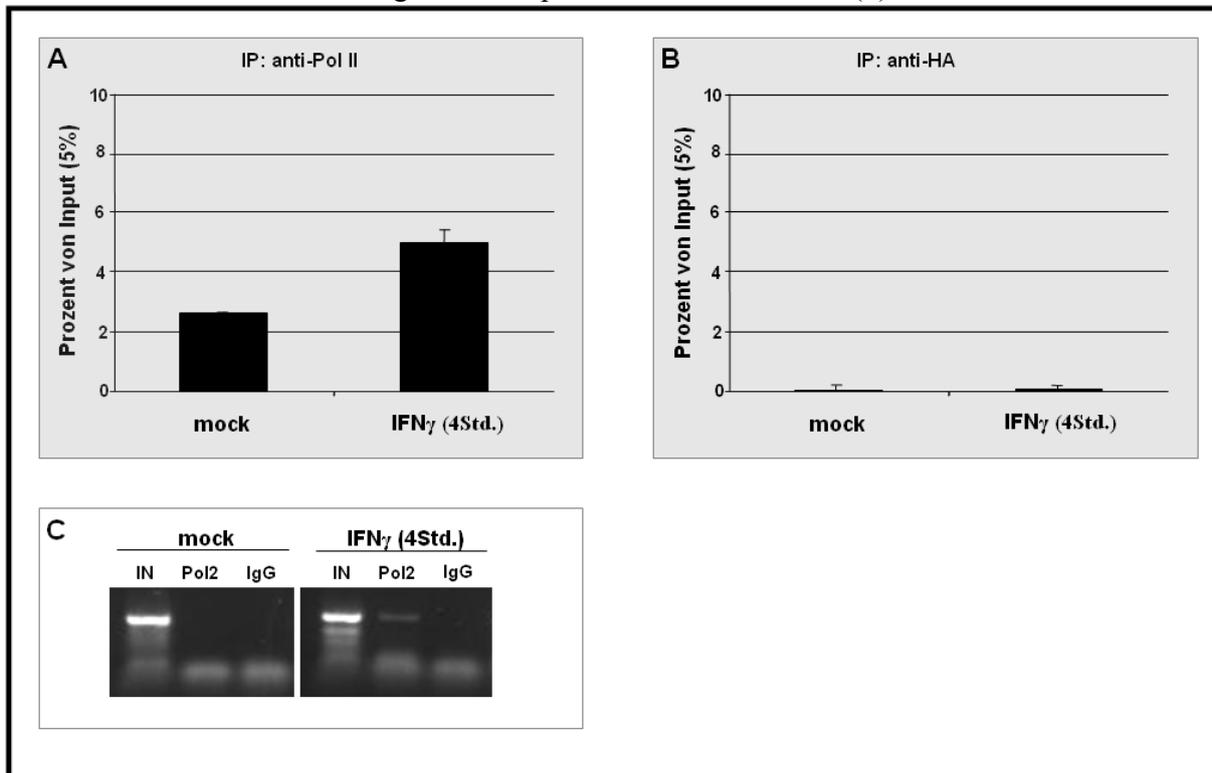


Abbildung 24: Chromatin Immunpräzipitation mit Polymerase II- und Kontroll-Antikörpern. MRC-5 Fibroblasten wurden für 4 Stunden mit IFN γ (500 U/mL) stimuliert oder nicht behandelt (mock) und anschließend mit 1% Formaldehyd fixiert, bevor sie lysiert und die Lysate für die Immunpräzipitation vorbereitet wurden. Die Immunpräzipitation wurde mit Antikörpern für Polymerase II und Hämagglutinin (jeweils 10 μ g) durchgeführt. Anschließend wurde die genomische DNA (gDNA) aufgereinigt und für die quantitative PCR vorbereitet. In der qPCR wurde die erhaltenen *crossing points* mittels einer fiktiven, optimalen Steigungskurve in Fragmentenzahlen umgerechnet und die Anzahl der Fragmente in Prozent gegenüber von 5% des Inputs berechnet. (A) qPCR der Polymerase II-präzipitierten gDNA für 4 Stunden mock und IFN γ Behandlung. (B) qPCR der Kontroll (IgG, Hämagglutinin) präzipitierten gDNA für 4 Stunden mock und IFN γ Behandlung. (C) sqPCR der Polymerase II (Pol II)- und Kontroll (IgG, Hämagglutinin)-präzipitierten gDNA sowie der Input (IN) gDNA von 4 Stunden mock- beziehungsweise IFN γ -Behandlungen.

Um dieses zu erreichen und zusätzlich den epigenetischen Zustand des Tapasinpromotors während der HCMV-Infektion zu untersuchen, das heißt in diesem Falle die Chromatin-beziehungsweise Histonkonstitution zu analysieren, wurde die ChIP-Methodik (Chromatin-Immunpräzipitation) etabliert. In der ChIP werden DNA/Chromatin-gebundene Proteine reversibel mit der DNA (Chromatin) vernetzt und anschließend die DNA fragmentiert. So kann über spezifische Antikörper das gebundene DNA-Fragment präzipitiert werden und mittels PCR eine Aussage über die Häufigkeit einer bestimmten Interaktion zwischen Protein

Ergebnisse

und DNA-Sequenz getroffen werden. Etwa ob die Polymerase II nach der IFN γ -Behandlung an einem IFN γ -induzierbaren Promotor vermehrt vorhanden ist.

Daher wurde die bekannte stimulierende Wirkung von IFN γ auf die Tapasinexpression zur Etablierung der Chromatin IP genutzt. In einer ersten IP (Abbildung 24A) wurde mit einem anti-Polymerase II Antikörper, in Kombination mit Tapasinpromotor-spezifischen Primern, die Okkupation des Tapasinpromotors mit Polymerase II analysiert. Nach 4 Stunden IFN γ -Stimulation wurden bereits 2-fache Mengen, nämlich 5% von (5%) Input im Vergleich zu 2,5% in nicht behandelten Zellen, präzipitiert. Durch die IFN γ -Zugabe wurde die Konzentration der Polymerase II am Tapasinpromotor also wie erwartet erhöht.

Als Kontrolle wurde zudem mit einem Anti-HA (Hämagglutinin) Antikörper präzipitiert und die Bindung der Tapasinpromotorsequenz analysiert (Abbildung 24B). Hier konnte in der PCR für beide Stimulationen (mock und IFN γ) wie erwartet keine Bindung nachgewiesen werden.

Auch in der semiquantitativen PCR (Abbildung 24C) war die Assoziation der Polymerase II mit dem Tapasinpromotor unter IFN γ Behandlung deutlich erhöht, während in der Kontrolle (Anti-HA) erneut keine Signale des Tapasinpromotors nachweisbar waren.

2.4.6 Histon 3 (Lysin 9) Acetylierung am Tapasingen und -promotor

Einen wichtigen Faktor der Transkription stellt der Acetylierungszustand des Chromatins beziehungsweise der Histone dar. Während in transkriptionell inaktiven Genen entsprechende Lysine (der Histone) methyliert sind, weisen sie an aktiven Genen (genauer deren Promotoren) Acetylgruppen auf (Mizzen and Allis 1998, Roth, Denu *et al.* 2001). Hier wurde anhand der Acetylierung des Histon 3 am Lysin 9 die Chromatinstruktur analysiert.

Nachdem in 2.4.4 bereits eine Analyse der das Tapasingen umgebenden Gen-Loci durchgeführt worden war, wurde so ebenfalls der Status der Acetylierung und damit die Zugänglichkeit des Chromatins für etwaige Transkriptionsfaktoren (Mizzen and Allis 1998) analysiert (Abbildung 25). Interessanterweise ergaben sich für Stimuli wie IFN γ , TNF α oder UV-inaktivierte Viruspartikel keine signifikanten Veränderungen in der Acetylierung des Histon 3 am Tapasinpromotor. In der Infektion, besonders ab einer Zeit 24 Stunden nach Infektion, stieg die Präzipitation von 10% auf bis zu 80% vom Input.

Bei der Analyse von Sequenzen, die weiter innerhalb des Tapasingenes lagen, wurden bis zu 10-fach reduzierte Mengen präzipitiert, die größtenteils unterhalb des Messlimits lagen (nicht

Ergebnisse

gezeigte Daten). Dieses war auf Grund der bekannten, genomweiten ChIP-chip Ergebnisse für Tapasin erwartet worden (*High-throughput* Daten vom Februar 2009 (GRCh37/hg19) von verschiedenen ChIP-Sequenzierungsanalysen in der Sammlung des *Genome Browsers* der *University of California Santa Cruz* (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) Abbildung 46, Appendix) (Lee and Shilatifard 2007). Die Präzipitation von acetyliertem Histon 3 war dort zu allen Zeitpunkten gleich, ob mit definiertem Stimuli oder Infektion. Lediglich zu zwei Zeitpunkten, 24 und 48 Stunden nach Infektion, war eine 2-fach stärkere Präzipitation möglich (nicht gezeigte Daten).

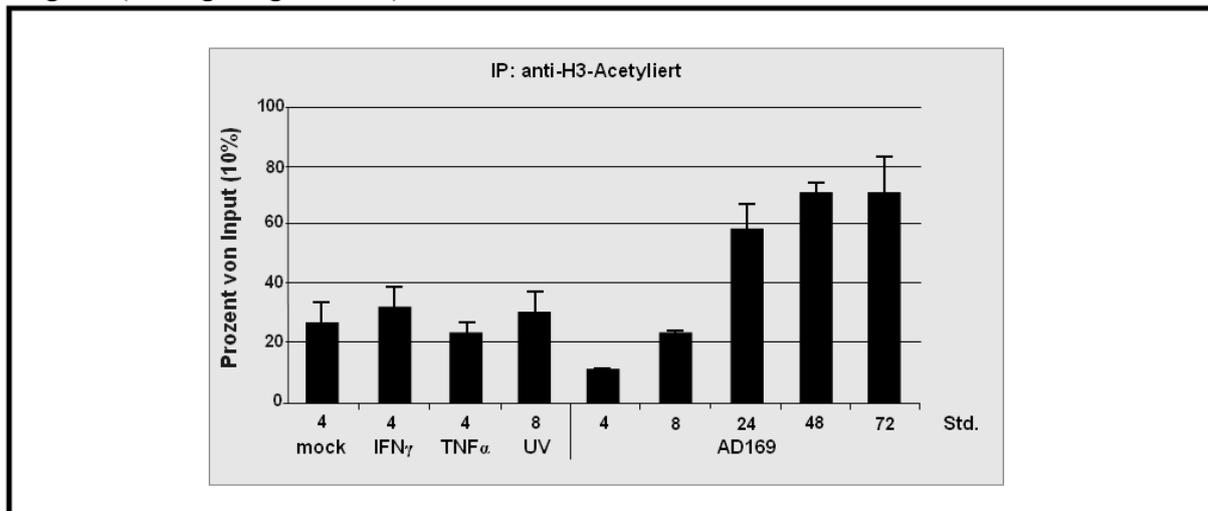


Abbildung 25: Histon 3 (Lysin 9) Acetylierung (am Tapasinpromotor) in infizierten Fibroblasten. MRC-5 Fibroblasten wurden für 4 Stunden IFN γ (500 U/mL), TNF α (25 ng/ml), mock oder 8 Stunden mit UV-inaktivierten Viruspartikeln (UV) stimuliert. Weitere Zellen sind für 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden infiziert worden (AD169). Zellen wurden mit 1% Formaldehyd fixiert, lysiert und anschließend die gDNA für die Immunpräzipitation gewonnen. Die Immunpräzipitation wurde mit einem anti-Histon 3 (Lysin 9-acetyliert) Antikörper durchgeführt. Mittels einer fiktiven, optimalen Steigungskurve wurden die Werte der qPCR in Fragmentenzahlen umgerechnet und die Anzahl der Fragmente, in Prozent gegenüber 10% des Inputs, berechnet.

Die Ergebnisse der zuvor beschriebenen IP zeigen, dass der Tapasinpromotor in HCMV-infizierten Zellen für Transkriptionsfaktoren zugänglich ist und somit transkriptionell aktiv sein kann.

2.4.7 Polymerase II Konzentration am Tapasingen und -promotor

Die deutliche Induktion der Histonacetylierung am Tapasinpromotor warf die Frage nach der dortigen Konzentration aktiver Polymerase II auf. Daher galt es zu klären, ob die Daten der reduzierten Promotoraktivität in den Analysen der RNA-Neusynthese (Abbildung 20) mit den Daten der Polymerase II ChIP korrelieren. So könnte man bestimmen, ob die dort vorhandene Polymerase II inhibiert oder sogar vom Promotor weg dirigiert wird.

Ergebnisse

Bezüglich der Polymerase II ergab sich nach der Behandlung der Zellen mit positiven Stimuli wie $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ oder UV-inaktivierten Viruspartikeln eine minimal erhöhte Konzentration am Tapasinpromotor (Abbildung 26). Während der frühen Infektion (4 Stunden nach Infektion) war ebenfalls eine marginal erhöhte Menge an Polymerase II am Tapasinpromotor nachweisbar, diese sank jedoch nach 8 Stunden wieder ab. Zwischenzeitlich, nach 24 und 48 Stunden, erreichte die Polymerase II wieder die Mengen, die auch in uninfizierten Zellen detektierbar waren, bevor nach 72 Stunden Infektion in der ChIP keine Polymerase II am Tapasinpromotor nachweisbar war. Einzig die reduzierte Polymerase II Menge zwischen 4 und 8 Stunden nach Infektion korrelierte somit leicht mit der initialen und starken Reduktion der RNA-Neusynthese (Tapasin 8-24 Std. n. I., Abbildung 20).

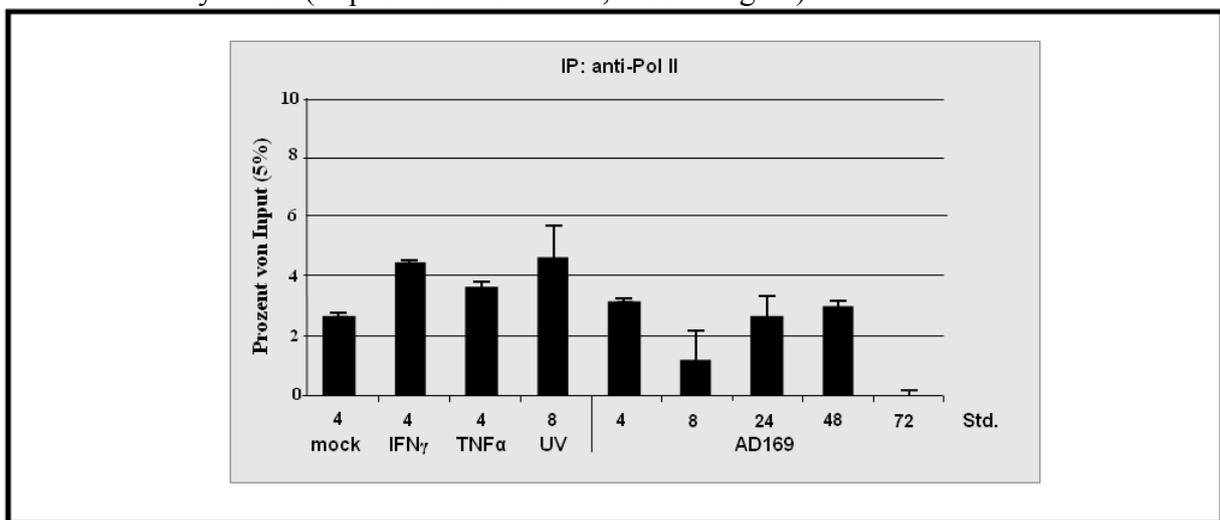


Abbildung 26: Polymerase II Konzentration am Tapasinpromotor. MRC-5 Fibroblasten wurden für 4 Stunden $\text{IFN}\gamma$ (500 U/mL), $\text{TNF}\alpha$ (25 ng/ml), mock oder 8 Stunden mit UV-inaktivierten Viruspartikeln (UV) stimuliert. Weitere Zellen sind für 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden infiziert worden (AD169). Zellen wurden mit 1% Formaldehyd fixiert, lysiert und anschließend die gDNA für die Immunpräzipitation gewonnen. Die Immunpräzipitation wurde mit einem anti-Polymerase II Antikörper (anti-Pol II) durchgeführt. Mittels einer fiktiven, optimalen Steigungskurve wurden die Werte der qPCR in Fragmentenzahlen umgerechnet und die Anzahl der Fragmente, in Prozent gegenüber 5% des Inputs, berechnet.

Mit derselben Immunpräzipitation wie in Abbildung 26 wurde mittels im Tapasin-Lokus gelegenen Primern versucht, die dortige Polymerase II Konzentration ebenfalls zu bestimmen. Wie schon zuvor (2.4.6) war die Präzipitation im Lokus aber deutlich herabgesetzt, so dass es für diese Präzipitationen unmöglich war, eine Bindung mittels PCR nachzuweisen, weder für Kontrollen noch für positive Stimuli.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass der Tapasinpromotor in HCMV-infizierten Zellen für (negative und positive) Transkriptionsfaktoren zugänglich ist und am Promotor selbst zumindest bis 48 Stunden nach Infektion Polymerase II vorhanden war. Eine exakte Korrelation zwischen Promotoraktivität und Polymerase II Präzipitation war nicht zu erkennen. Wie die vorhandene Polymerase II während der Infektion reguliert ist, ob sie etwa

zum so genannten *pausing* (Pausieren) gebracht wird, so dass die Transkription reduziert ist, sollte im Anschluss geklärt werden.

2.4.8 Die sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP) als transientes Reportergen

Da keine Anzeichen einer epigenetischen Repression gegeben waren, stattdessen die ChIP-Analysen des Histon 3 dafür sprachen, dass Transkriptionsfaktoren an den Tapasinpromotor binden können, wurde begonnen, mit einem Reportersystem zu arbeiten.

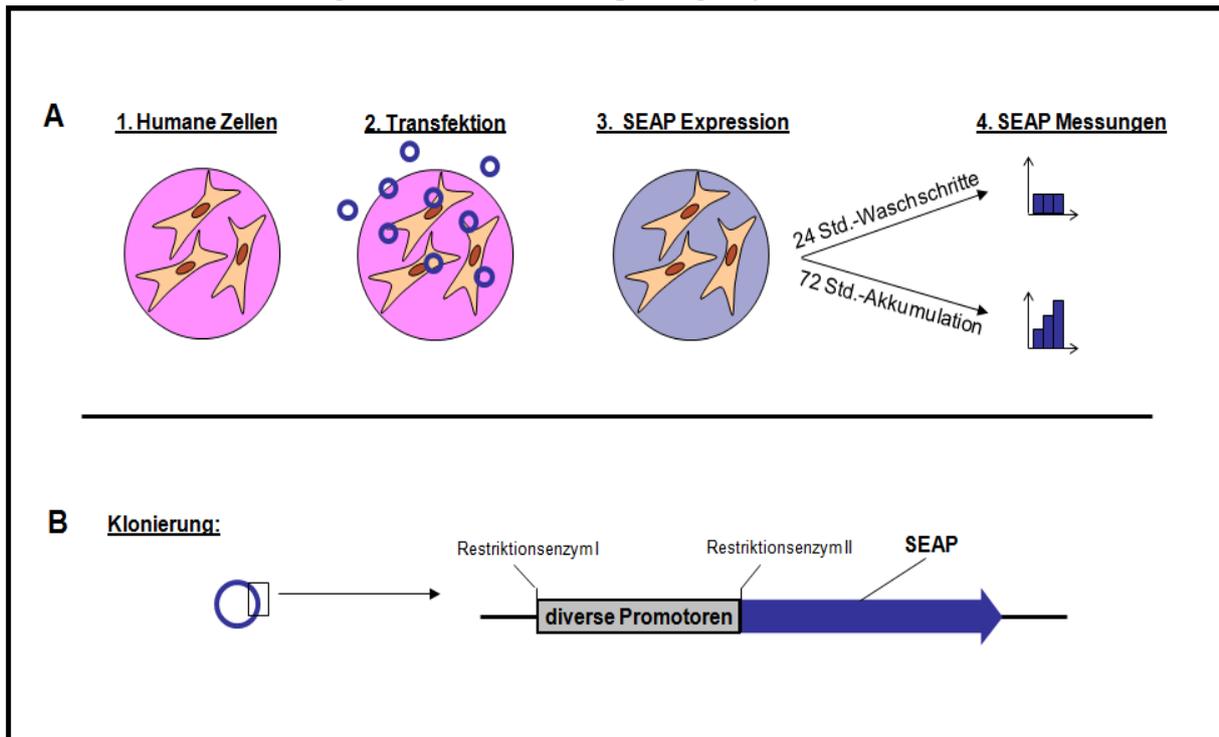


Abbildung 27: Übersicht des transient exprimierenden SEAP-Reportersystems. Skizze der Funktion des transienten Reportersystems. (A) Humane Zellen wurden 24 Stunden vor Infektion oder Stimulation, transfiziert und die SEAP-Expression nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Nach den Messzeiten wurden die Zellen entweder gewaschen (Waschschritte) oder nur das zur Messung entnommene Medium ersetzt (Akkumulation). (B) Die Phosphataseexpression wurde unter die Kontrolle von verschiedenen, jeweils angegebenen Promotoren gesetzt.

So sollte die Sequenz des Promotors gefunden werden an dem die Bindung:

- 1) eines negativen Faktors beziehungsweise
- 2) eines positiven Faktors (der während der Infektion inhibiert wird) stattfindet.

Wie schon in eigenen Vorarbeiten sollte mittels eines transienten SEAP-Reportersystems (*secreted alkaline phosphatase*) versucht werden, diverse Verkürzungen des Tapasinpromotors zu vergleichen und so mögliche Sequenzbereiche zu finden, welche durch die HCMV-Infektion reguliert sind. Die SEAP wurde dabei der Luciferase vorgezogen, da sie

eine kontinuierliche Kinetikmessung im Verlaufe der Infektion ermöglicht, ohne dass die Zellen lysiert werden müssen. Abbildung 27 zeigt den Aufbau des Experimentes (A) und skizziert die Klonierung (B). In Abbildung 28 sind die Ergebnisse dieses transienten Reportersystems zusammengefasst.

Wie zuvor (siehe 2.2) kam es bei dieser Reproduktion bei allen transienten Reporter-Vektoren zu einer Induktion der Expression, selbst ein Leervektor (Leer), welcher nur die multiple

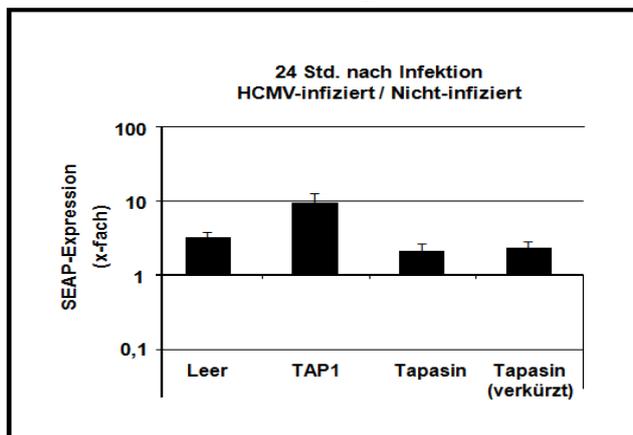


Abbildung 28: SEAP-Expression in infizierten Fibroblasten. MRC-5 Fibroblasten wurden mit dem transienten Reportersystem transfiziert in denen die SEAP-Expression unter der Kontrolle der MCS (Leer) und den TAP1-, Tapasin- und einem verkürzten Tapasinpromotor standen. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen HCMV/mock infiziert und weitere 24 Stunden später die Phosphataseexpression bestimmt. Die Expression in der Infektion ist in x-fach von mock-infizierten Zellen gezeigt.

Klonierungsstelle enthielt, wurde mehr als 5-fach induziert. Die Expression der Phosphatase, welche unter der Kontrolle des Tapasinpromotors stand (Abbildung 28, Tapasin) und auch jene, welche eine minimale Sequenz des Promotors beinhaltete (Abbildung 28, Tapasin (verkürzt)), war schwächer als die des Kontrollvektors während der Infektion. Der TAP1 Promotor, welcher zur Kontrolle ebenfalls analysiert wurde, war nach 48 Stunden HCMV-Infektion noch bis zu 10-fach induziert (Abbildung 28, TAP1). Die Messwerte nicht infizierter,

nicht-transfizierter Zellen spiegelten den Hintergrund wider und lagen unterhalb der Expression aller analysierten Promotoren. Die Promotoren von TAP1 und Tapasin waren durch $IFN\gamma/TNF\alpha$ induzierbar (nicht gezeigte Daten), so dass die generelle Funktionalität des Assays bestätigt wurde.

Auf Grund der gegebenen Induktion nahezu aller Sequenzen während der HCMV-Infektion und der zusätzlich minimalen konstitutiven Expression vom Tapasinpromotor wurde ein Assay entworfen, in welchem das Reporter gen und die Promotoren stabil integriert werden sollten.

2.4.9 SEAP als stabil integriertes Reporter gen

Eine Hypothese, um die zuvor beschriebene konstitutive Aktivität aller Reporter gen-Plasmide während der HCMV-Infektion zu erklären, war, dass durch die Infektion eine

Ergebnisse

Transaktivierung aller nicht genomischen DNAs eintritt. Hintergrund dieser Überlegung war dabei die Tatsache, dass die epigenomische HCMV-DNA selbst aktiv transkribiert werden muss, um eine erfolgreiche Replikation zu gewährleisten. Liegt ein Reporter gen transient vor, könnte es selbst transaktiviert werden, während es dagegen stabil integriert dieser Aktivierung eventuell nicht unterliegt.

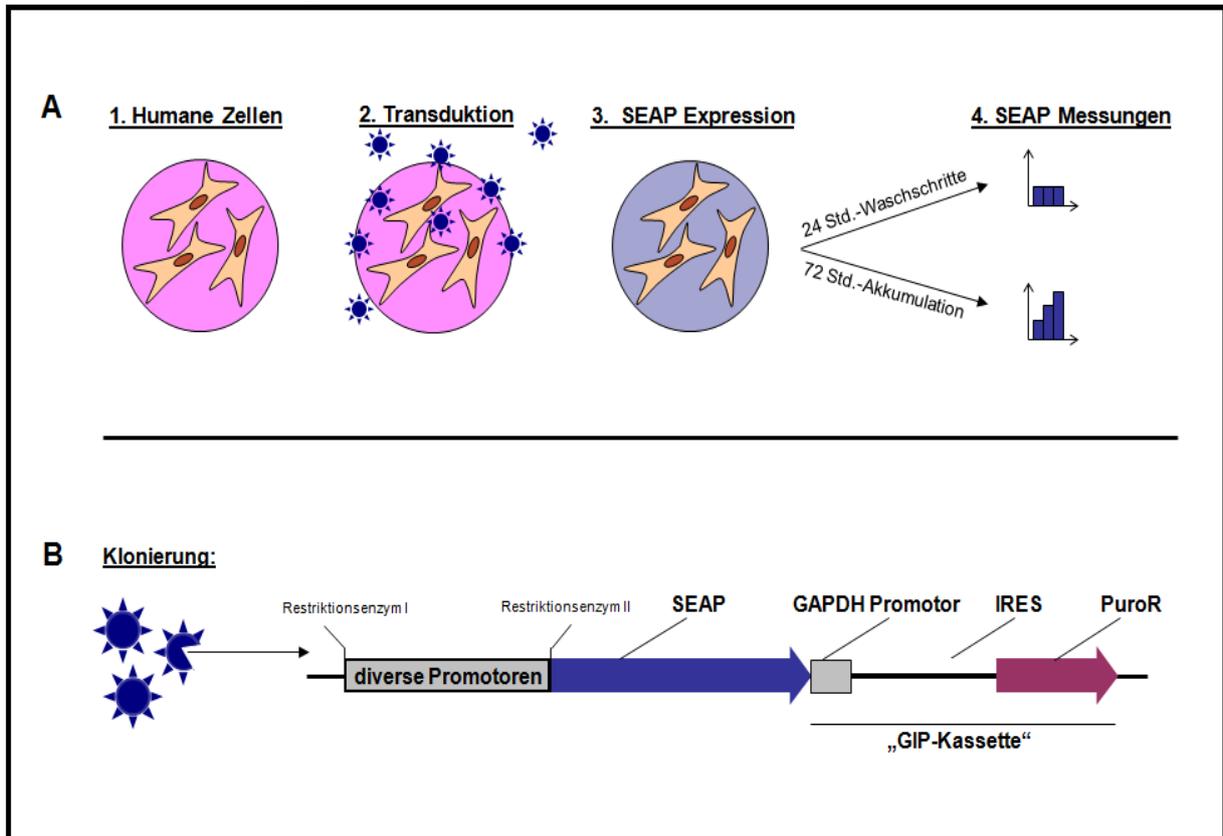


Abbildung 29: Übersicht des stabil exprimierenden SEAP-Reportersystems. Skizze der Funktion des transienten Reportersystems. (A) Humane Zellen wurden mit lentiviral verpackten Reporter genkonstrukten transduziert und 48 Stunden nach Transduktion mit 5 µg/mL Puromycin selektiert. Anschließend konnte die SEAP-Expression unter beliebigen Bedingungen gemessen werden. Nach den Messzeiten wurden die Zellen entweder gewaschen (Waschschritte) oder das zur Messung entnommene Medium ersetzt (Akkumulation). (B) Die Phosphataseexpression wurde unter die Kontrolle von verschiedenen, jeweils angegebenen Promotoren gesetzt (diverse Promotoren). Die GIP-Kassette gewährleistet die Möglichkeit der Selektion unabhängig von der Stärke des zu untersuchenden Promotors.

Um das transiente Reportersystem zu modifizieren, wurde die Phosphatase cDNA zunächst in einen lentiviralen Vektor transferiert. Des Weiteren wurde eine neue verkleinerte Klonierungsstelle hinzugefügt, um dort Promotorsequenzen einzufügen. Direkt hinter die Phosphatase wurde die sogenannte GIP-Kassette kloniert. Sie besteht aus dem GAPDH-Promotor, einer IRES-Sequenz (*internal ribosomal entry site*) sowie dem PuroR (Puromycin N-Acetyltransferase) Gen, welches die Puromycinresistenz vermittelt. Sie ermöglicht es polyklonale MRC-5-Zelllinien herzustellen und unabhängig vom jeweils integrierten Promotor die Selektion aller erfolgreich transduzierten Zellen (über die GAPDH-Promotor

getriebene Resistenzgenexpression). Zusätzlich bleibt aber auch vom jeweiligen Promotor (gewährleistet über die IRES-Sequenz) die Resistenzgenexpression möglich (Abbildung 29). Zur Analyse der SEAP-Expression in infizierten Zellen wurden verschiedene Zellen, wie ILN7 (Hautfibroblasten), U373 (Glioblastom Zellen), RPE (Zellen des Retinalen Pigmentepithels) und MRC-5 Zellen untersucht und verglichen, um die möglichst optimale Zelllinie für Transduktion, Selektion und Infektion zu finden. Dabei wurden die aus dem transienten System bekannten MRC-5 Zellen, als nicht immortalisierte Zelllinie, trotz der eintretenden Seneszenz und dadurch begrenzten Passagenzahl auf Grund der hohen HCMV-Suszeptibilität ebenfalls ausgewählt.

2.4.10 IFN γ -Induzierbarkeit des β_2m -Promotors im stabilen Reporterassay

Zur Überprüfung der Funktionalität der Promotorkonstrukte wurden zu Beginn zunächst HeLa Zellen transient transfiziert (nicht gezeigte Daten). Sowohl die SEAP-Expression als auch die Puromycinresistenz konnte jeweils eindeutig nachgewiesen werden. Die Insertion der GIP-Kassette beeinflusst demnach die Expression der Phosphatase nachweislich nicht negativ und auch das Resistenzgen kann exprimiert werden.

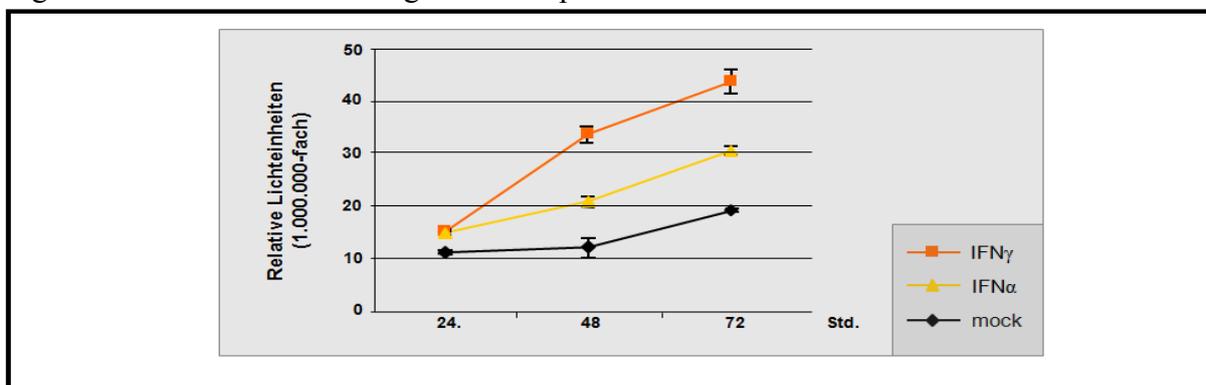


Abbildung 30: Der β_2m -Promotor des stabil transduzierten Reportergens ist IFN α - und IFN γ -stimulierbar. β_2m -Promotor-Reportergen transduzierte U373 Zellen (humane Glioblastom Zellen) wurden mit Typ I und II Interferon (je 500 U/mL IFN α , respektive IFN γ) stimuliert oder nicht stimuliert (mock). Die zu den angegebenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 Stunden) im Medium akkumulierte Phosphatase wurde gemessen und in relativen Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) dargestellt. Die gezeigten Messwerte sind Mittelwerte (Standardabweichungen) von drei unabhängigen Messungen und stehen repräsentativ für ein typisches Ergebnis aus drei biologischen Replikaten.

Anschließend wurden U373 Zellen mit dem β_2m -Promotor-Reportergen-Konstrukt transduziert und die Funktionalität im integrierten Kontext kontrolliert (Abbildung 30). Die immortalisierten U373 Zellen wurden dabei auf Grund der sehr guten lentiviralen Transduzierbarkeit für diesen weiteren Vorversuch ausgewählt. In unbehandelten Zellen (mock) konnte die spontane (nicht-induzierte) Akkumulation der SEAP detektiert werden,

dort stieg die Phosphatase-Aktivität von etwas mehr als 10 auf knapp weniger als 20 Millionen RLU (*relative light units*, relative Lichteinheiten). Kontroll-transduzierte Zellen zeigten keine Expression oberhalb des unteren Messlimits.

Um die Spezifität des β_2m -Promotors zu testen, wurde die bereits bekannte IFN-Induzierbarkeit von β_2m genutzt (Abbildung 4). Wurden die Zellen mit IFN α (Typ I Interferon) behandelt, war die Aktivität bereits 24 Stunden später erhöht und stieg im Verlaufe auf das 3-fache nach 72 Stunden Behandlung an. Für IFN γ (Typ II Interferon) war bereits 24 Stunden nach Zugabe ebenfalls eine erhöhte Aktivität messbar, welche bis auf das 4,5-fache anstieg und die erfolgreiche Integration und Funktion des Reportergens anzeigte.

2.4.11 Vergleich verschiedener Zelllinien im stabilen Reportergenassay

Nachdem die Funktionalität des Assays (*proof of concept*) erwiesen war, wurden die zuvor genannten (2.4.9) Zelllinien auf ihre Kompatibilität mit dem Assay untersucht. Die genannten Zellen nebst den MRC-5 Zellen wurden auf Grund ihrer bekannten Suszeptibilität und der Tatsache, dass sie immortalisiert sind, ausgewählt (Greaves, Brown *et al.* 1995, Plachter, Sinzger *et al.* 1996, Scholz, Doerr *et al.* 2003, Zou, Bresnahan *et al.* 2005). Die Phosphataseexpression ist in diesen Fällen als x-fach gegen unbehandelte Zellen verrechnet worden.

U373 Zellen sind für den Assay (in der Infektion) nicht nutzbar, da sie nach der Transduktion in allen Fällen hypersensitiv für eine HCMV-Infektion waren. Deutlich wird dieses durch die Korrelation von toten Zellen und der Infektionsdosis. Mit steigender Infektionsdosis sank die Phosphatase-Aktivität (Abbildung 31A), während die Anzahl der toten Zellen, gemessen an der sinkenden Gesamt-Proteinmenge (Abbildung 31A), stieg.

ILN7 Zellen (Abbildung 31B) konnten nicht erfolgreich transduziert werden.

RPE Zellen (Abbildung 31C) ließen sich erfolgreich transduzieren und exprimierten, im Vergleich aller Zelltypen, die höchsten Phosphatasekonzentrationen pro Zelle. Das GAPDH Reportergen, welches als Kontrolle diente, exprimierte in unbehandelten Zellen dieselbe Phosphatasemenge wie IFN γ (Typ II Interferon) behandelte oder infizierte Zellen. Lediglich bei der Behandlung mit IFN α und TNF α sank die Phosphataseexpression leicht ab. Das Tapasin Reportergensystem zeigte bei Behandlung mit IFN α und TNF α , IFN γ und nach HCMV-Infektion allerdings ebenfalls keinerlei signifikante Änderung der Expression. Auch weitere Stimuli zeigten keinen Einfluss auf diese Reportergene (nicht gezeigte Daten).

Ergebnisse

Schlussendlich konnten die drei untersuchten Zelllinien keine belastbaren Daten liefern, so dass die weiteren Versuche ausschließlich in MRC-5 Zellen durchgeführt wurden.

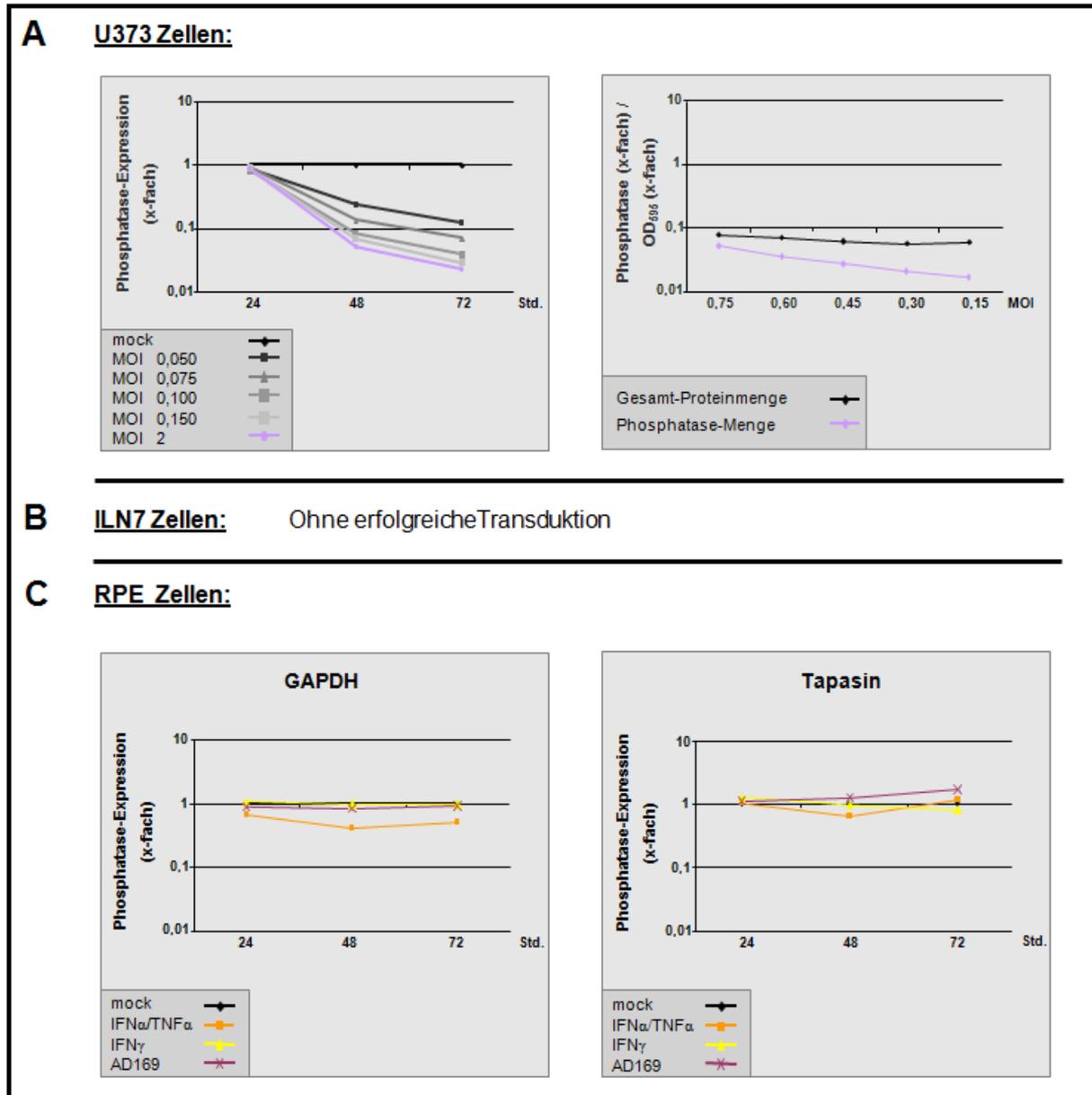


Abbildung 31: Das stabile Reportersystem mit GAPDH, β_2m und Tapasin kontrollierter Reporterexpression in verschiedenen Zellen. (A) β_2m -Reportergen exprimierende U373 Zellen (humane Glioblastom Zellen) wurden HCMV (AD169, verschiedene Infektionsdosen) oder mock infiziert. Die Aktivität der Phosphatase ist in relativen Lichteinheiten (RLU) in x-fach gegen nicht infizierte Zellen aufgetragen und wurde 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion bestimmt. Die Zellen wurden mock und mit einer MOI von 0,05; 0,075; 0,1; 0,15 und 2 infiziert. Zellen, welche mit einer MOI von 0,75; 0,6; 0,45; 0,3 und 0,15 infiziert worden waren, sind nach 72 Stunden Infektion lysiert und ihr Proteingehalt mittels Bradford-Reagenz gemessen worden. Die Gesamt-Proteinmenge ist bei einer OD_{595} in x-fach gegen nicht infizierte Zellen dargestellt. Vor der Zelllyse ist die Phosphataseaktivität bestimmt worden und in der Grafik als x-fach gegen mock ebenfalls gezeigt. (B) ILN7 (humane Hautfibroblasten) Zellen konnten nicht in den Mengen transduziert werden, um Experimente durchzuführen. (C) GAPDH- und Tapasin-Reportergen transduzierte RPE Zellen (humane Zellen des Retinalen Pigmentepithels) wurden $IFN\alpha/TNF\alpha$, $IFN\gamma$ (je 500 U/mL $IFN\alpha$, respektive $IFN\gamma$ und 25 ng/ml $TNF\alpha$) und mock behandelt sowie HCMV-infiziert. Die Expression (nach 24, 48 und 72 Stunden) ist in x-fach gegen unbehandelte Zellen aufgetragen.

2.4.12 Der Tapasinpromotor im stabilen Reporter-genassay ist IFN γ -induzierbar

Bei den Analysen in MRC-5 Zellen wurde mit frühen Passagen (<7) gearbeitet. Auf diese Weise war gewährleistet, dass die Zellen nach der Transduktion und Selektion noch ausreichend passagiert werden konnten, um eine entsprechende Anzahl an Versuchen durchführen zu können. Als optimaler Aufbau ergab sich eine Zellzahl von 1×10^5 in 300 μL Medium á 24-Loch-Platten Loch. Zunächst wurde eine Leer-Sequenz (beziehungsweise die verkürzte MCS) zusammen mit dem Tapasinpromotor analysiert. Die Phosphataseaktivität ist hierbei als RLU-Mittelwert von 3 Messungen aufgetragen (Abbildung 32).

Das Kontrollkonstrukt ohne Promotor (Abbildung 32, MCS) zeigte nach der Behandlung mit IFN γ und TNF α keinen Unterschied zur Expression bei unbehandelten Verhältnissen. Die Expression der Phosphatase lag über den Verlauf der Infektion leicht (und konstant) unterhalb der in unbehandelten Zellen. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen ergab sich somit eine vermeintlich reduzierte Expression, welche sich auf den Einfluss der Infektion auf den Zellzyklus und den so vermittelten Wachstumsstopp (Jault, Jault *et al.* 1995, Lu and Shenk 1996) zurückführen lässt. Dieses Konstrukt zeigte eine minimale Expression der Phosphatase knapp oberhalb des unteren Messlimits. Die Expression vom Tapasinpromotor war im Vergleich dazu 2-3-mal so stark.

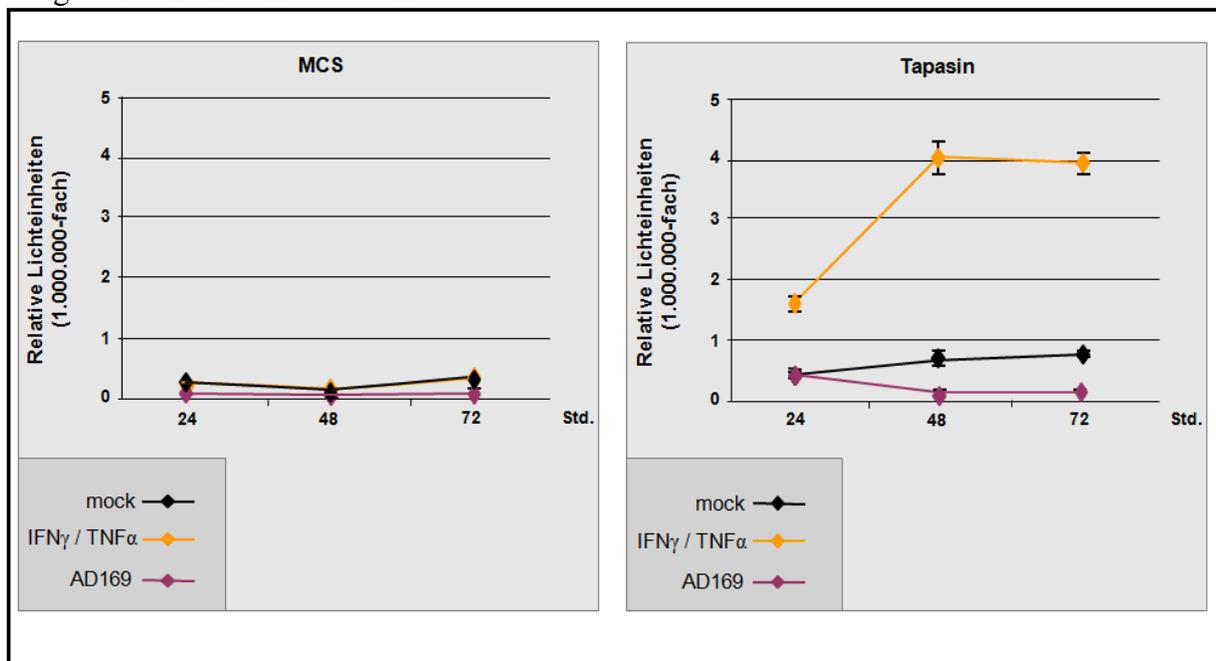


Abbildung 32: Das Reporter-gen-system ohne und mit Tapasinpromotor in MRC-5 Fibroblasten. Transduzierte Reportergene unter der Kontrolle des Tapasinpromotors oder ohne Promotor (MCS, *multiple cloning site*) in MRC-5 Fibroblasten wurden kontrollbehandelt, IFN γ /TNF α (500 U/mL IFN γ und 25 ng/ml TNF α) stimuliert sowie HCMV infiziert (AD169). Die Phosphataseexpression wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen und in RLU dargestellt. In allen weiteren Experimenten (ab 2.4.13) wurde die FCS Konzentration des Mediums (von hier und zuvor 10% auf 3%) reduziert. Der resultierende, verringerte Hintergrund ist in den folgenden Rechnungen bereits verrechnet.

Tapasin (Abbildung 32) war durch die Stimulation von IFN γ und TNF α nach 24 Stunden 2-fach induziert. Nach 48 Stunden war ein Maximum von 8-fach zur mock-Expression, welche nicht weiter stieg (72 Stunden) und konstant blieb, gegeben. Im Verlauf der HCMV-Infektion sank die Expression nach 48 Stunden unterhalb der von unbehandelten Zellen und erreichte nach 72 Stunden das untere Detektionslimit. Nachdem mit diesem Assay Daten erhalten worden waren, welche mit der Analyse der RNA-Neusynthese korrelierten, wurde dazu übergegangen, die aus eigenen Vorarbeiten (2.2) bekannten Verkürzungen zu analysieren.

2.4.13 Der Tapasinpromotor sowie 5' Verkürzungen des Promotors im stabilen Reporteragenassay in MRC-5 Fibroblasten

Der Tapasinpromotor wurde in 3'Richtung verkürzt und so 5' Verkürzungen (Abbildung 33) geschaffen, welche als Promotorsequenzen im Reporteragenassay stabil transduziert wurden. Durch diese Verkürzungen wurden folglich immer weitere Transkriptionsfaktor-Bindestellen entfernt. So sollte es ermöglicht werden, die durch HCMV regulierte Sequenz möglichst eng eingrenzen zu können. Analog zur Analyse der Neusyntheserate von RNA wurde IFN γ als Stimulus eingesetzt und die Zellen für 24, 48 und 72 Stunden behandelt. In denselben Zeitfenstern wurde die HCMV-Infektion untersucht. In der Verrechnung der SEAP-Expression der diversen Verkürzungsmutanten, nach Infektion oder IFN γ -Stimulus gegenüber der Expression in unbehandelten Zellen, zeigten sich in 5' nach 3'Richtung die im Folgenden erläuterten Ergebnisse.

Der wildtypische Promotor (Abbildung 33A, Wildtypisch) exprimierte nach IFN γ -Stimulation mehr Phosphatase als ohne Stimulation (Abbildung 33B, Wildtypisch). Während der Infektion war die Expression der Phosphatase unter der Kontrolle des Tapasinpromotors reduziert und gleicht den Daten der RNA-Markierung (Vergleich Abbildung 33B, Wildtypisch und Abbildung 20, Tapasin).

Wurde der Promotor verkürzt (Abbildung 33A, 5' Verkürzung 1), war die Basisexpression dieses Konstrukts im Durchschnitt stärker als die des wildtypischen Promotors (Abbildung 35); die Induzierbarkeit durch IFN γ blieb im Verhältnis zum wildtypischen Promotor ähnlich stark, war jedoch nach 24 Stunden kaum messbar (Abbildung 33B, 5' Verkürzung 1 und als Auszug im Ergebnis aus Abbildung 51 (Appendix)). Interessanterweise war in den ersten 24 Stunden der Infektion die Expression zudem bereits stark reduziert (Abbildung 33B,

Ergebnisse

5' Verkürzung 1). Dieses war weder für den wildtypischen Promotor noch für die weiteren Verkürzungen (5' Verkürzung 2-5) der Fall und ließ zusammen mit der fehlenden $\text{IFN}\gamma$ -Induktion nach 24 Stunden und den dort entfernten Sequenzen (inklusive der GAS-Konsensussequenzen) die folgende Vermutung zu: Durch die fehlenden GAS-Elemente könnte nicht nur der frühe Stimulus durch $\text{IFN}\gamma$, sondern ebenfalls eine durch die Infektion (respektive die Viruspartikel) zu frühen Zeiten ausgelöste Induktion ausbleiben.

Die folgende Verkürzung (Abbildung 33A, 5' Verkürzung 2) war in der Basisexpression im Vergleich zur 5' Verkürzung 1 und dem wildtypischen Promotor reduziert (Abbildung 35, 5' Verkürzung 2 und exemplarisch in Abbildung 51 (Appendix)). Die Induktion durch $\text{IFN}\gamma$ war ähnlich der des wildtypischen Promotors, wobei die Stimulation hier nach 72 Stunden am stärksten war (Abbildung 33B, 5' Verkürzung 2). Die Expression in infizierten Zellen war für diese Mutante im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen nicht mehr signifikant verändert (Abbildung 33B, 5' Verkürzung 2), so dass in dieser Verkürzungsmutante möglicherweise bereits eine (durch HCMV) negativ regulierbare Sequenz entfernt wurde.

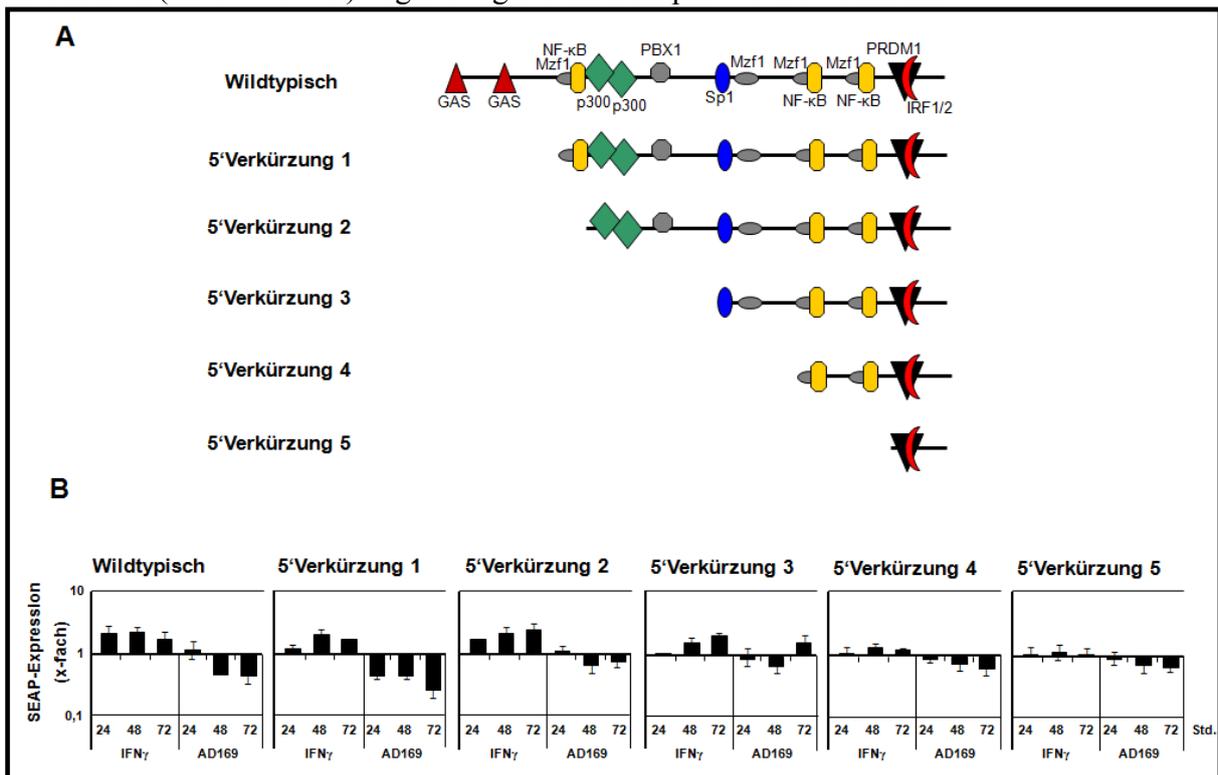


Abbildung 33: Induktion und Repression der 5' Verkürzungen des Tapasinpromotors in infizierten und $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten MRC-5 Fibroblasten. (A) Skizziert sind die Promotorverkürzungen (und die wildtypische Sequenz) und potenzielle GAS-, Mzf1-, NF- κ B-, PBX1-, Sp1-, IRF- und PRDM1-Bindestellen/Konsensussequenzen (TFsearch, <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). (B) Transduzierte Reportergene unter der Kontrolle von Tapasinpromotor-Verkürzungen (und der wildtypischen Sequenz) in MRC-5 Fibroblasten wurden kontrollbehandelt, $\text{IFN}\gamma$ (500 U/mL) stimuliert sowie HCMV-infiziert. Die Phosphataseexpression wurde zu den angegebenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 Stunden) als Akkumulation gemessen. Messungen aus drei unabhängigen Experimenten und mindestens zwei verschiedenen Transduktionen wurden inklusive Standardabweichungen verrechnet. Die Ergebnisse sind als x-fach gegenüber den mock-Werten zu den jeweiligen Zeitpunkten dargestellt.

Ergebnisse

Auch Verkürzung 3 (Abbildung 33A, 5' Verkürzung 3) war in der Basisexpression, im Vergleich zur vorherigen, weiter reduziert (Abbildung 35). Die Expression lag nur knapp oberhalb des unteren Messlimits. Eine minimale Induktion durch IFN γ war gegeben. Die Expression während der Infektion war leicht reduziert (Abbildung 33B, 5' Verkürzung 3), lag für die leichte Reduktion (24 und 48 Stunden nach Infektion) aber nach wie vor stetig oberhalb des unteren Messlimits.

Die vierte Verkürzung (Abbildung 33A, 5' Verkürzung 4) war in der Basisexpression um das 10-fache höher als die vorherigen und die wildtypische Sequenz (Abbildung 35). Eine Stimulation durch IFN γ war bei dieser Verkürzung nicht mehr gegeben. In infizierten Zellen sank die Expression der Phosphatase im Vergleich zu Kontrollzellen leicht ab, blieb jedoch weit oberhalb der Regulation des wildtypischen Promotors (Abbildung 33B, 5' Verkürzung 4). Das kürzeste Promotorstück (Abbildung 33A, 5' Verkürzung 5) war um das 100-fache stärker in der Basisexpression als das wildtypische beziehungsweise die ersten beiden Verkürzungen (Abbildung 35). Auch für diese Verkürzung war die Expression der Phosphatase in infizierten Zellen nur leicht reguliert, während eine IFN γ -Induktion ausblieb (Abbildung 33B, 5' Verkürzung 5). Da in dieser Sequenz eine potenzielle IRF-1/2-Bindestelle sowie eine ISRE-Sequenz (überlappend mit der PRDM1-Bindestelle) vorhanden sind und so eine Induktion durch IFN γ erwartet wurde, überraschten diese Daten. Die hohe Aktivität dieser Verkürzung, zusammen mit der stetig gestiegenen Expression der 5' Verkürzungen (Abbildung 35, ab 5' Verkürzung 3), legt die Vermutung nahe, dass einige stark negativ regulatorische Sequenzen aus diesen beiden Promotorverkürzungen (5' Verkürzung 4 und 5) entfernt wurden.

Zusammenfassend ließ die geringfügige Repression (während der Infektion) der zweiten Verkürzung (Abbildung 33B, 5' Verkürzung 2), obwohl im Vergleich zur ersten Verkürzung nur 29 Nukleotide fehlen, auf eine Rolle der dort gelegenen Transkriptionsfaktor-Bindestellen schließen. In dieser Sequenz liegen sowohl eine Mzfl- als auch eine NF- κ B-Bindestelle vor. Auf Grund bekannter Einflüsse auf NF- κ B-Bindestellen (Zhong, May *et al.* 2002) wurde diese als möglicherweise regulierte Sequenz angesehen. Um den möglichen negativen Effekt von HCMV mittels der Kontrolle dieser Sequenz zu untersuchen, wurde diese mutiert und in der Infektion analysiert.

2.4.14 Punktmutationen der NF- κ B- und/oder PRDM1-Bindestellen verringern die Reduktion der Promotoraktivität während der HCMV-Infektion nicht

In direkter Nachbarschaft der NF- κ B-Bindestelle finden sich zwei p300-Bindestellen. Eine kombinatorische Funktion beider Proteine (NF- κ B und p300) ist hinlänglich beschrieben (Gerritsen, Williams *et al.* 1997) und verdeutlicht, zusammen mit den Daten des murinen Tapasinpromotors (Herrmann, Trowsdale *et al.* 2003), dass diese Bindestelle im Tapasinpromotor essenziell und konserviert ist. Die vorliegende NF- κ B-Bindestelle (GGAAATTCCC) zeigte (*in silico*) keine eindeutige Präferenz, von p50 oder von p65 bevorzugt gebunden zu werden (Kunsch, Ruben *et al.* 1992). Dieses wäre in Anbetracht einer möglichen Bindung eines p50/p50-Homodimers besonders interessant. Für das p50/p50-Homodimer konnte ein inhibitorischer Effekt auf Promotoren (mit NF- κ B-Bindestelle) gezeigt werden (Zhong, May *et al.* 2002) und daher war es denkbar, dass HCMV einen ähnlichen Mechanismus nutzt, um den Tapasinpromotor zu inhibieren. Um keinen artifiziellen Promotor zu schaffen, an dem die Bindung von p50 oder p65 bevorzugt ist, musste die Bindestelle durch vier Punktmutationen (rote Nukleotide der NF- κ B-Konsensussequenz; GTAAC**TGCAC**) gänzlich entfernt werden.

Gezeigt wurde auch, dass PRDM1 in der Lage ist, die Aktivität des Tapasinpromotors im Überexpressionssystem zu inhibieren (Doody, Stephenson *et al.* 2007). In Vorarbeiten konnte dieses, nicht zuletzt mittels des Nachweises der massiven Reduktion von PRDM1-Transkripten im Verlauf der HCMV-Infektion, weitestgehend ausgeschlossen werden. Auf Grund der erwähnten Problematik des transienten Reporterassays war eine Reproduktion der dort erhaltenen Daten zu den PRDM1-Mutanten jedoch vorgesehen. So wurde wie schon in Vorarbeiten durch zwei Punktmutationen die PRDM1-Bindestelle entfernt. Dies erfolgte nach dem Schema von Doody *et al.*, ohne die Bindestellen für IRF-1/2 und oder die ISRE-Sequenz zu verändern (Doody, Stephenson *et al.* 2007).

Die Basisexpression der Phosphatase vom Δ PRDM1-Tapasinpromotor war im Vergleich zum wildtypischen Promotor in unbehandelten Zellen leicht erhöht (Abbildung 35, Δ PRDM1), und die IFN γ -Stimulation nur marginal (Abbildung 34 Δ PRDM1). Dieses könnte dafür sprechen, dass die maximale Induktionspotenz des Tapasinpromotors nach IFN γ -Stimulus durch die Entfernung der inhibitorischen PRDM1-Bindestelle bereits erreicht wurde. Da durch die Mutation eine „nun konstitutive“ Induktion gegeben sein könnte, fiel die IFN γ -Induktion geringer aus. Während der Infektion zeigte sich keine Reduktion der Repression durch HCMV, die negative Regulation war sogar leicht verstärkt.

Ergebnisse

Die Expression vom Δ NF- κ B-Tapasinpromotor bildete die schwächste aller nachweisbaren/messbaren Phosphatasekonzentrationen und unterstrich die Wichtigkeit dieser Bindestelle (Abbildung 35, Δ NF- κ B). Die Induktion durch IFN γ war in diesem Promotor dagegen die stärkste aller Tapasinpromotoren (Abbildung 34, Δ NF- κ B) und kann durch ein Modell (3.9) erklärt werden. Während der HCMV-Infektion war kein Unterschied zu der Regulation des wildtypischen Promotors gegeben und ein Einfluss der NF- κ B-Bindestelle damit unwahrscheinlich. Die negative Regulation während der Infektion war (auch hier wie für Δ PRDM1) sogar leicht verstärkt gegenüber der des wildtypischen Promotors, konnte dabei für den 72-Stundenwert jedoch nicht exakt ermittelt werden (Abbildung 34, Δ NF- κ B, hellgrauer Balken). Zu diesem Zeitpunkt lag die Phosphatasekonzentration nicht mehr eindeutig über dem unteren Messlimit. Die Phosphataseexpressionen der vorherigen Infektionszeitpunkte ließ zwar die Vermutung zu, dass die Reduktion nach 72 Stunden ein Maximum erreichte, dieses konnte aus zuvor beschriebenen Gründen aber nicht eindeutig durch eine Messung belegt werden.

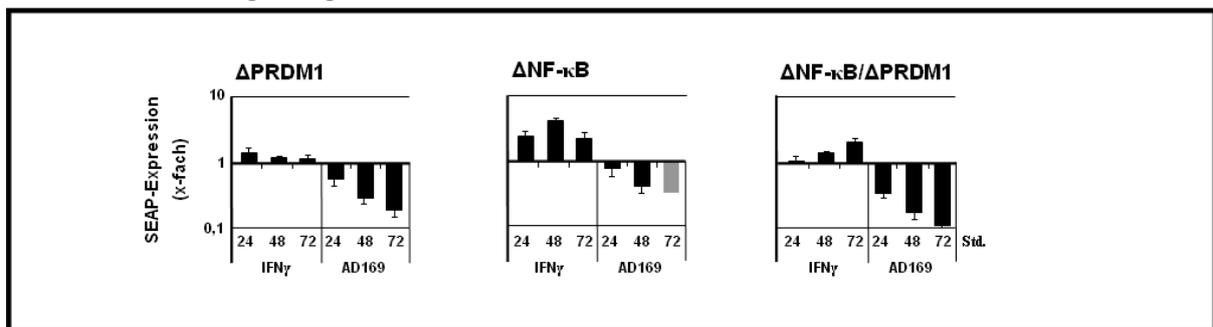


Abbildung 34: Expression des Δ PRDM1-, Δ NF- κ B- und Δ PRDM1/ Δ NF- κ B-Tapasinpromotors in infizierten und IFN γ -stimulierten MRC-5 Fibroblasten. Transduzierte Reportergene unter der Kontrolle von Tapasinpromotor-Deletionsmutanten (Δ PRDM1, Δ NF- κ B und Δ PRDM1/ Δ NF- κ B) in MRC-5 Fibroblasten wurden kontrollbehandelt, IFN γ (500 U/mL) stimuliert sowie HCMV-infiziert. Die Phosphataseexpression wurde zu den angegebenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 Stunden) als Akkumulation gemessen. Messungen aus drei unabhängigen Experimenten wurden verrechnet. Die Ergebnisse sind als x-fach gegenüber den mock-Werten zu den jeweiligen Zeitpunkten dargestellt. Der Wert des Δ NF- κ B-Tapasinpromotors nach 72 Stunden Infektion (hellgrau) stellt einen Minimalwert da. Auf Grund des unteren Messlimits in diesen Experimenten konnte keine weitere Reduktion nachgewiesen werden.

Die Expression der Doppelmutante (Δ PRDM1/ Δ NF- κ B-Tapasinpromotor) war etwa doppelt so stark, wie die der PRDM1-Mutante und zeigte nach der Induktion durch IFN γ ein intermediäres Ergebnis aus beiden Einzelmutanten (Abbildung 34 Δ PRDM1/ Δ NF- κ B). Dieses kann erneut mit dem folgenden Modell (3.9) erklärt werden. Die stärkste aller gemessenen Reduktionen eines Tapasinpromotors (während der Infektion) ergab sich für diese Doppelmutante. Dieses verdeutlichte anschaulich, dass die beiden putativ regulatorischen Elemente nicht für die Reduktion in der Infektion verantwortlich zeichneten.

Zusammenfassend ließ sich mit dem stabilen Reporterassay feststellen, dass weder die beschriebene NF- κ B- noch die PRDM1-Bindestelle für die Inhibition des Tapasinpromotors

Ergebnisse

verantwortlich ist. Beide Bindestellen waren auf Grund ihrer Lage im Tapasinpromotor sowie Publikationen zu ihren Effekten (Doody, Stephenson *et al.* 2007, Zhong, May *et al.* 2002) zwischenzeitlich zu vielversprechenden Kandidaten geworden.

Schlussendlich konnte mittels des stabilen Reporterassays die Sequenz, verantwortlich für die Inhibition des Tapasinpromotors, auf 29 Nukleotide eingengenommen werden. In Kombination mit den Ergebnissen und der Analyse der darin vorgefundenen NF- κ B-Bindestelle gilt eine benachbarte Mzf1-Bindestelle als wahrscheinlichste, negativ regulatorische Sequenz. Diese Hypothese erhält durch eine aktuelle Publikation Unterstützung, welche in der Maus Mzf1-Bindestellen als einen negativ regulatorischen Faktor in HCMV-infizierten Zellen nachweist (Marcinowski, Lidschreiber *et al.* 2012). Eine Analyse mittels gezielter Punktmutationen der Mzf1-Bindestelle im Tapasinpromotor könnte Aufschluss darüber geben, ob HCMV tatsächlich über das Mzf1-Protein den Tapasinpromotor reguliert.

3 Diskussion

Das humane Cytomegalovirus interferiert in vielfältiger Weise mit dem Immunsystem. Dieses geschieht sowohl auf Ebene der angeborenen als auch auf der der adaptiven Immunität. Eine Strategie der Immunevasion, genauer die Modulation der angepassten Immunantwort mittels negativer Regulation der Antigenpräsentation über die Tapasintranskription ist der Kernpunkt der vorliegenden Arbeit.

3.1 Tapasin als Ziel zur Manipulation der Antigenpräsentation

Tapasin zum Angriffsziel zu machen, um so die MHC Klasse I Antigenpräsentation zu regulieren, ist eine erfolgversprechende Strategie für HCMV (Hengel, Brune *et al.* 1998). Die essenzielle Funktion von Tapasin bei der Stabilisierung, also der Lebensdauer der MHC Klasse I Komplexe an der Zelloberfläche, wurde bereits 2000 gezeigt (Barnden, Purcell *et al.* 2000). So konnte eine spezifische Variante des *Bare lymphocyte syndrom* vom Typ I (BLS I) auf die Abwesenheit von Tapasin zurückgeführt werden, bei welcher die MHC Klasse I-vermittelte Immunantwort nur noch inadäquat funktionieren kann (Yabe, Kawamura *et al.* 2002). Auch die Analyse diverser Tumoren, welche die MHC Klasse I Antigenpräsentation unterdrücken und damit der Erkennung durch das Immunsystem entgehen, zeigte, dass die Regulation von Tapasin ein Mittel ist, dieses zu erreichen (Dissemond, Kothen *et al.* 2003).

Dass HCMV die MHC Klasse I Antigenpräsentation auf multiple Weisen beeinflusst und (wie Tumoren) einen Mechanismus zur Inhibition von Tapasin (bzw. der optimalen Beladung Tapasin-abhängiger MHC Allele) entwickelt haben könnte, ist bereits beschrieben (Ahn, Angulo *et al.* 1996, Jones, Wiertz *et al.* 1996, Park, Kim *et al.* 2004). Teils in Vorarbeiten, aber auch im Rahmen dieser Arbeit, wurde der veränderte Aufbau des Peptidbeladungskomplexes (PLC) während der Infektion, beginnend mit einer verminderten Menge an MHC Klasse I Molekülen im PLC, gezeigt. Weiterhin ergab sich eine reduzierte *de novo* Synthese von Tapasinproteinen bereits 24 Stunden nach Infektion. Schlussfolgernd aus dieser frühen Reduktion auf Proteinebene wurde die mRNA von Tapasin untersucht. In eigenen Vorarbeiten ergab sich mittels Northernblot Analyse, ähnlich zu der Protein Analyse, eine Reduktion der mRNA Menge ab 24 Stunden nach Infektion.

Diskussion

Zur weiteren Analyse dieses Phänotyps wurde die quantitative PCR genutzt, um ein noch detailliertes Ergebnis zu erhalten. So konnte schließlich die beobachtete Reduktion der Proteinmenge durch die verminderte Mengen von mRNA erklärt werden (Halenius, Hauka *et al.* 2011). Zusätzlich war die frühe Regulation (24 h.p.i. bzw. Std.n.I.) der Tapasin-mRNA reproduziert worden, während sich die mRNA-Mengen in der sehr frühen Phase der Infektion (1-8 h.p.i.) weitgehend unverändert zeigten. Dieses blieb wie erwähnt innerhalb der ersten 8 Stunden der Infektion exklusiv, im Verlauf der Infektion (24-72 Stunden) reduzierte sich die Tapasin-mRNA-Menge rapide. So entstand die Frage, ob diese Regulation spezifisch und einzig für dieses MHC I Chaperon war oder eine allgemeine Regulation der Komponenten des Antigenpräsentationsweges vorlag.

Um dies zu untersuchen, wurden die im Folgenden beschriebenen PLC-Bestandteile auf der Ebene der RNA analysiert. Für die MHC Klasse I Moleküle (und damit die der HLA-B Allele) ist es bekannt, dass die Degradation ausschließlich auf Proteinebene, ohne negative Beeinflussung der Transkription stattfindet (Ahn, Angulo *et al.* 1996, Jones, Wiertz *et al.* 1996, Park, Kim *et al.* 2004). Zusammen mit Proteindaten einer HCMV-Mutante, welche die degradierenden Genprodukte US2 und US3 (sowie US11) nicht exprimiert, war daher eine erhöhte Transkriptmenge für HLA-B erwartet worden (Halenius, Hauka *et al.* 2011). Tatsächlich war sowohl die HLA-B als auch die beta-2-Mikroglobulin (β_2m) Transkriptmenge während der Infektion induziert, mit einer stärkeren Induktion für β_2m (Abbildung 4). Diese beiden Komponenten sind folglich differenziell zu Tapasin reguliert.

Verglichen mit den beiden TAP-Transporter Untereinheiten TAP1 und TAP2 ergaben sich bezogen auf Tapasin zwei generelle Unterschiede:

- 1) Sowohl TAP1 als auch TAP2 hatten in der frühen Infektion sehr stark induzierte Transkriptmengen. Erst 48 Stunden nach Infektion fielen diese ab und TAP1 blieb knapp oberhalb der mock-Rate, während TAP2 geringfügig unterhalb dieser sank.
- 2) Nach 72 Stunden hatten sowohl TAP1 als auch TAP2 offenbar das Tal der geringen mRNA Konzentration durchschritten und die Mengen stiegen wieder an. Dagegen war Tapasin im Vergleich zur mock-Rate deutlich reduziert und im Besonderen zu den weiteren Komponenten des PLC selektiv reguliert.

Mit Blick auf die zuvor erwähnte Optimierung der Antigenpräsentation durch Tapasin (Barnden, Purcell *et al.* 2000, Dissemond, Kothen *et al.* 2003, Yabe, Kawamura *et al.* 2002), ergibt sich das folgende Modell: Um die bereits zum Infektionsbeginn vorhandenen Tapasinmoleküle kontrollieren bzw. die MHC Moleküle im ER arretieren zu können, exprimiert HCMV zu *immediate early* (IE) Infektionszeiten US3 (Park, Kim *et al.* 2004). Die

kurze Expressionszeit und Halbwertszeit von US3 ergibt jedoch ein großes Zeitfenster (*early/late*, E/L, ca. 12-72 Stunden nach Infektion) in dem eine Tapasinfunktion ohne weitere inhibitorische Mechanismen möglich wäre. Durch die hier beschriebene reduzierte RNA-Menge von Tapasin ist es aber vorstellbar, dass HCMV zusätzlich zu US3 einen weiteren Angriff auf die Optimierung der MHC Klasse I Peptidbeladung ausübt, allerdings erst zu späten Zeitpunkten (L), da sowohl die Tapasin-mRNA als auch das Protein eine lange Halbwertszeit besitzen (Halenius, Hauka *et al.* 2011). Für das letzte noch offene Fenster (E, früh) der HCMV-Regulation würde eine dritte, unbekannte posttranskriptionelle Regulation passen, die auch einen weiteren beobachteten Phänotyp erklären könnte:

In HCMV-infizierten Zellen ist die Menge an MHC Klasse I Molekülen durch die zuvor erwähnten US-Genprodukte drastisch reduziert (Ahn, Angulo *et al.* 1996, Hengel, Koopmann *et al.* 1997, Hewitt, Gupta *et al.* 2001, Jones, Wiertz *et al.* 1996, Park, Kim *et al.* 2004). In Zellen, welche mit der HCMV Deletionsmutante deltaUS2-6 infiziert wurden, liegen die MHC Klasse I Moleküle dagegen in nahezu mock-Mengen vor. Wird in diesen Zellen zudem Tapasin überexprimiert, kommt es dennoch nicht zu einer Wiederherstellung der MHC Klasse I Moleküle im PLC. Diese fehlende Wiederherstellung des PLCs in Tapasin überexprimierenden Zellen, infiziert mit der Deletionsmutante deltaUS2-6, kann nur durch einen weiteren oder mehrere weitere HCMV-exprimierte/induzierte Inhibitoren erklärt werden (Halenius, Hauka *et al.* 2011).

3.2 Die Tapasin-mRNA selbst ist kein Ziel von HCMV

Die stark reduzierte *de novo* Synthese von Tapasin ist auf die reduzierten mRNA-Mengen von Tapasin zurückzuführen. Doch wie wird diese Reduktion durch HCMV erreicht?

Ein maßgeblicher Faktor, der die Gesamtmenge einer bestimmten mRNA beeinflussen kann, ist die Stabilität eines Transkriptes. Diese Stabilität könnte durch den Einfluss einer viral induzierten oder gar viral transkribierten miRNA verändert werden. Abhängig ist eine solche Regulation von der Länge des 3'UTRs und damit der Anzahl möglicher Bindestellen für eine miRNA. Im Falle von Tapasin ist das 3'UTR überdurchschnittlich lang. Das annotierte Poly-Adenylierungssignal liegt etwa 2.000 Basenpaare entfernt (die durchschnittliche Länge humaner mRNAs liegt bei ca. 1.000 Nukleotiden) (Pesole, Mignone *et al.* 2001)). HCMV transkribiert nicht nur selbst (unter Herpesviren konservierte) miRNAs (Grey, Meyers *et al.* 2007, Stern-Ginossar, Elefant *et al.* 2007, Stern-Ginossar, Saleh *et al.* 2009), sondern kann

ebenfalls humane miRNAs in ihrer Transkription regulieren (Wang, Weber *et al.* 2008). Unlängst wurde beschrieben, dass diese viralen miRNAs gezielt zur Regulation des humanen Immunsystems genutzt werden (Dölken and Jonjic 2009, Nachmani, Stern-Ginossar *et al.* 2009) und somit eine Interferenz mit dem Tapasintranskript erlauben könnten. Wie bereits gezeigt, ist die mRNA-Menge von Tapasin während der Infektion reduziert. Dieses schließt (für diesen Phänotypen) bereits die Interaktion einer nicht-degradierenden miRNA aus, da diese zwar über die posttranskriptionelle Regulation zu einer Expressionsregulation führen, nicht aber die mRNA-Menge senken würde (Parker and Sheth 2007). Bei der Untersuchung von vermeintlichen miRNA-Genen von HCMV, die nach Vorhersagen unseres Kooperationspartners Ofer Mandelboim (*The Hebrew University of Jerusalem*, Jerusalem, Israel) Transkripte der PLC-Proteine, darunter das Tapasintranskript, als Ziel haben könnten, war von uns ebenfalls kein Effekt auf die Proteinexpression von Tapasin feststellbar. Um einen generellen Einfluss auf den PLC sowie Effekte auf alle PLC-Proteine durch diese viralen miRNA-Gene zu untersuchen, wurde zunächst eine Proteinanalyse durchgeführt. Der direkte Effekt aller (bekannten und unbekanntenen) miRNAs auf das Transkript wurde mittels der Untersuchung der Halbwertszeit der Tapasin-mRNA parallel ebenfalls untersucht. Doch zuvor eine kurze Exkursion von den regulatorischen RNAs zu den RNA-regulatorischen Proteinen.

Nicht nur miRNAs können einen Einfluss auf das Transkript haben, sondern auch sogenannte Adenosin und Uridin bindende Proteine (ARE-BPs, für *A+U rich element-binding proteins*) und die damit verbundene Kernkonsensussequenz von AUUUA bestimmen das Schicksal der mRNA (Barreau, Paillard *et al.* 2005, Gruber, Fallmann *et al.* 2011). Ursprünglich wurden ARE-BPs in zwei unabhängigen Studien beschrieben. Zum einen im Zusammenhang mit der Degradation der c-FOS-mRNA (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*), zum anderen, als das Auftreten der oben genannten Kernkonsensussequenz in Cytokin mRNAs beschrieben wurde. In diesen ersten Studien wurde den ARE-bindenden Proteinen (*ARE-binding protein*) zunächst eine degradierende Wirkung zugeschrieben (Caput, Beutler *et al.* 1986, Treisman 1985). So wurde davon ausgegangen, dass AREs bei mRNAs mit kurzen Halbwertszeiten den Abbau der mRNA über eine Deadenylierung des PolyA-Schwanzes vermitteln (Chen and Shyu 1995). Zwischenzeitlich ist diese allgemeine Regulation relativiert worden, da nach und nach weitere ARE-BPs mit differenzieller Wirkung gefunden wurden (Barreau, Paillard *et al.* 2005). So wirkt etwa die HuR (*human antigen R*, oder *embryonic lethal abnormal vision-like protein 1* (Elavl1)) Protein-Bindung komplementär zur

ursprünglichen Funktion stabilisierend, etwa für die NOS (*nitric-oxide synthase*) II-mRNA (Rodriguez-Pascual, Hausding *et al.* 2000).

Übertragen auf Tapasin ergaben sich daraus zwei interessante Theorien:

1) 66 Nukleotide hinter dem STOP-Codon befindet sich ein alternatives Poly-Adenylierungssignal (Abbildung 7 und Appendix, Abbildung 38), dessen Nutzung zu einem verkürzten 3'UTR führen würde. Im 2.000 Basenpaar längerem 3'UTR (annotiertes Poly-Adenylierungssignal) von Tapasin werden ARE-spezifische Sequenzen vorausgesagt (Abbildung 7), welche von stabilisierenden ARE-BPs gebunden werden könnten. Es wäre denkbar, dass HCMV die Entstehung des kürzeren 3'UTRs fördern könnte, um so die stabilisierende Wirkung der ARE-BPs zu verhindern. Damit wären die reduzierten Tapasin-mRNA-Mengen während der Infektion erklärbar. Diese erste Theorie konnte jedoch durch eine PCR-Analyse mit dafür spezifischen Primern nicht bestätigt werden. Es gab zu keinem Zeitpunkt der Infektion eine erhöhte oder generell veränderte Nutzung der beiden Poly-Adenylierungssignale.

2) Die zweite Möglichkeit, die Tapasin-mRNA zu destabilisieren, wäre eine direkte Regulation der vermeintlich stabilisierenden ARE-BPs. Um dieses zusammen mit der Suche nach degradierenden miRNAs messbar zu machen, ohne dabei auf die einzelnen bekannten Proteine einzugehen, wurde die Halbwertszeit der Tapasin-mRNA in HCMV-infizierten Zellen untersucht. Dieses fand unter Zuhilfenahme des Polymerase II-Hemmers Actinomycin D statt und wurde mittels sqPCR und qPCR durchgeführt. Die Analyse zeigte, dass die Halbwertszeit während der Infektion nicht verändert war und es keinerlei Hinweise auf eine Dysregulation stabilisierender Proteine am 3'UTR des Tapasin Transkriptes gab.

Zusammenfassend blieb eine Regulation der Tapasin-mRNA-Stabilität durch (bereits translatierte/transkribierte) Proteine und/oder miRNAs während der Infektion aus. Wie bereits für die Interferenz (einer nicht-degradierenden) miRNA erwähnt, wäre im Falle einer degradierenden miRNA mit einer Reduktion der Halbwertszeit für Tapasin zu rechnen gewesen.

Interessanterweise ergab sich in der Auswertung der quantitativen PCR (Abbildung 8C) eine minimale, nicht signifikante, aber reproduzierbare Verminderung der Halbwertszeit in infizierten Zellen. Dieses könnte man als minimalen Einfluss eines RNA-destabilisierenden Faktors, der selbst durch das Actinomycin D in seiner Transkription (möglicherweise Polymerase II abhängig) gehemmt ist und somit nur noch diesen marginalen Effekt hat, deuten. Diese Regulation könnte direkt während der Transkription, noch vor der RNA-

Diskussion

Extraktion und damit „zu schnell“ für diese Messung (PCR-Auswertung) stattfinden. Um den Effekt dennoch aufzuschlüsseln, wurde das unten geschilderte Experiment durchgeführt.

Nachdem zuvor bei der Suche nach dem Ursprung der reduzierten RNA-Mengen in infizierten Zellen ausschließlich die prozessierte mRNA von Tapasin untersucht worden war, galt es anschließend die Synthese/Prozessierung zu analysieren. Der Wichtigste, im Zellkern angesiedelte, Schritt der mRNA-Maturierung ist das Spleißen. Kommt es beim Spleißen zu Fehlern, kann dieses verschiedene Konsequenzen haben. Die wahrscheinlichste und häufigste Konsequenz ist der *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), welcher von einem verfrühten STOP-Codon abhängig ist und fehlgespleißte RNAs abbaut (Maquat 2004). Kommt es beim Spleißen zu einem Fehler und verschiebt sich dadurch der Leserahmen, wird ein zu früh (also vor dem eigentlichen STOP-Codon) auftretendes STOP-Codon sehr wahrscheinlich. Die Insertion einer *in frame* (im Leserahmen) Sequenz, welche ein STOP-Codon kodiert, führt zum selben Effekt. Ein vormals als reines *Proofreading* (also Kontroll-Ablesen der mRNA) angesehener Mechanismus erkennt das Vorhandensein eines STOP-Codons *upstream* (vorgelagert) einer darauf noch folgenden Spleißstelle (Nicholson, Yepiskoposyan *et al.* 2010). Dieses ist in nicht veränderten mRNAs nicht möglich, da im letzten Exon, also nach dem letzten Spleißvorgang, das STOP-Codon kodiert liegt. So werden alle diese als unkorrekt gefundenen mRNAs durch diesen Mechanismus abgebaut. Die Funktion des NMD ist dabei von der Translationsmaschinerie abhängig. Folglich wird die Analyse der NMD durch Einsetzen von Cycloheximid ermöglicht; Cycloheximid blockiert die Translation von mRNAs und folgend auch NMD. Zwar wurde die Stabilität der Tapasin-mRNA bereits mittels Actinomycin D (Halbwertszeitbestimmung) untersucht, jedoch könnte (wie zuvor erwähnt, 2.2.6) der NMD zu schnell für die Methode ablaufen. Bei den Analysen der/des inhibierten Translation/NMD wurde im Vergleich zur Actinomycin D Behandlung ein weiterer Zeitpunkt zur Analyse eingebaut. Jedoch konnte zu keinem Zeitpunkt ein Effekt des Cycloheximids auf die reduzierten Tapasin-mRNA-Mengen ermittelt werden (Abbildung 9A). Die zur Kontrolle genutzte Analyse der Transkripte von SRSF6 und 7 belegte die Funktionalität des Cycloheximids auf den NMD. Hier wurden unter Behandlung Transkripte in der PCR nachweisbar, welche dauerhaft durch NMD abgebaut werden (Lareau, Inada *et al.* 2007, Ni, Grate *et al.* 2007).

Ein Einfluss von „zu transkribierenden miRNAs“ bzw. „zu translatierenden Proteinen“ konnte damit, wie zuvor für die bereits translatierten/transkribierten Proteine/miRNAs, ausgeschlossen werden.

3.3 NeTT – *New Tapasin Transcript*

Bei der Betrachtung des Spleißmusters des Tapasintranskriptes kam es zu keinen zusätzlichen oder fehlenden Banden (Transkriptvarianten) während der Infektion. Stattdessen konnten die Befunde eines neuen Tapasintranskriptes (*New Tapasin Transcript – NeTT*) reproduziert werden und mittels optimierten Primern eine erhöhte Transkriptmenge (Abbildung 12) für dieses Transkript während der Infektion festgestellt werden (Beutler, Hauka *et al.* 2013).

Das alternativ gespleißte Transkript besaß Eigenschaften, die die Regulation der Entstehung dieses Transkriptes und die Funktion des Proteins besonders interessant machten. Durch Verlust des dritten Exons ist NeTT genau 261 Nukleotide kürzer und damit im gleichen Leserahmen wie Tapasin translatierbar. Des Weiteren fehlt die Interaktionsregion mit ERp57 (Dong, Wearsch *et al.* 2009). Die essenzielle kovalente Bindung von Tapasin an ERp57 (Dick, Bangia *et al.* 2002) ist damit für NeTT nicht möglich. Während ein Großteil des Tapasin-Proteins in NeTT erhalten bleibt, wie etwa der C-terminale Teil und damit auch der Transmembran- beziehungsweise Cytosolbereich, fehlt die Möglichkeit mit ERp57 zu interagieren. Damit einhergehend bestand die Hypothese, dass NeTT nicht nur nicht zur Stabilität des PLCs über die ERp57 Interaktion beiträgt, sondern sogar die Stabilität reduzieren kann.

Die Tatsache, dass das NeTT-Transkript zum ersten Mal in infizierten Zellen entdeckt werden konnte, warf in der Konsequenz die Frage auf, ob HCMV NeTT benutzt, um die Stabilität des PLCs sowie die Antigenpräsentation weiter zu inhibieren. Kohärent mit dieser Idee zeigte sich, dass sich das Verhältnis von NeTT/Tapasin während der Infektion zu Gunsten von NeTT verschiebt. Abhängig vom Zeitpunkt der Infektionsdauer kann der Anteil von 1% in uninfizierten auf 7,5% in infizierten Zellen ansteigen. Zudem wurde mittels IP bestätigt, dass keine bzw. nur eine geringe Interaktion zwischen NeTT und ERp57 stattfindet. Die doch minimale Interaktion ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf die Stöchiometrie des PLCs und eine indirekte Interaktion über Tapasin zurückzuführen. Im PLC wurde ein Verhältnis von einem TAP-Transporter zu je zwei Tapasinmolekülen vorgeschlagen (Beutler, Hauka *et al.* 2013, Hulpke, Tomioka *et al.* 2012, Leonhardt, Keusekotten *et al.* 2005, Panter, Jain *et al.* 2012).

Nachdem das Fehlen der essenziellen, direkten Interaktion von NeTT/ERp57 nachgewiesen war, galt es, die Auswirkung auf die MHC I Komplexe und damit die Antigenpräsentation zu testen. Ein dominant negativer Effekt auf Tapasin geht von NeTT nicht aus. Betrachtet man jedoch nur tapasinabhängige MHC Allele (in diesem Fall HLA-B*44:02), ist NeTT nicht in

der Lage, diese auf die Zelloberfläche zu bringen und reduziert in Anwesenheit von Tapasin deren Oberflächenexpression um 50% (Beutler, Hauka *et al.* 2013).

3.4 Die Entstehung von NeTT und die Rolle von hnRNP-F/H

Um die Entstehung von NeTT zu analysieren, wurden zunächst alle in der Region des dritten Exon liegenden *single nucleotide polymorphisms*, kurz SNPs sowie Nukleotidinsertionen und -deletionen betrachtet (Zusammenfassend: *simple nucleotide polymorphisms*). Würde ein Polymorphismus (oder mehrere) zu der Entstehung von NeTT führen, wäre dadurch eventuell ein Rückschluss auf die Art der Regulation, die in infizierten MRC-5 Zellen zu der Entstehung von NeTT führt, möglich. Keiner der beiden gefundenen *simple nucleotide polymorphisms* (Abbildung 14 und Appendix, Abbildung 39) kann das Entstehen von NeTT jedoch erklären. Ein weiterer gefundener seltener SNP (Appendix, Abbildung 39) mit einer Häufigkeit von 1‰ (im dort vorliegenden Screening) sorgt für die Mutation einer spleißregulatorischen Sequenz (siehe folgend) und könnte so eventuell zu einer verstärkten Transkriptionsrate für NeTT führen.

Bei der Betrachtung des Spleißakzeptors und -donors des Exon 3 zeigte sich zusätzlich zu einer geringen Stärke des Spleißdonors eine Auffälligkeit im Intronbereich des Spleißdonors. Die Stärke des Donors wurde mit dem MaxEnt Score (6.52; http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html) bestimmt und die „Stärke“ (schwach <7.0, stark >10.0) nach Hiller und Mitarbeitern festgelegt (Hiller, Zhang *et al.* 2007). Interessanterweise wurden mit Hilfe der Suchmaschine *ESRsearch* (<http://esrsearch.tau.ac.il/>) in der Intronsequenz hinter dem genannten Spleißdonor zwei mögliche Bindestellen für Spleißdonor-verstärkende Proteine gefunden. Dabei handelte es sich um zwei *G-runs*, welche von hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) der Familie F und/oder H gebunden werden können, die wiederum in vielen Fällen das alternative Spleißen regulieren (Garneau, Revil *et al.* 2005, Jablonski, Buratti *et al.* 2008, Talukdar, Sen *et al.* 2011). In dieser Konstellation, nahe dem Donor und im Intron, werden *G-runs* als ISEs (*intronic splice enhancers*) bezeichnet und können die Aktivität einer Spleißstelle um das 4-fache erhöhen (Schaub, Lopez *et al.* 2007, Xiao, Wang *et al.* 2009).

Zur Analyse der *G-runs* und deren Regulationspotenzial wurden Minigene, die das Exon 3 und die kompletten oder Teile der angrenzenden Introns 2 und 3 enthalten, generiert (2.3.6). Diese zeigten in einer ersten Untersuchung gleiche Verhältnisse von Tapasin/NeTT mRNAs,

wie sie in humanen MRC-5 Fibroblasten gefunden wurden (nicht gezeigte Daten). Das Verhältnis lag in etwa bei 1:100, also 1% NeTT pro Tapasin. Lediglich die absolute Anzahl von Tapasin- und NeTT-RNA war auf Grund des starken HCMV-Promotors (MIEP) im Minigen deutlich erhöht. Das Minigen war somit ein adäquates Mittel, um die Regulation der NeTT-Synthese zu untersuchen und spiegelte die endogenen Verhältnisse wider. Wurden die beiden *G-runs* im Intron 3 mutiert, erhöhte sich die NeTT-Proteinmenge signifikant (Abbildung 16). Die Regulation durch *G-runs* ist für NeTT damit eindeutig belegt worden. Wie zuvor erläutert, könnte die Spleißregulation durch die Bindung von hnRNP-F/H an diese *G-runs* erfolgen. Wäre HCMV in der Lage hnRNP-F/H zu regulieren, so dass der Spleißdonor nicht verstärkt wird, könnte das Virus die Transkription von NeTT fördern. Dieses würde, wie zuvor erläutert (3.3), in der Konsequenz zu einer verminderten Antigenpräsentation führen. Um dieses zu erreichen, könnte HCMV zum Beispiel die Mengen an hnRNP-F/H-Transkripten während der Infektion negativ regulieren. Deshalb wurden zunächst die RNA-Mengen beider Gene untersucht (Abbildung 17A). Im Gegensatz zu den Erwartungen waren auf RNA-Ebene beide spleißregulatorischen Proteine induziert. Dabei zeigten beide eine ähnliche Kinetik mit einem Maximum an mRNA nach 24 Stunden Infektion (Abbildung 17A). Da diese Analyse möglicherweise auftretende postranskriptionelle Effekte außer Acht lässt und zudem eine hohe Anzahl an hnRNP-F/H Varianten und Isoformen vorkommen, wurden verschiedene Transkripte, die für eine hnRNP-F/H-bedingte Regulation bekannt sind (Garneau, Revil *et al.* 2005, Lefave, Squatrito *et al.* 2011), direkt in die Analyse eingeschlossen. Tatsächlich waren die erhaltenen Ergebnisse stimmig mit den induzierten Mengen an hnRNP-F/H Transkripten während der HCMV Infektion. Die Analyse der Verhältnisse von Bcl-x_L und Bcl-x_S zeigte eine erhöhte Konzentration der pro-apoptotischen (Bcl-x_S) Variante von Bcl-x, welche durch hnRNP-F/H Bindung entsteht.

Das IG20 Transkript, welches das pro-apoptotische *death-domain adaptor protein Insuloma-Glucagonoma protein 20* kodiert, kann ebenfalls durch den Einfluss und die Bindung von hnRNP-H alternativ gespleißt werden und das anti-apoptotische *MAP-kinase activating death domain protein* (MADD/DENN) kodieren (Lefave, Squatrito *et al.* 2011). In der Infektionskinetik verschob sich für diese beiden Transkripte das Verhältnis zu Gunsten des anti-apoptotischen (Abbildung 17B). Aus der Sicht von HCMV könnte diese Regulation von Vorteil sein, da so die Apoptoseinduktion vermindert wird und die Virusreplikation erhalten werden kann. Jedoch bleibt gleichzeitig die Induktion der pro-apoptotischen Bcl-x-Variante. Über die erhöhten Transkriptmengen von hnRNP-F/H scheint somit eine, hier nicht eindeutig zu klärende, Beeinflussung der Apoptose möglich.

NeTT kann durch die hnRNP-F/H-Bindung (bei normaler Expression) entstehen, doch scheint dieses nicht der Grund zu sein, warum NeTT im Verhältnis zu Tapasin während der Infektion in erhöhtem Maße vorliegt. Die Frage, wie es zu diesen erhöhten NeTT-Mengen kommt, bleibt abschließend noch offen und bedarf eventuell der Analyse weiterer spleißregulatorischer Sequenzen der prä-mRNA.

Wie oben beschrieben, korrelieren die Verhältnisse der endogenen und exogenen/transienten Transkriptmengen von Tapasin/NeTT stark. Da weiterhin die umgebenden Intronsequenzen, also Intron 2 und jeweils die flankierenden 200 Nukleotide von Intron 3, im Minigen vorhanden sind, bleibt die aus dem Intron 3 ausgeschnittene ca. 7 kB große Sequenz als möglicherweise regulatorischer Bereich (während der Infektion). Auch das artifizielle 3'UTR und das Poly-Adenylierungssignal des Minigens können zu einem veränderten, alternativen Spleißen beitragen (Lutz and Moreira 2011, Proudfoot 2011). Eine kombinierte Regulation dieser Faktoren könnte eine mögliche Erklärung bieten, wie es in infizierten Zellen zum verstärkten alternativen Spleißen von NeTT kommen kann. Eine Minigen-Analyse mit der Kombination aus natürlichen 3'UTRs und der 7 kB Intronsequenz könnte die Regulation während der Infektion entschlüsseln.

3.5 Repression des Tapasinpromotors während der HCMV-Infektion

Wie zuvor diskutiert, konnten als Ursache der reduzierten Tapasin-mRNA Menge in infizierten Zellen bereits verschiedene Regulationsmöglichkeiten ausgeschlossen werden. So etwa die Nutzung eines alternativen Poly-Adenylierungssignals und damit eines verkürzten 3'UTRs sowie ein verändertes Spleißen und ein Abbau durch NMD. Weiterhin wurden keine Anzeichen für die Regulation der mRNA-Halbwertszeit oder eine miRNA-Interferenz gefunden.

In der Konsequenz blieb eine weitere Möglichkeit; die Repression des Promotors. Um diese möglichst genau und zunächst im endogenen Kontext zu analysieren, wurde sich der Methode der biosynthetischen RNA-Markierung bedient (Dolken, Ruzsics *et al.* 2008). Diese ermöglicht es, im Gegensatz zur Betrachtung der Gesamt-RNA Menge, in einem wählbaren Zeitfenster ausschließlich neusynthetisierte RNA zu analysieren. Dabei ergibt sich ähnlich einer Reporteranalyse die Möglichkeit, eine Aussage über die Transkriptionsrate eines Gens zu treffen, dieses aber endogen und nicht im ektopischen System. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der verhältnismäßig kurzen Zeit der Behandlung, so dass eine Kinetik mit

Diskussion

Zeitfenster von einer Stunde möglich ist. Wie aus der Analyse der Gesamt-RNA abgeleitet (Abbildung 4), schien es sich bei der Repression um eine frühe Regulation zu handeln und entsprechend galt es, diesen Zeitpunkt zwischen 1 und 24 Stunden nach Infektion genauer zu betrachten. Zusammen mit der Analyse der neusynthetisierten RNA in der qPCR ergibt sich eine Methode zur Analyse der Promotoraktivität, im Folgenden Transkriptionsrate bezeichnet. Diese lässt zusammen mit den vorherigen Analysen eine Aussage über die Promotoraktivität von Tapasin zu. Denn erst die Voranalysen ließen ausschließen, dass sich weitere Faktoren auf die analysierte Neusynthese auswirken.

Die hohe Sensitivität dieser Methode erlaubte nicht nur detaillierte Ergebnisse der Transkriptionsrate, sondern wurde ebenfalls zur diffizilen Bestimmung des Einflusses der Infektionsdosis auf die Promotoraktivitäten genutzt (2.4.3). So konnten die einzelnen Unterschiede in der Regulation bei stetig steigender Infektionsdosis (MOI) in der qPCR 6 Stunden (MOI 0,8 bis 10) beziehungsweise 24 Stunden (MOI 0,1 bis 10) nach Infektion nachgewiesen werden.

Tatsächlich ergab sich auch auf der Ebene der Neusynthese eine selektive Regulation von Tapasin. Dieses wird in zwei Wellen, einmal früh und einmal spät in der Infektion, deutlich. Vergleicht man die Transkriptionsraten von Tapasin mit der von TAP1 und TAP2, wird zu frühen Zeitpunkten der Unterschied zwischen Tapasin und TAP2 zu TAP1 erkennbar. Im Gegensatz zu TAP1 waren TAP2 und Tapasin nur marginal induziert und scheinen generell eine andere (die Induktion und damit mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen betreffend) Promotorkonstitution zu besitzen. Startend 24 Stunden nach Infektion und folgend für die restliche Infektionsdauer war die Transkriptionsrate von Tapasin stark reduziert und damit auch gegenüber TAP2 differenziell. In der frühen Infektion fehlt dem Tapasin wie auch dem TAP2 Promotor die Möglichkeit, induziert zu werden. Es scheint naheliegend, dass eine eventuelle Ähnlichkeit der Transkriptionsfaktor-Bindestellen in beiden Promotoren vorliegt und einen Ursprung für diese Regulation anzeigen könnte. Tatsächlich ergab sich eine ähnliche Konstitution am 3'Ende der Promotoren. Dort finden sich überlappend Bindesequenzen (beziehungsweise Elemente) für: IRF-1/2 (*interferon regulatory factor-1/2*), ISRE (*Interferon stimulated response element*) und PRDM1 (*PR domain containing 1*). Wie bereits in eigenen Vorarbeiten gefunden sowie mittels neuer Methodik (stabiles Reportergenassay, Abbildung 29) verifiziert, ist eine Regulation des Tapasinpromotors durch PRDM1 während der Infektion jedoch unwahrscheinlich. Eine ausschließlich sehr frühe Regulation durch PRDM1, welche für die verminderte Induktion verantwortlich zeichnen könnte, war ebenfalls nicht nachweisbar. Auch scheint die Möglichkeit, dass die geringe

Diskussion

Induktion einer Art frühen Repression gleichkommt, gerade durch den Vergleich mit dem Verlauf der TAP2 (dort fehlt die spätere Repression) Transkription, nicht gegeben. Eine Repression des Promotors während der Infektion, also eine geringere Transkriptionsrate als in nicht-infizierten Zellen zu späteren Zeitpunkten, ist ausschließlich für Tapasin gegeben. Nach Analyse aller gezeigten Bestandteile des PLCs (Abbildung 20) bestätigte sich die selektive Regulation von Tapasin (Halenius, Hauka *et al.* 2011).

Diese unterschiedliche Regulation überrascht bei einem Blick auf die genomische Situation der PLC-Komponenten nur wenig. Tapasin gehört dem erweiterten MHC Klasse II-Lokus an und liegt in großer Entfernung zu den MHC Klasse I Genen (wie etwa HLA-B), aber auch die Distanz zu den MHC Klasse II Genen (TAP1/2) ist groß (Horton, Wilming *et al.* 2004). Interessanterweise kann die Expression eines Clusters mehrerer MHC Klasse II-Gene (ohne Tapasin) gezielt durch nur einen Transkriptionsfaktor (*CIITA*, *class II major histocompatibility complex transactivator*) kontrolliert werden (Steimle, Siegrist *et al.* 1994). So wäre es denkbar, dass es auch in dem hier betrachteten Teil des erweiterten MHC Klasse II-Lokus zu einer solchen Regulation eines Clusters (von Tapasin und seinen genomischen Nachbargenen) kommt. Nachweislich bilden dort zusammen mit Tapasin sieben Gene ein Cluster (Herberg, Beck *et al.* 1998). Auf Grund von zwei direkten Nachbargenen Tapasins scheint besonders für HCMV eine gemeinschaftliche negative Regulation dieses Clusters interessant. *Downstream* und in gleicher Orientierung wie Tapasin ist Rgl2 kodiert (*ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 2*). Diesem Protein der Familie der kleinen GTPasen wurde nicht nur eine Rolle in Tumoren zugeordnet, sondern es wird auch als Teil der Signalkaskade zur Immunantwort viraler Infektionen diskutiert (Hershkovitz, Gross *et al.* 2011). Eine gemeinschaftliche (negative) Regulation von Tapasin und Rgl2 könnte dementsprechend zu einer *Win-Win*-Situation für HCMV führen. Dieses konnten die Daten der Gesamt-RNA und/oder Neusynthese von RNA allerdings nicht bestätigen, stattdessen war der Promotor von Rgl2 im Verlauf der Infektion immer stärker aktiv (Abbildung 23). Ein weiterer Nachbar ist Daxx (*death-domain associated protein*), welcher (als Protein) die Aktivität des HCMV IE-Promotor (MIEP) reduzieren kann und von HCMV selbst degradiert wird (Cantrell and Bresnahan 2005, Hwang and Kalejta 2007, Preston and Nicholl 2006, Saffert and Kalejta 2006, Woodhall, Groves *et al.* 2006). Um beide Proteine, Tapasin und Daxx, mit ihren antiviralen Funktionen in ihrer Expression negativ zu beeinflussen, würde auch hier eine gemeinsame Regulation auf Transkriptionsebene Sinn ergeben, aber auch bei Daxx, welches in selber Orientierung *upstream* von Tapasin kodiert ist, liegt keine korrelierende Transkriptionsrate vor. Daxx war während der Infektion stabil transkribiert und

Diskussion

zeigte in der Transkriptionsrate nahezu keinen Unterschied zu der des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Ein weiteres Haushaltsgen, das ribosomale Protein 18S (Rps18), liegt ebenfalls in direkter Nachbarschaft von Tapasin, *downstream* und in umgekehrter Orientierung kodiert. Die mutmaßliche Interaktion mit der Initiation der Translationsmaschinerie (nach <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6222>) ließ eine Regulation während der Infektion unwahrscheinlich erscheinen. Tatsächlich war die Transkriptionsrate während der Infektion konstant. Schlussendlich zeigt sich für die genomische Umgebung, genauso wie für die Gruppe der PLC-Proteine, eine deutlich selektive Regulation von Tapasin während der HCMV-Infektion. Diese selektive Regulation von Tapasin auf transkriptioneller Ebene konnte für HCMV zum ersten Mal gezeigt werden (Halenius, Hauka *et al.* 2011).

Einen weiteren Faktor für die Transkriptionsregulation bildet der Zustand des Chromatins am Promotor. Ist das Chromatin „geöffnet“ (etwa acetyliert) können dort leicht Transkriptionsfaktoren binden und regulativ aktiv werden. Die beste Methode, dieses zu untersuchen, ist die Chromatin-Immunpräzipitation, kurz ChIP. Hier dient wiederum die Acetylierung des Histon 3 (H3, Lysin 9) als sicheres Zeichen für geöffnete Chromatinstrukturen in denen Transkriptionsfaktoren binden können (Mizzen and Allis 1998). In der Immunpräzipitation des Tapasinpromotors ergab sich eine stetige H3-Acetylierung und zeigte damit die Zugänglichkeit des Tapasinpromotors für Transkriptionsfaktoren an (Abbildung 25). Die Acetylierung konnte ebenfalls für das TAP1 und HLA-B Gen beobachtet werden (nicht gezeigt).

Dieser Phänotyp könnte mit Publikationen einhergehen, nach denen eine starke Acetylierung HCMV-Genom-gebundener Histone zwischen 24 und 72 Stunden nach Infektion beobachtet wurde (Cuevas-Bennett and Shenk 2008) und eröffnet folgende Theorie. Würde die induzierte Acetylierung generell auch für zelluläres Chromatin (wie hier teilweise gefunden) erfolgen, müsste HCMV stark in die Kontrolle des Chromatin-Zustandes eingreifen. Der Grund für eine solche HCMV-Regulation könnte in der Notwendigkeit liegen, die Methylierung und damit transkriptionelle Stilllegung des HCMV-Genoms zu unterbinden (Murphy, Fischle *et al.* 2002). Denn schon länger galt eine Methylierung von Histonen als eine erste „Immunantwort“ gegen fremde DNA (Doerfler 1991). Im Falle von HCMV könnte diese Modulation jedoch nicht nur für die Transkription wichtig sein, es ist wahrscheinlich, dass das Verpacken der viralen DNA ebenfalls ein offenes, mit acetylierten Histonen verknüpftes Genom benötigt (Cuevas-Bennett and Shenk 2008). Auf Grund der essenziellen Hyperacetylierung der Histone am HCMV Genom und damit zwangsläufig auch zellulären Histonen (welches während der

Diskussion

Infektionskinetik detektiert wurde) wird es umso deutlicher, dass damit andere Regulationen notwendig würden. Aktives Chromatin an immunrelevanten Genen und ihren Promotoren könnte HCMV durch die aktive Repression der Transkription ausgleichen.

Dieses gilt zwangsläufig auch für den Tapasinpromotor. Dass dieses HCMV dort tatsächlich gelingt, zeigen die Daten der RNA-Polymerase ChIP nach 72 Stunden Infektion (dort war nahezu keine Polymerase nachweisbar, obwohl eine maximale Histonacetylierung erreicht war (Abbildung 25 und 26)) und die stark reduzierte Transkriptionsrate (Abbildung 20). Eine geringe Induzierbarkeit war dagegen etwa für die positiven Stimuli wie TNF α , IFN γ oder UV-inaktiviertes Virus erkennbar. Wie bereits durch die Neusyntheserate begründet, zeigen sich zwei Regulationen am Tapasinpromotor. Eine marginale Induktion in der sehr frühen Infektion (4 Stunden) sowie der folgende Abfall nach 8 Stunden waren hier (ChIP) reproduzierbar (Abbildung 26).

Die mock-ähnlichen Polymerase II Konzentrationen nach 24 und 48 Stunden könnten von pausierender, also nicht aktiver Polymerase herzurühren. Eine solche Pause rückt aktuell immer weiter in den Fokus von Promotoruntersuchungen und der Transkriptionsregulation (Adelman and Lis 2012). Da diese Polymerase also nicht zwangsläufig gleichbedeutend mit einer aktiven Transkription ist, könnte die Präzipitation (ChIP) eine reduzierte Transkriptionsaktivität auf Grund einer Polymerase-Pausierung anzeigen.

Die geringe bis teilweise nicht nachweisbare Präzipitation von acetyliertem H3 und Polymerase II an promotorfernen Exon-/Intronbereichen war erwartet worden. Wie die gesammelten *High-throughput* Daten verschiedenster ChIP-Sequenzierungs Analysen in der Sammlung des *Genome Browsers* der *University of California Santa Cruz* (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) zeigen, ist in diesen Bereichen eine Präzipitation von acetylierten Histonen nicht und für die Polymerase II nur minimal möglich (Appendix, Abbildung 46 und 48) (Lee and Shilatifard 2007). Die Problematik, die Polymerase II in promotorfernen Genbereichen zu präzipitieren, ist aus verschiedenen anderen Genen bekannt und in den ausgewählten Publikationen exemplarisch für verschiedene Zelllinien und Methoden gezeigt (Fullwood, Han *et al.* 2010, Fullwood, Liu *et al.* 2009, Johnson, Mortazavi *et al.* 2007, Li, Fullwood *et al.* 2010).

3.6 Der Tapasinpromotor und HCMV-vermittelte Transaktivierungen

Nachdem die Analyse der RNA-Neusynthese eine Inhibition der Transkription von Tapasin in HCMV-infizierten Zellen eindeutig gezeigt hatte und, wie oben beschrieben, die Chromatinstruktur am Tapasinpromotor während der HCMV-Infektion die Bindung von Transkriptionsfaktoren unterstützt, lag die Vermutung nah, dass während der HCMV-Infektion;

- 1) ein negativer Faktor an eine Sequenz des Tapasinpromotors dirigiert wird oder
- 2) ein bereits an eine Sequenz des Tapasinpromotors gebundener, positiver Faktor während der Infektion negativ beeinflusst wird.

Um den genauen Ort (die Zielsequenz) der HCMV-Inhibition zu finden, wurden die 785 Nukleotide vor dem Tapasin-ATG in einem stabilen Reporterassay untersucht (in Anlehnung an die von Herrmann und Mitarbeitern festgelegte Länge des murinen Tapasinpromotors (Herrmann, Trowsdale *et al.* 2003)).

Zur Analyse der Funktionalität des Promotors und um die oben genannte Sequenz enger einzugrenzen, wurden 5'- und 3'-Verkürzungsmutanten konstruiert, denen so sukzessive Transkriptionsfaktor-Bindestellen entfernt wurden. Die sezernierte alkalische Phosphatase diente als Reporter und ermöglichte es nach Transfektion und Überinfektion eine fortlaufende Infektionskinetik zu messen. Bei ersten Versuchen (siehe 2.2, bezüglich eigener Vorarbeiten) und deren Reproduktion (Abbildung 28) ergab sich auf Grund einer starken Transaktivierung der Reporterplasmide während der Infektion die Überlegung, den zuvor transient durchgeführten Assay zu modifizieren, zwecks Etablierung eines Assays mit stabil integriertem Reporter. Besonders in Anbetracht der zuvor geführten Diskussion zur H3-Acetylierung während der HCMV-Infektion ließen eigene Beobachtung darauf schließen, dass die Expression von ektopischen Plasmiden in primären Fibroblasten durch einen intrinsischen Abwehrmechanismus (möglicherweise durch Histon-Verknüpfung und -Methylierung (Riu, Chen *et al.* 2007)) inhibiert wird. Durch die HCMV-Infektion scheint dieser Effekt nicht mehr aufzutreten und eine sehr starke Induktion der ektopischen Expression konnte detektiert werden. Alle bisher untersuchten Sequenzen waren durch die Infektion induziert worden (Abbildung 28). Daher sollte ein Reporterassay etabliert werden, welcher nicht als ektopisch oder fremd von der Zelle betrachtet wird, sondern im Genom integriert ist und zusätzlich eine physiologischere „Reporterendosis“ ermöglicht als ein transientes System.

3.7 Ein stabil integrierter Reporterassay

Im Rahmen der Planung der lentiviralen Transduktion wurde der Reporterassay noch weiter verändert (Abbildung 29). Im transienten System wurde mittels der Kotransfektion eines Luciferasevektors (inklusive Kontrollpromotor) zum Ende des Experimentes die Transfektionseffizienz bestimmt und musste gegebenenfalls verrechnet werden. Eine Kontrolltransduktion oder eine Effizienzkontrolle mittels eGFP (*enhanced green fluorescence protein*) wurde im stabilen System durch die Nutzung eines Selektionsmarkers umgangen. Dazu diente die cDNA der *Puromycin N-Acetyltransferase* (fortan PuroR für Puromycin Resistenzgen), welche autark vom eigentlichen Reportersystem exprimiert wird. Dies wurde durch die eigens entwickelte GIP-Kassette (GAPDH-Promotor, IRES (*internal ribosomal entry site*) und PuroR), die abwärts des Reportersystems kodiert liegt, erreicht. Der GAPDH-Promotor sorgt für eine stabile Transkription des PuroR-Gens, unabhängig von der Stärke des zu untersuchenden Promotors. Vorteilhafterweise ist so auch die Kontrolle gegen ein Reporterassay ohne Promotorsequenz möglich. Ein zusätzlicher Benefit der so erhaltenen polyklonalen Zellkultur bildet die Vielzahl an unterschiedlichen (aber ähnlichen, bezüglich der Aktivität) Integrationsorten (Lim 2012). So werden Einflüsse, die durch nur wenige solcher Orte auf die Expression gegeben wären, statistisch vernachlässigbar. Alle Bestandteile der lentiviralen Vektoren, die integriert werden sollten, wurden so konstruiert, dass kein unterbrechendes PolyA-Signal zum Abbruch bei der Synthese der lentiviralen RNA führte. Damit konnte sichergestellt werden, dass die gesamte Reporterassay-Kassette integriert wurde. Die Funktionalität des integrierten Reporterassays wurde anhand des starken β_2m -Promotors in U373 Zellen gezeigt (Abbildung 30).

Bei der Auswahl der in den Experimenten zu wählenden Zelllinien wurden zunächst HCMV permissive immortalisierte Zelllinien ausgewählt, darunter RPE (*retinal pigment epithelial*) Epithelzellen, U373 (Glioblastom Zellen) Astrozyten und ILN7 Zellen (Hautfibroblasten). Primäre MRC-5 Fibroblasten, welche in den vorherigen Analysen genutzt wurden, eigneten sich allerdings am besten und waren somit für die Analyse der Effekte einer HCMV-Infektion der Gold-Standard für den integrierten Reporterassay. Durch die Nutzung relativ niedriger Zellpassagen konnten die primären Fibroblasten für diesen Assay problemfrei genutzt werden. Das Reporterassay ohne Promotor war durch die Behandlung mit IFN γ /TNF α nicht beeinflusst und zeigte dort dieselbe Phosphataseexpression wie in unbehandelten Zellen. Während der HCMV-Infektion ergab sich eine konstante Expression der Phosphatase und keine Akkumulation wie in unbehandelten Zellen. Dies kann auf den Wachstumsstopp der Zellen

durch die HCMV-Infektion zurückgeführt werden (Jault, Jault *et al.* 1995, Lu and Shenk 1996). Die Akkumulation der Phosphatase wird für diese Kontrolle somit durch den relativen Verlust an Expression durch fehlende Zellvermehrung während der HCMV-Infektion ausgeglichen, so dass die Messwerte über die gesamte Kinetik konstant bleiben. In allen weiteren Experimenten wurde von diesem Zeitpunkt an die Konzentration an FCS reduziert (von 10% auf 3% FCS), um die Vermehrung der Zellen (ohne Infektion) zu vermindern. Folglich fiel die Phosphatase-Akkumulation in den unbehandelten Zellen (bei 3% FCS) deutlich geringer aus, so dass in den darauf folgenden Verrechnungen von infizierten zu IFN γ -stimulierten oder unbehandelten Zellen kein Unterschied erkennbar war (für das Reportergen ohne Promotor). Die Phosphataseexpression des Tapasinpromotors korrelierte unter den neuen Konditionen mit den Ergebnissen der endogenen RNA-Analyse und legte damit die authentische Wiedergabe des Assays dar.

3.8 Die Lokalisation der regulatorischen Sequenz

Nachdem mit dem Reportergenassay Daten gewonnen waren, die der mRNA-Neusynthese entsprachen und damit durch den Assay die Möglichkeit zur Lokalisation der regulatorischen Sequenz gegeben war, wurden zunächst 5' Verkürzungen (5' Verkürzungen 1 bis 5, 5' V1-5) des Tapasinpromotors analysiert (Abbildung 33B).

In der ersten Verkürzung des Tapasinpromotors (5' V1) wurden zwei mögliche Bindestellen für IFN γ induzierte Transkriptionsfaktoren entfernt. Diese GAS (*gamma-interferon activated site*)-Sequenzen werden von STATs (STAT1/3, *Transducers and Activators of Transcription*) gebunden, die bereits in der Zelle vorliegen, also nicht mehr exprimiert werden müssen, sondern lediglich aktiviert und an die GAS-Sequenzen dirigiert werden können. Diese schnelle Induktion durch IFN γ war, wie erwartet, in dieser Verkürzungsmutante nicht mehr gegeben. Untersuchungen zur Tapasintranskription in Maus-Zellen haben gezeigt, dass die Induktion von Tapasin hauptsächlich durch sekundäre Faktoren (IRF-1, *interferon responsive factor-1*) geschieht und die direkte (frühe) Stimulation nur etwa 20% der totalen Induktion ausmacht (Abarca-Heidemann, Friederichs *et al.* 2002). Wären die Daten auf den humanen Promotor übertragbar, würde dieses dafür sprechen, dass die frühe Induktion über diesen Bereich des Promotors erfolgt, da nur hier (bei der 5' V1) die frühe Induktion fehlt, aber die späte vorhanden ist. Responsive Elemente der späten Induktion wie etwa ISRE (*interferon stimulated response element*) oder IRF-Elemente liegen im proximalsten Teil des Promotors

Diskussion

kurz vor dem ATG. Ähnlich der Stimulation mit IFN γ kann eine Induktion über den TLR-Signalweg (*toll-like receptor signalling*) und/oder IFN α/β ausgelöst/erreicht werden (Noppert, Fitzgerald *et al.* 2007). Fehlt jedoch die in 5'V1 entfernte Sequenz, sollte dieses Signal keinen Einfluss auf den Promotor nehmen und die frühe Induktion ausbleiben.

Tatsächlich war bei dieser Verkürzung (5'V1) eine sehr frühe Reduktion der SEAP-Expression durch HCMV deutlich dominanter ausgeprägt als für den wildtypischen Promotor. Diese frühe, minimale positive Stimulation (des wildtypischen Promotors) war durch Daten aus den RNA-Neusynthese Analysen zu frühen Infektionszeiten bekannt (Abbildung 20). Durch sie war außerdem die nur leichte Reduktion der Phosphatasemenge 24 Stunden nach Infektion erklärbar, da zunächst die Phosphataseexpression induziert wird und sich die Inhibition erst später auf die Phosphatasemenge auswirkt.

Die 5'V2 besitzt lediglich 29 Nukleotide weniger als die 5'V1, dabei sind die Konsensussequenzen einer Mzf1- (*myeloid zinc finger 1*) und einer direkt darauf folgenden NF- κ B- (*nuclear factor NF-kappa-B*) Bindestelle entfernt worden. Einhergehend damit war die IFN γ Induktion nicht wesentlich verändert zur vorherigen Verkürzung und bildete eine Art Intermediat aus wildtypischem Promotor und erster Verkürzung (5'V1). Interessanterweise ist die Reduktion der Expression während der HCMV-Infektion dagegen nahezu komplett aufgehoben und die Expression liegt auf der Ebene nicht-infizierter Zellen.

Eine weitere Sequenzentfernung im Promotor (5'V3) führte zu einer reduzierten IFN γ Induzierbarkeit, während auch für diese Verkürzung keine Regulation durch HCMV zu beobachten war. Auch alle weiteren Verkürzungen (5'V4-5) wurden während der HCMV-Infektion nicht mehr negativ reguliert.

Scheinbar hat das Virus nach Entfernung der 29 Nukleotide (5'V1 zu V2) keine Möglichkeit mehr die Aktivität zu reduzieren. Es ist bemerkenswert, dass die generellen Aktivitäten der Verkürzungen 5'V2 und V3 in mock-Zellen deutlich reduziert war (Abbildung 51, Appendix), die Phosphatasemessung jedoch oberhalb der Nachweisgrenze blieb. Es ist daher denkbar, dass die entfernten Nukleotide sowohl für die konstitutive Aktivität verantwortlich sind als auch zugleich den Ort der Repression durch HCMV bilden. Wäre dieses zutreffend, läge die Angriffsstelle von HCMV am Tapasinpromotor in einem Sequenzabschnitt des Promotors, der folgend (3.9) als fokussierter Teil des Kernpromotors diskutiert wird und letztlich den Ort bildet, an dem die Transkription hauptsächlich initiiert zu werden scheint (Abbildung 37).

Wie erwähnt, fehlen der 5'V2 im Vergleich zur 5'V1 nur 29 Nukleotide inklusive einer NF- κ B-Bindestelle. Generell spricht man von NF- κ B als stimulierenden Transkriptionsfaktor und meint damit das p50/p65 Heterodimer (Zhong, May *et al.* 2002). Der aktivierende Faktor

ist dabei phosphoryliertes p65, welches das p50/p50 Homodimer (inaktivatorisch) auflöst und in das aktivatorische Heterodimer verwandelt. Gezeigt wurde, dass an inaktiven Promotoren ein p50/p50-Homodimer vorkommt, das weitere Proteine binden kann, vermutlich zur Rekrutierung von HDACs (Histon Deacetylasen) und damit zu inaktiven Chromatinstrukturen führt (Zhong, May *et al.* 2002). Eines dieser weiteren Proteine ist I κ BNS, welches IL-10 induziert ist und p50/p50 Homodimere stabilisiert (Driessler, Venstrom *et al.* 2004, Ghosh and Hayden 2008).

HCMV exprimiert ein virales IL-10 (Kotenko, Sacconi *et al.* 2000), welches die Signalkaskade zur Aktivierung von I κ BNS induzieren könnte. EBV (Epstein Barr Virus), ein weiteres Herpesvirus, exprimiert das sogenannte *latent membrane protein 1* (kurz Lmp1) und induziert die Produktion von p50, was zu erhöhten Mengen von p50/p50-Homodimeren führt. Dieses bewirkt aktiv die Reduktion der Promotoraktivität eines zellulären Gens (Wu, Chow *et al.* 2011). Die Induktion von p50 und p65 in der HCMV Infektion ist hinlänglich bekannt (Khan, Coquette *et al.* 2009, Kowalik, Wing *et al.* 1993, Yurochko, Kowalik *et al.* 1995). Zusammengenommen werfen die Effekte von HCMV und dem Herpesvirus EBV die Frage auf, ob HCMV durch p50/p50 Homodimere (und/oder deren Stabilisierung) den Tapasinpromotor inhibieren kann.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde nach einer Methode gesucht, eine mögliche p50/p50 Homodimerbindung an den Tapasinpromotor zu verhindern. Eine Aufschlüsselung der Bindung von p50, p65 oder c-Rel lieferte die Analyse von Kunsch und Mitarbeitern (Kunsch, Ruben *et al.* 1992). Zieht man die entscheidende Sequenz des Tapasinpromotors in Betracht (GGAAATTCCC) und vergleicht diese nur mit den Konsensussequenzen für p50 und p65, zeigt sich, dass p50 und p65 mit identischer Wahrscheinlichkeit binden können. Eine Mutation, welche selektiv die Bindung von p50 verhindert, hätte somit automatisch eine artifizielle, verstärkte Bindung von p65 ermöglicht. Es hätte somit keine Aussage getroffen werden können, ob durch die Verhinderung der p50 Bindung eine negative Beeinflussung entfernt wurde oder durch die zwangsläufige p65 Bindung ein positiver Einfluss hinzukam. Daher wurde mit vier Punktmutationen die komplette NF- κ B-Konsensussequenz entfernt. Durch diese Mutation änderte sich die Regulation während der HCMV-Infektion jedoch nicht. Experimente mittels eines p50 siRNA-Knockdowns in HCMV-infizierten Zellen zeigten kongruent dazu keine verminderte Reduktion der Tapasinexpression (nicht gezeigte Daten). Zusammen mit Daten zur PRDM1 Mutation (aus Arbeiten im transienten System, welche durch Daten des stabilen Systems bestätigt wurden), durch die es ebenfalls zu keiner

veränderten Regulation kam, zeigte sich die HCMV-Regulation am Tapasinpromotor unabhängig von den Transkriptionsfaktoren NF- κ B und PRDM1.

Eine Regulation über die in 5'V2 entfernten 29 Nukleotide war evident, da sich die HCMV-Infektion ohne einen Einfluss auf die weiteren Verkürzungsmutanten 5'V4 und V5 (Abbildung 33) zeigte. Zudem konnte, wie zuvor erwähnt, die dortige NF- κ B-Bindestelle als regulative Sequenz während der HCMV-Infektion ausgeschlossen werden. Dadurch rückt eine Mzfl1-Bindestelle, welche ebenfalls in den negativ regulierte 29 Nukleotiden vorhanden ist, zwangsläufig in den Fokus der Regulation. Kürzlich konnte in MCMV (murines Cytomegalovirus) -infizierten Mausfibroblasten gezeigt werden, dass die meisten Mzfl1-abhängigen Promotoren während der MCMV-Infektion inhibiert sind (Marcinowski, Lidschreiber *et al.* 2012). Beim Vergleich des humanen Tapasinpromotors mit dem der Maus zeigte sich, dass die (entsprechende) Sequenz der Mzfl1-Bindestelle im murinen Tapasinpromotor teilweise fehlt (Abbildung 44 und 45, Appendix). Interessanterweise konnten bisher keine Hinweise auf eine Regulation der Tapasinexpression in der MCMV-Infektion gefunden werden. Kombiniert mit dem im unteren Abschnitt vorgeschlagenen Modell (3.9) könnte HCMV über die Regulation von Mzfl1 direkt auf den zuvor erwähnten fokussierten Teil des Kernpromotors (siehe 3.9), welcher in 3'-Richtung mit der Mzfl1-Bindestelle zu beginnen scheint, zugreifen. Dieses würde die starke und auch selektive Regulation des Tapasinpromotors durch HCMV erklären. Zur besseren Veranschaulichung dieses Mechanismus muss jedoch zuerst der Promotor in seiner Funktion per se, mitsamt den regulatorischen Elementen analysiert und diskutiert werden.

3.9 Modell des Tapasinpromotors

Neben der Suche nach der Sequenz, mittels welcher HCMV den Tapasinpromotor inhibiert, galt es ebenfalls den Promotor und seine Bindestellen zu charakterisieren. Auf Grund der bisher nur geringen Informationen über den humanen Tapasinpromotor war ein grundlegendes Verständnis des Promotors nötig, damit die Effekte während der HCMV-Infektion entschlüsselt werden konnten. Um dieses zu erreichen, wurde die Aktivität der verschiedenen Verkürzungen sowie der punktmutierten Promotoren verglichen.

Wie gezeigt, ist die Integrationsrate der jeweiligen Reportergene mit ihren Promotorkonstrukten leicht fluktuierend (Abbildung 43, Appendix), so dass die in Abbildung 35 gegebenen Aktivitätsindices (in %) nur Tendenzen wiedergeben. Zu dem sind in einzelnen

Werten unterschiedliche Transduktionen, Experimente und Zelldichten enthalten. Einen Standard als Abgleich festzulegen, war für diese Rechnung daher nicht möglich. Die gezeigten Werte sollen ausdrücklich nur einen tendenziellen Eindruck vermitteln. In Abbildung 36 sind die modellrelevanten Transkriptionsfaktorbindestellen sowie Transkriptionsstartstellen und zwei stark regulative Elemente gezeigt.

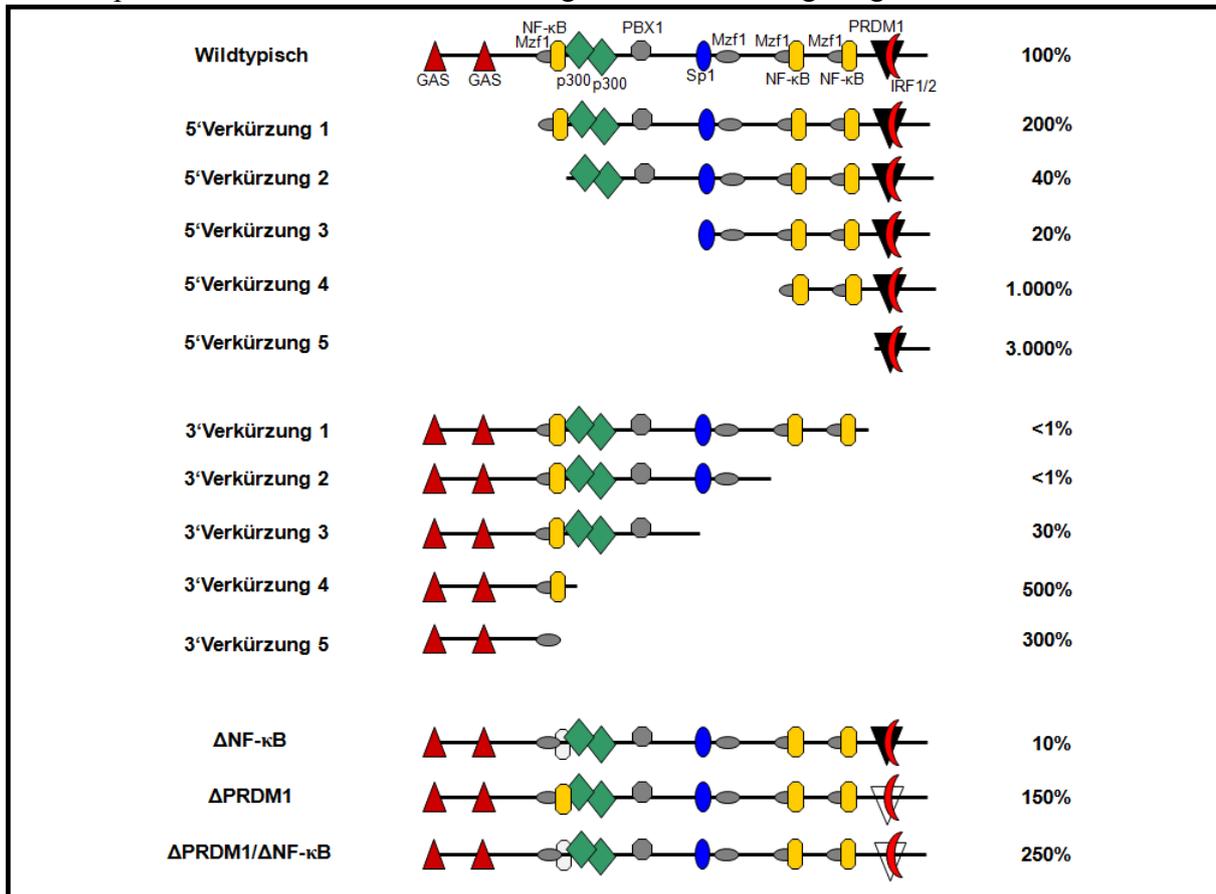


Abbildung 35: Übersicht der Aktivitäten aller verkürzten und punktmutierten Promotoren im Verhältnis zum wildtypischen Promotor. Die für jedes Konstrukt nach 48 Stunden in Zellkultur bestimmten Werte dreier unabhängiger Messungen an relativen Lichteinheiten wurden für mindestens zwei unterschiedliche Zellpassagen zusammengefasst und zur Verrechnung genutzt. Die so bestimmten Werte wurden in Verhältnis zu denen des wildtypischen Promotors gesetzt und als Prozentzahlen angegeben. Die gegebenen Prozente sind wiederum Mittelwerte von mindestens zwei Bestimmungen.

Nach Zusammenfassung der Daten aller Verkürzungsmutanten wird folgendes Modell des Tapasinpromotors vorgeschlagen (Abbildung 36):

Der fokussierte Teil des Kernpromotors (mit einer dominanten Transkriptionsstartstelle, siehe auch 1.3.1.2) beginnt direkt mit der Mzf1-Bindestelle und reicht bis zum p300-Cluster. Die weiter *downstream* verteilt gelegenen drei Transkriptionsstartpunkte (ca. 300 Basenpaare (bp) vor dem ATG) bilden zusammen mit der letzten Transkriptionsstartstelle (nahe am ATG) den dispersen Teil des Kernpromotors (Definition nach 1.3.1.2). Siehe bezüglich der Nutzung der Transkriptionsstartpunkte auch die Auflistung der Transkripte im *Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway* der UCSC (Abbildung 49 und 50 Appendix). Tapasin vereinigt der

Hypothese nach somit fokussierten und dispersen Kernpromotor zu einem dispersen Kernpromotor (Carninci, Sandelin *et al.* 2006, Juven-Gershon, Hsu *et al.* 2008). In den Bereich der p300-Bindestellen fällt zudem der Beginn einer CpG-Insel, welche bis ins Exon 3 reicht (*CpG Island Promotor Detection*, <http://pbil.univ-lyon1.fr/cgi-bin/CpGProD.cgi>). Die Lage des dispersen Teils des Kernpromotors stimmt mit Beobachtungen überein, dass diese Art Kernpromotor bevorzugt in CpG-Inseln liegt (Juven-Gershon, Hsu *et al.* 2006). Die erwähnten Startstellen (des dispersen Teils) liegen dabei unter dem Einfluss der einzigen Transkriptionsstartstelle im fokussierten Bereich des Kernpromotors. Theoretisch sollte die einzelne Transkriptionsstartstelle im fokussierten Teil des Kernpromotors stark aktiv sein und die Transkription dominieren, während die schwächeren im dispersen Teil nur minimale Transkriptmengen induzieren sollten (Juven-Gershon and Kadonaga 2010).

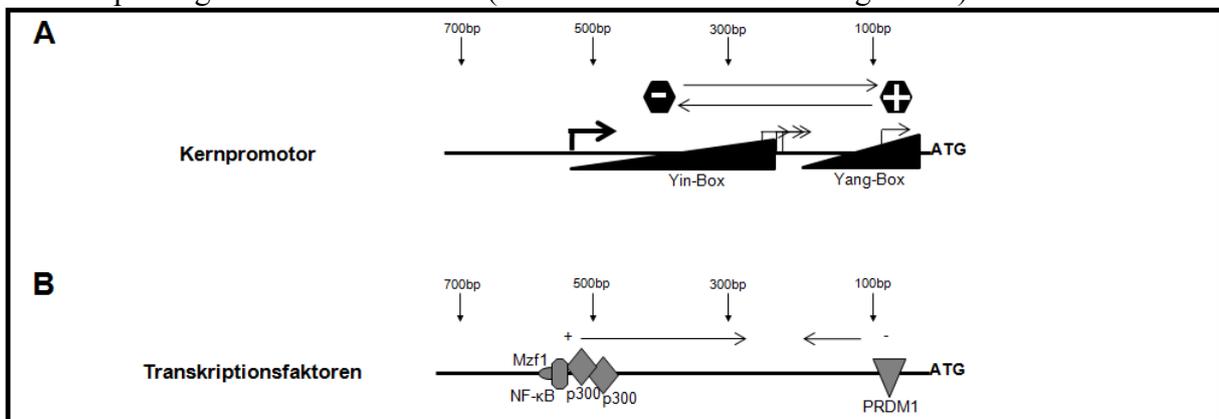


Abbildung 36: Schematische Darstellung des Tapasin-Kernpromotors und proximaler Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Bei der Skizzierung des Kernpromotors und der Transkriptionsfaktoren ist die Größe der Sequenz in bp gegeben. (A) Im Modell des Kernpromotors befinden sich zwei stark regulatorische Bereiche (Yin/Yang) in Wechselwirkung (Pfeile). Der Bereich *downstream* des fokussierten Kernpromotors (Transkriptionsstartstelle in **fett**) ist negativ (Yin-Box), die Region nah des ATGs (Yang-Box) positiv regulativ. Transkriptionsstartpunkte liegen in allen Bereichen vor, normalgedruckte gehören zum dispersen Promotor, der **fett** gedruckte zum fokussierten. (B) Unter den analysierten Faktoren hat die PRDM1 Bindestelle einen negativen Einfluss (-) auf die Transkriptionsmaschinerie, während die Kombination von Mzf1/NF-κB/p300/p300 einen positiven Einfluss (+) hat.

Das NF-κB/p300/p300 Bindestellen-Cluster bildet im Modell aber nicht nur einen Teil des fokussierten Teils des Kernpromotors, sondern zudem den Start eines hypothetisch stark negativ regulatorischen Bereiches, hier zur Vereinfachung und auf die Gegensätzlichkeit von Yin und Yang bezogen, Yin-Box genannt (Abbildung 36A). Die Yin-Box reguliert im Modell die Transkription stark und lässt die vorhandene Polymerase II möglicherweise pausieren. Ein Bereich, welcher den Analysen folgend einen stark positiven Einfluss besitzt, ist der Bereich nah am ATG. Der Erläuterung oben folgend als hypothetische: Yang-Box skizziert. Beide Bereiche (Boxen) weisen einen aktivatorischen Gradienten auf, der von distal nach proximal, bezogen auf die Lokalisation zum ATG, ansteigt. Beide Bereiche interagieren im kompletten

Diskussion

Promotor miteinander und regulieren diesen so, dass ihre stark gegensätzlichen Aktivitäten im Gleichgewicht stehen und zu einer kontinuierlich regulierten Transkription führen.

Ergebnisse, die dieses Modell stützen, sind etwa die erhöhte Aktivität der Promotorverkürzungen 5'V4 und V5 mit bis zu 3.000% Aktivität im Vergleich zum kompletten Promotor. Diesen Verkürzungen fehlen die Teile des Kernpromotors, der die negative Regulation bewirkt (Yin) und sind daher unkontrolliert aktiv (Yang). Dieses verstärkt die Beobachtung, dass beide Konstrukte (5'V4 und V5) obgleich der Bindestellen für Interferon induzierte Signale nicht stimuliert werden können, sie augenscheinlich bereits die höchstmögliche Expression aufweisen. Wie es im Einzelnen bei beiden Konstrukten zur Initiation der Transkription kommt bleibt unklar. Jedoch wurden in 5'RACE-Analysen Tapasin-mRNAs gefunden, die in diesem Bereich initiiert worden sind (El Ouakfaoui, Heitz *et al.* 1999).

Bestätigung für die negative Interferenz der Yin-Box geben zudem die sehr schwachen Phosphataseexpressionen der Promotorverkürzungen 3'V1 und V2, welche nahezu nicht nachweisbar waren. Die 3'V3 spiegelte ein Intermediat wider; dort ist eine verminderte Expression möglich, wenngleich noch negativ regulatorische Sequenzen (Teile der Yin-Box) vorhanden sind. Die letzten Verkürzungen 3'V4 und V5 sind von positiv regulatorischen Sequenzen geprägt (Abbildung 36B, ungleich Yang-Box) und weisen neben einer alternativen TATA-Box auch eine BRE_U-Box auf. Dies könnte die Transkription sowie die Fähigkeit zu einer erhöhten Expression (300-500%) ermöglichen.

Neben dem skizzierten dispersen Teil des Kernpromotors konnten mit Hilfe der Punktmutationen und Verkürzungsmutanten (innerhalb des Kernpromotors) zudem regulatorische Elemente proximaler Promotoren beschrieben werden (Abbildung 36B). Nahe dem ATG liegt eine PRDM1-Konsensussequenz, die als funktional gezeigt wurde (Doody, Stephenson *et al.* 2007). Die Verknüpfung von PRDM1 mit der Regulation der Methylierung und damit einer verringerten Transkription, ist ebenfalls gegeben (Makar and Wilson 2004). Möglicherweise übt PRDM1 seine negative Wirkung in Kombination mit den vorhandenen GC-reichen Sequenzen aus und fördert die Methylierung des Promotors. Die Punktmutation der PRDM1-Bindestelle und die dadurch erhöhte Aktivität dieses Promotors legen dieses Modell (Abbildung 36B) nahe. Die Verkürzungsmutanten 5'V4 und V5 können diesbezüglich nicht als Beispiel der Aktivität einer Verkürzung gelten, welche fast einzig die PRDM1-Bindestelle besitzt, da sie, wie diskutiert, zusätzlich eine stark positive Sequenz (Yang-Box) beinhalten. Dieses (ohne das nun gegebene Modell) scheinbare Paradoxon im

Diskussion

ATG-nahen Bereich des Promotors ist bereits aus Studien des murinen Tapasinpromotors bekannt (Herrmann, Trowsdale *et al.* 2003).

Direkt im Anfang des fokussierten Teils des Kernpromotors liegt zudem eine leicht positiv regulatorische Sequenz. Diese besteht aus einer Mzfl/NF- κ B-Bindestelle in direkter Nähe einer zweifachen p300-Konsensussequenz. p300 ist eine Histonacetyltransferase (HAT) und vermittelt die Acetylierung in ihrer Umgebung und aktiviert so die Transkriptionsmaschinerie (Goodman and Smolik 2000, Shiama 1997). Eine Abhängigkeit der NF- κ B-vermittelten Induktion ist ebenfalls bekannt und bildet zusammen mit der örtlichen Nähe der beiden Bindestellen ein Indiz dieser kombinatorischen Induktion an diesem Ort (Abarca-Heidemann, Friederichs *et al.* 2002, Gerritsen, Williams *et al.* 1997, Na, Lee *et al.* 1998, Perkins, Felzien *et al.* 1997, Sheppard, Rose *et al.* 1999). Wird die NF- κ B-Bindestelle entfernt, fehlt in der Konsequenz ein wichtiger Bestandteil des fokussierten Teils des Kernpromotors. Die Aktivität fällt stark ab (Abbildung 35, 10% Aktivität) und beschränkt sich ausschließlich auf den dispersen Teil des Kernpromotors, welcher aber durch PRDM1 (und Yin-Box) gehemmt ist. Wird im Gegensatz dazu die PRDM1-Bindestelle alleine entfernt, steigt die Aktivität nur leicht (Abbildung 35, 150% Aktivität), da sie einen geringen Einfluss auf den fokussierten Teil des Kernpromotors besitzt und dieser, wie erwähnt, den Vorzug vor dem dispersen Teil des Kernpromotors besitzt. Durch die Doppelmutation (Δ PRDM1/ Δ NF- κ B) hat die Entfernung der PRDM1-Bindestelle dagegen einen größeren Effekt. Der fokussierte Teil des Kernpromotors ist fast gänzlich ausgeschaltet (durch die Deletion der NF- κ B-Bindestelle) und die Aktivität wechselt zum dispersen Teil des Kernpromotors, auf welchen PRDM1 in der Mutante (auch die PRDM1-Bindestelle ist dort deletiert) keinen negativen Einfluss mehr ausübt. Bestätigung findet dieses Modell durch die Punktmutation der erwähnten NF- κ B-Bindestelle und für PRDM1 und NF- κ B betreffend in der kombinierten Punktmutation beider Bindestellen (Abbildung 35).

3.10 Inhibiert HCMV die Polymerase II-Initiation am fokussierten Teil des Kernpromotors?

In dieser Arbeit konnte der Tapasinpromotor bezüglich der Einteilung in dispersen oder fokussierten Kernpromotor grob beschrieben werden; bezüglich verschiedener definierter Transkriptionsfaktoren wie PRDM1, NF- κ B und oder spezifischer kurzer Sequenzen (wie etwa den GAS-Sequenzen) gelang dieses im Detail.

Durch die Ergebnisse, dass HCMV keinen Einfluss auf die flankierenden Promotorsequenzen (Abbildung 35 5' V4 und V5 sowie 3' V4 und V5) hat und die Regulation vom fokussierten Teil des Kernpromotors abhängig scheint, bleibt die Frage, mit welchem genauen Mechanismus HCMV die Transkription von Tapasin inhibiert. Dass die HCMV-Regulation direkt dem fokussierten Teil des Kernpromotors zugeordnet werden konnte, eröffnete eine neue Hypothese, nach der HCMV sich die ohnehin sehr strikte Regulation des Tapasinpromotors zu Nutzen macht und die Transkriptionsmaschinerie direkt blockiert. Sollte der im Modell skizzierte Aufbau zutreffend sein und Tapasin während der HCMV-Infektion tatsächlich wie in 3.9 erwähnt über Mzf1 reguliert sein, wäre folgendes Szenario während der HCMV-Infektion möglich (Abbildung 37 zeigt alle für diese Inhibition wichtigen Transkriptionsfaktoren und Bindestellen sowie die genauen Startpunkte beziehungsweise die Enden der entscheidenden Verkürzungsmutanten).

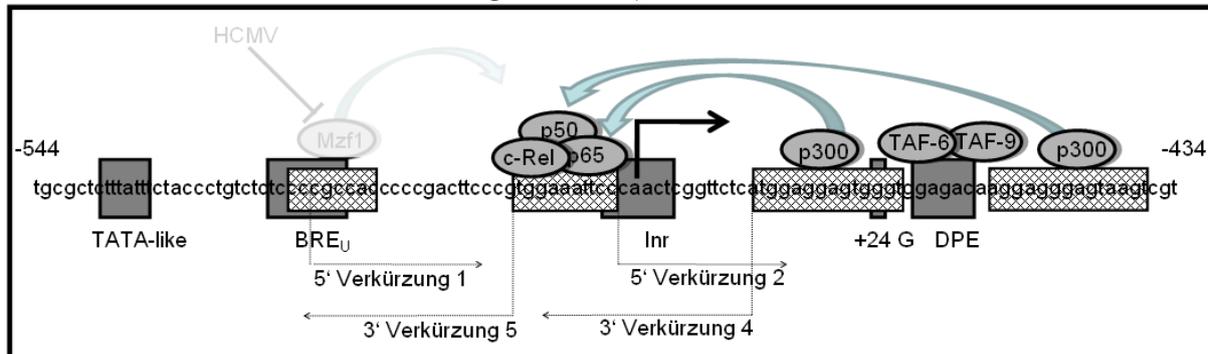


Abbildung 37: Hypothetisch funktionelle Bindungen am fokussierten Teil des Kernpromotors von Tapasin. Gezeigt ist die Promotorsequenz von 544 bis 434 Nukleotide *upstream* des ATGs. Dünne Pfeile markieren die Start- (5' Verkürzungen) beziehungsweise Endpunkte (3' Verkürzungen) der Promotormutationen. Die karierten Kästen entsprechen den Sequenzen, welche starke Ähnlichkeiten zu den Konsensussequenzen der darüber gezeigten Transkriptionsfaktoren (Ovale) besitzen. In dunklem Grau sind die generellen, basalen Transkriptionsfaktor-Bindestellen des Kernpromotors gezeigt. Türkise Pfeile deuten die Interaktion (oder direkt die mögliche positive Stimulation) von Transkriptionsfaktoren miteinander an, welche einen Positivstimulus für die Transkriptionsstartstelle darstellen kann. Transparent dargestellt ist ein möglicher negativer Einfluss der HCMV-Infektion auf die eventuelle Regulation durch Mzf1.

Wie in der Einleitung beschrieben, kann der TFIID-Komplex, der zur Initiation der Transkription unabdingbar ist, nicht nur über die TATA-Box (und TBP) rekrutiert werden, sondern auch durch TAF-6/-9 (rekrutiert über das DPE) an Stelle des TBP gebunden werden,

Diskussion

was im Falle von Tapasin (auf Grund der fehlenden TATA-Box) wahrscheinlich ist. Die Formation des PIC (*preinitiation complex*) wird durch die p300-Interaktion an p65 im p50/p65-Dimer vervollständigt, diese Bindung bringt den TFIIB Transkriptionsfaktor in Position (Gerritsen, Williams *et al.* 1997). Wäre der Kernpromotor (explizit der fokussierte Teil des Kernpromotors) einer generellen Mzfl-Regulation, wie es für eine Gruppe von Promotoren bereits gezeigt wurde, unterlegen, könnte die Transkription von der *Inr* unter der Kontrolle (finale Induktion) von Mzfl starten (Gaboli, Kotsi *et al.* 2001, Le Mée, Fromigué *et al.* 2005, Marcinowski, Lidschreiber *et al.* 2012). Eine (hypothetische) verhinderte Mzfl-Bindung durch HCMV beziehungsweise die Inhibition von Mzfl selbst (Abbildung 37) führt dazu, dass die Bindung entscheidender Transkriptions- und Initiationsfaktoren gehemmt und so die Bildung des PIC verhindert wird. Eine Transkription vom fokussierten Teil des Kernpromotors bleibt aus, lediglich die Transkriptionsstartpunkte des dispersen Teils des Kernpromotors führen zu einer Transkription.

HCMV könnte demnach über die Regulation von Mzfl die Transkription vom fokussierten Teil des Kernpromotors stoppen. Die verbleibende Transkription würde über die dispersen Teile des Kernpromotors fortgeführt, bliebe aber durch die starke intrinsische Regulation des Tapasinpromotors marginal. Die ineffiziente und örtlich differenzielle Synthese der prä-mRNA könnte in der Konsequenz zu einer Veränderung der Spleißeffektivität führen, alternatives Spleißen passiert (Moore and Proudfoot 2009) und NeTT wird im Verhältnis zu Tapasin verstärkt synthetisiert. HCMV könnte damit nicht nur die Tapasinexpression kontrollieren, sondern zusätzlich die Expression eines negativ interferierenden Proteins, nämlich NeTT, induzieren.

Ein erster Ansatzpunkt, diese Hypothese zu überprüfen, wäre eine detaillierte 5'RACE-Analyse des 5'UTR von Tapasin. So würde zum ersten Mal ein Überblick über die gesamten Transkriptionsstartpunkte gewonnen und diese könnten in das obige Modell eingefügt werden. Damit würde geklärt, an welchen Stellen im fokussierten Teil des Kernpromotors eine gezielte Interferenz von HCMV möglich ist und ob dieses tatsächlich der Mzfl-Bindestelle entspricht.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien (Zellkultur)

Arbeitsbank (steril):	Hera Safe, Heraeus®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
-80 °C Schrank:	Revco® Ultima II Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
-80 °C Truhe:	Hettich Freezer, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Blotter (<i>semi-dry</i>):	Fastblot B33/B34 (klein), Biometra, Göttingen, Deutschland
Blotting-Papier:	Whatman® (3MM), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
(UV-) Crosslinker:	CL-1000, UVP, LLC, Upland, Kanada
Einfriebehälter:	Nalgene®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Elektrophorese:	
Kammer (PAGE):	Minigel-Twin, Biometra, Göttingen, Deutschland
Kammer (Agarose):	Agagel mini, Biometra, Göttingen, Deutschland Agagel midi-wide, Biometra, Göttingen, Deutschland
Entwicklermaschine:	Curix 60, Agfa, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland
Filme:	Carestream® Kodak® BioMax®, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Geigerzähler:	LB122, Berthold, Bad Wildau, Deutschland
Geltrockner:	Dryer 583, Biorad, München, Deutschland
Größenmarker (DNA):	HyperLadder 1kb, Bionline, Singapur, Singapur 1 Kb DNA Ladder, Life Technologies, Carlsbad, USA
Heizblöcke:	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Thermostat plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CO ₂ -Inkubatoren:	Heraeus® BBD 6220, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kryoröhrchen:	CryoTubes™, Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Luminometer:	MicroLumat LB96P, Berthold, Bad Wildau, Deutschland
Mikroskop:	TS100, Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikrowelle:	Sharp, Hamburg, Deutschland
Nukleofektionsgerät:	Nucleofector™ 2b Device, Lonza, Köln, Deutschland
PCR-Gefäß:	0,2 mL PCR-Gefäß, flacher Deckel, Starlab, Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

PCR-Gerät:	LightCycler 1.5, Roche, Mannheim, Deutschland
Reaktionsgefäße:	Eppendorf Quality™ Safe-Lock Tubes, 1.5 mL, Hamburg, Deutschland Eppendorf Quality™ Safe-Lock Tubes, 2.0 mL, Hamburg, Deutschland
Rotationsinkubator:	Rotator SB3, Bibby-Scientific, Stone, England
Spannungsquelle:	Consort EV242, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA PowerPac P25, Biorad, München, Deutschland
Spektralphotometer:	UVmini-1240, Shimadzu, Duisburg, Deutschland NanoDrop™ 1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Stickstoff-Tank:	Biosafe MD, Cryotherm, Kirchen/Sieg, Deutschland
Thermocycler:	T3000, Biometra, Göttingen, Deutschland
Transfermembran:	Whatman® Protran® B85, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Überkopfschüttler:	Heidolph Reax 2, Kehlheim, Deutschland
Ultraschall-Gerät:	Branson Sonifier™ 450, G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
UV-Transilluminator:	Lumi-Imager F1, Roche, Mannheim, Deutschland
Vortexmischer:	Labinco L46, Labinco, Breda, Niederlande
Wasserbad:	GFL 1092, GFL, Burgwedel, Deutschland
Wipp-Schüttler:	GFL 3013; 3017, GFL, Burgwedel, Deutschland
Zellkulturflaschen:	Nunc® EasYFlasks™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zellschaber:	<i>cell scraper</i> , TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugen:	Centrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Optima™ L-70K, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifugengefäße:	Greiner 50 mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Greiner 15 mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

4.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Actinomycin D, Sigma-Aldrich

Ammoniumpersulfat (APS), Riedel-de Haen

β -Mercaptoethanol, Roth

EZ-Link HPDP-Biotin, Thermo Fisher Scientific Inc.

Borsäure, Merck

Bromphenolblau, Merck

Calciumchlorid (CaCl_2), Roth

Chloroform, Roth

Cycloheximid, Sigma-Aldrich

Dimethylsulfoxid (DMSO), Roth

Dithiothreitol (DTT), Merck

DNase I, Amplification Grade, Life Technologies

dNTPs, Roche

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Life Technologies

EDTA, Merck

Ethanol, Merck

Ethidiumbromid, Biorad

IFN β , PBL Assay Science

IFN γ , PBL Assay Science

FCS (Fetales Kälberserum), Life Technologies

Formaldehyd 37 %, Merck

Glycerol, Roth

Glycin, Neolab

Igepal CA-630, Sigma-Aldrich

Isoamylalkohol, Roth

Isopropanol, Merck

Kaliumchlorid (KCl), Roth

Leupeptin, Sigma-Aldrich

Magermilchpulver, Sucofin

MetaPhor® Agarose, Biozyme

Methanol, Merck

MOPS, Roth

Material und Methoden

Natriumchlorid (NaCl), Roth
Natriumcitrat, Roth
Natriumdesoxycholat, Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS), Roth
N,N-Dimethylformamid (DMF), Sigma-Aldrich
OptiMEM, Life Technologies
Pepstatin A, Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail, Active Motif
Protein A Sepharose CL-4B, GE Healthcare
Penicillin (10.000 U/mL), Life Technologies
Phosphonoessigsäure, Sigma-Aldrich
Phenol, Roth
Pfu DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific Inc.
Ponceau S Lösung, Sigma-Aldrich
Puromycin Dihydrochloride (10 mg), Sigma-Aldrich
Streptomycin (10.000 U/mL), Life Technologies
PMSF, Roth
Protaminsulfat, Sigma-Aldrich
Proteinase K, Life Technologies
RNase H, Life Technologies
Rotiphorese-30-Acrylamid, Roth
RPMI 1640 ohne L-Cystein, L-Methionin, BioWhittaker
Saccharose, Roth
Salzsäure, Roth
Superscript II, Life Technologies
T4-DNA-Ligase, Fermentas
Taq-Polymerase, Invitak
TEMED, Roth
4-Thiouridin, Sigma-Aldrich
TNF α , R&D Systems
TRIS, Roth
Trizol, Life Technologies
Trypsin 2,5 %, Gibco®, Life Technologies
Tween 20, Sigma-Aldrich

4.1.3 Kits

Cell Line Nucleofector® Kit R, Amaxa Biosystems

ChIP-IT Express, Active Motif

Expand High Fidelity PCR System, Roche

ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, Amersham, GE Healthcare

EndoFree® Plasmid Purification Kit (Maxi), Qiagen

Great EscAPe™ SEAP Chemiluminescence Kit 2.0, Clontech

LightCycler® DNA Master SYBR Green I, Roche

LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I, Roche

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe, Roche

µMACS Streptavidin Starting Kit, Miltenyi Biotec

µMACS Streptavidin Kit, Miltenyi Biotec

OneStep RT-PCR Kit, Qiagen

Phase Lock Gel Heavy Tubes (2 mL), 5 PRIME

Pierce Chromatin Prep Module, Thermo Fisher Scientific Inc.

Plasmid Midi Kit, Qiagen

Quantitect SYBR Green RT-PCR, Qiagen

QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen

QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen

QIAshredder, Qiagen

QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene

QuikChIP, Imgenex

RNeasy Mini Kit, Qiagen

RNeasy MinElute Cleanup Kit, Qiagen

Superfect Transfection Reagent, Qiagen

TRIzol® Reagent, Life Technologies

4.1.4 Antikörper

Ziel	Art	Organismus	Applikation	Firma (Artikel)
p44/42 (Erk1/2)	mAk	Kaninchen	Westernblot	Cell Signaling (#4695)
HA (Hämagglutinin)	mAk	Maus	ChIP	Sigma-Aldrich (H3663)
p65 (NF-κB)	pAk	Kaninchen	ChIP	Santa Cruz (sc-372)
Phospho-p44/42	mAk	Kaninchen	Westernblot	Cell Signaling (#4370)
Acetyl-Histon H3K9Ac	mAk	Maus	ChIP	Active Motif (61251)
Tapasin	Serum	Kaninchen	IP	(Tan, Kropshofer <i>et al.</i> 2002)
Polymerase II	mAK	Maus	ChIP	Active Motif (39097)

4.1.5 Restriktionsenzyme

Alle benutzten Restriktionsenzyme stammten von *New England Biolabs* (NEB) und wurden mit den empfohlenen Konzentrationen und den Puffern der *NEBuffer Activity Chart* eingesetzt.

4.1.6 Oligonukleotide I (qPCR und qRT-PCR)

Nr.	Primer		Sequenz (5'→3')	T _M (°C)	Amplicon
1	Tapasin	Frwd.	catatccagcccagtcctca	59	113
2		Rev.	tgtgggtgaggacagtcagtac	61	
3	TAP1	Frwd.	atgtctcttggggatcatgc	57	149
4		Rev.	tggactttgccagagattcc	58	
5	TAP2	Frwd.	ttcacaatagcagcggagaa	57	159
6		Rev.	gcgacagacttcagctcct	60	
7	β ₂ m	Frwd.	gtgctcgcgctactctct	62	144
8		Rev.	ttcaatgtcggatggatgaa	55	
9	HLA-A/B/C	Frwd.	tccgagatactggagaac	59	141
10		Rev.	gtgtgatctccgcaggtag	60	
11	ERp57	Frwd.	cctaaaagcagccagcaact	59	151
12		Rev.	tgccacagtcttgcctcaa	59	
13	GAPDH	Frwd.	tgcaccaccaactgctta	57	177
14		Rev.	ggatgcaggatgatgttc	56	
15	18SrRNA	Frwd.	aaacggctaccacatccaag	58	112
16		Rev.	caattacagggcctcgaa	54	
17	UL37	Frwd.	caacgagctcggatgctg	59	121
18		Rev.	caaagcagcgtcaacaacag	59	
19	Rps18	Frwd.	cttccacaggaggcctacac	60	142
20		Rev.	ttaatggcagtgatggcaaa	56	
21	Rgl2	Frwd.	aggaggaagaggaggaggaa	55	113
22		Rev.	caagggatcaagaggtcgat	50	
23	Daxx	Frwd.	agaagccctagctctctg	60	135
24		Rev.	tggtctgctgtctgcatctt	59	
25	hnRNP-F (Variante 1-6)	Frwd.	aaagccacaccaagatcac	58	161
26		Rev.	ccatcatgaatcgtgcagtc	57	
27	hnRNP-H1	Frwd.	ggccaggctccttatgacaga	59	153
28		Rev.	acccaaatccatagccatca	57	
29	NeTT	Frwd.	tctcagtgtacacgtggt	55	102
30		Rev.	ggcatgtaggcaagctc	56	

4.1.7 Oligonukleotide II (Minigen-Synthese)

Nr.	Primer		Sequenz (5'→3')	T _M (°C)
1	Tpn-Ex1.1	Rev.	tctagagcagcgcctatgaagtccctg	71
2	Tpn-Int3.2	Frwd.	ggtacctgttttttttaactgg	74
3	Tpn-Int3.1	Rev.	ggtacccacactaggtgccaccag	74
4	Tpn-Ex7/8.2	Frwd.	gtcgactcactctgttttctttgaatccttgagg	65

4.1.8 Oligonukleotide III (Reportergenassay)

Nr.	Primer		Sequenz (5'→3')	T _M (°C)
1	PstI/NheI/EcoRI/Kozak/ SEAP/HpaI/BsrGI	Frwd.	ctgcaggctagcgaattgccaccatgctgctgctgctg	>75
2		Rev.	tgtacagttaactcatgtctgctcgaagcggcggcc	>75
3	PstI/Kozak/ SEAP/HpaI/BsrGI	Frwd.	ctgcaggcccaccatgctgctgctgctgctgctgggc	>75
4		Rev.	tgtacagttaactcatgtctgctcgaagcggcggcc	>75
5	PstI-mut in SEAP	Frwd.	ccccaagaagctccagcctgcacagac	72
6		Rev.	gtctgtgcaggctggagcttcttggcgg	72
7	PvuII/AmpRII/R/US/G/ NheI/EcoRI/T/NarI	Frwd.	ccgatcgttgcagaagtaagttg	61
8		Rev.	ggcgccagaattcgtagcctgctagagatttccacactg	>75
9	Del.Insertion	Frwd.	caggcttccctggaccctgtgacccatc	75
10		Rev.	gatgggtcacagacgggtccagggaagcctg	75
11	HpaI/ClaI/ IRES/PuroR/BsrGI	Frwd.	cgcggttaacatcgatgccctctccctcccccccccta	>75
12		Rev.	gcgctgtacatcaggcaccgggcttgccgggtcatgc	>75
13	HpaI/GAPDH/ClaI	Frwd.	gcgttaactactagcggttttacggggcg	68
14		Rev.	gcgatcgattcgaacaggaggagcagagag	71
15	Tpn-5'-1.1	Frwd.	gcgctagcgtatttccagaactaaacccttctttt	72
16	Tpn-5'-2.1	Frwd.	gcgctagcggcaccctccgacttcccg	>75
17	Tpn-5'-3.1	Frwd.	gcgctagcaactcggttctcatggaggagtgg	73
18	Tpn-5'-4.1	Frwd.	gcgctagcggatgttggagagcacacacagg	74
19	Tpn-5'-5.1	Frwd.	gcgctagcgggtccctgcctggccag	>75
20	Tpn-5'-6.1	Frwd.	gcgctagccccctcatgccgcctttgg	>75
21	Tpn-5'-1-6.2	Rev.	cgaagcttggcgcgtgcgacctctcag	73
22	Tpn-3'-1.2	Rev.	gcaagcttacgggaagtgggggtggc	73
23	Tpn-3'-2.2	Rev.	gcaagcttatgagaaccgagttgggaatttccac	70
24	Tpn-3'-3.2	Rev.	gcaagcttgcctccaacatccacttccc	71
25	Tpn-3'-4.2	Rev.	gcaagcttgggtagatcctctccagttctcac	71
26	Tap1-5'-1.1	Frwd.	cggctagccagcatccctgcaaggcacc	74
27	Tap1-5'-0.2	Rev.	gcaagcttggcactcggacgccgtccc	74
28	b2m-Pro-0.1	Frwd.	gcgctagctgaagtctagaatgag	65
29	b2m-Pro-0.2	Rev.	gcaagcttctggcccgaatgct	66
30	GAPDH-Prom01	Frwd.	gctagctactagcggttttacggggcg	68
31	GAPDH-Prom02	Rev.	gaagcttccgaacaggaggagcagaga	67
32	ΔNFκB.1	Frwd.	ccgacttcccgtgTaaCtGcAcaactcggttctc	73
33	ΔNFκB.2	Rev.	gagaaccgagttgTgCaGttAcacgggaagtcgg	73
34	ΔPRMD1.1	Frwd.	cgcccttggaggaaaCtgaaaCtgaaggaggaggag	73
35	ΔPRMD1.2	Rev.	cttctctcttccaGtttcaGtttctccaaggggcg	73

4.1.9 Oligonukleotide IV (sqRT-PCR)

Nr.	Primer		Sequenz (5'→3')	T _M (°C)
1	NB.Tpn1.1	Frwd.	acaaacccccaaagtgtcct	71
2	NB.Tpn1.2	Rev.	aggcaggctgggatggtgaat	74
3	NB.SOCS3.1	Frwd.	ggagtctctggaccagtacg	61
4	NB.SOCS3.2	Rev.	ttcttgtgcttgtgccatgt	55
5	NB.β2m1.1	Frwd.	gggcattcctgaagctgaca	61
	NB.β2m1.2	Rev.	tgcggcatcttcaaacctcc	60

4.1.10 Oligonukleotide V (ChIP-Primer der qPCR und sqPCR)

Nr.	Primer		Sequenz (5'→3')	T _M (°C)	Amplicon
1	Tapasin(SQ)	Frwd.	ggaagccggagtaatggttt	58	303
2		Rev.	tgaagcctcctctctect	60	
3	TAP1(SQ)	Frwd.	aactggtgcaagtggaaagg	59	401
4		Rev.	gggacacctagagctagccatt	61	
5	Tapasin(Q)	Frwd.	ggcaccttcacctaaccaga	59	158
6		Rev.	gctcacccaaagccacag	59	
7	TAP1(Q)	Frwd.	aactggtgcaagtggaaagg	59	142
8		Rev.	aagtggcctgcccagactat	61	
9	Tapasin-Int3.1(Q)	Frwd.	ttcccagctgcttttctgt	58	170
10		Rev.	aagcatgggattgaatcagg	56	
11	Tapasin-Int3.2(Q)	Frwd.	gagcagggactgcttgtctt	60	169
12		Rev.	cccatcttcctgtctttga	57	
13	Tapasin-Int7(Q)	Frwd.	caagaccagcttagccaaca	60	150
14		Rev.	tcagctcactgcaacctctg	59	

4.1.11 Oligonukleotide VI (Reporter-gen-Integration, qPCR und sqPCR)

Nr.	Primer		Sequenz (5'→3')	T _M (°C)
1	qPCR-RRE.1	Frwd.	ttgttctctgggttcttgg	56
2	qPCR-RRE.2	Rev.	gatgccccagactgtgagtt	60
3	sq-SEAP_Int.1	Frwd..	ggtacagtgcaggggaaaga	61
4	sq-SEAP_Int.2	Rev.	cctcctcaactgggatgatg	61

4.1.12 Konstrukte I (Promotor-Konstrukte)

Konstrukt	Primer-Paare	Zyklen (°C/Sek)	Produkt (bp)
Tapasinpromotor	Tpn_P_5' 1.1	32 (95/30; 65,5/30; 72/60)	789
	Tpn_P_5' 1-6.2		
Tapasinpromotor (5'-Verkürzung Nr.1)	Tpn_P_5' 2.1	32 (95/30; 68/30; 72/60)	528
	Tpn_P_5' 1-6.2		
Tapasinpromotor (5'-Verkürzung Nr.2)	Tpn_P_5' 3.1	32 (95/30; 65/30; 72/60)	496
	Tpn_P_5' 1-6.2		
Tapasinpromotor (5'-Verkürzung Nr.3)	Tpn_P_5' 4.1	32 (95/30; 65/30; 72/60)	311
	Tpn_P_5' 1-6.2		
Tapasinpromotor (5'-Verkürzung Nr.4)	Tpn_P_5' 5.1	32 (95/30; 68/30; 72/60)	170
	Tpn_P_5' 1-6.2		
Tapasinpromotor (5'-Verkürzung Nr.5)	Tpn_P_5' 6.1	32 (95/30; 68/30; 72/60)	95
	Tpn_P_5' 1-6.2		
Tapasinpromotor (3'-Verkürzung Nr.1)	Tpn_P_5' 1.1	32 (95/30; 68/30; 72/60)	631
	Tpn_P_3' 4.2		
Tapasinpromotor (3'-Verkürzung Nr.2)	Tpn_P_5' 1.1	32 (95/30; 65/30; 72/60)	506
	Tpn_P_3' 3.2		
Tapasinpromotor (3'-Verkürzung Nr.3)	Tpn_P_5' 1.1	32 (95/30; 61,5/30; 72/60)	316
	Tpn_P_3' 2.2		
Tapasinpromotor (3'-Verkürzung Nr.4)	Tpn_P_5' 1.1	32 (95/30;67/30; 72/60)	294
	Tpn_P_3' 1.2		
TAP1-Promotor	Tap1_P_5' 1.1	32 (95/30; 68/30; 72/60)	615
	Tap1_P_5' 0.2		
TAP1-Promotor (5'-Verkürzung Nr.2)	Tap1_P_5' 3.1	32 (95/30; 65/30; 72/60)	146
	Tap1_P_5' 0.2		
β_2m -Promotor	b2m_Pro_0.1	32 (95/30; 61,5/30; 72/60)	317
	b2m_Pro_0.2		
GAPDH-Promotor	GAPDH_Prom01	32 (95/30;67/30; 72/60)	166
	GAPDH_Prom02		

4.1.13 Konstrukte II (sequenzgerichtete Mutationen von Promotoren)

Konstrukt	Primer-Paare	Zyklen (°C/Sek)	Produkt (bp)
Tapasinpromotor (delta PRDM1)	Δ PRDM1.1	18 (95/50; 60/50; 68/330)	5466
	Δ PRDM1.2		
Tapasinpromotor (delta NF- κ B)	Δ NF κ B.1	18 (95/50; 60/50; 68/330)	5466
	Δ NF κ B.2		

4.1.14 Vektoren

Name	Firma
pcDNA TM 3.1, pCR [®] II-TOPO	Life Technologies
PR-GIP, pWI-GIP	Eigenständige Klonierung aus pUC2CL6IP, (Halenius, Hauka <i>et al.</i> 2011)
pSEAP2-Basic	Clontech
pCD/NL-BH, pCMV-VSV-G	wie pUC2CL6IP, (Halenius, Hauka <i>et al.</i> 2011)

4.1.15 Puffer und Lösungen

RNA-Präzipitationslösung:	50 mL DEPC-H ₂ O; 1,2 M NaCl; 0,8 M Natriumcitrat
RNA-Bindepuffer:	10x TE 100 mM TRIS/HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA
RNA-Waschpuffer:	100 mM TRIS/HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA; 1 M NaCl, 0,1 % Tween 20
4-Thiouridin-Lösung:	50 mM Stammlösung 100 mg in PBS (steril)
Biotin-Stammlösung:	1 mg/mL EZ-Link HPDP-Biotin in DMF
5x Probenpuffer (Western):	20 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 25 % (v/v) Glycerol, 0,5 % (v/v) Bromphenolblau, 250 mM TRIS/HCl (pH 6,8)
10x Laufpuffer (Western):	10x Laemmli 1 % (w/v) SDS, 1,9 mM Glycin, 0,25 M TRIS/HCl (pH 6,8)
10x Blotpuffer (Western):	480 mM TRIS; 280 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol
IP-Lysepuffer (Puffer A):	140 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 20 mM TRIS/HCl (pH 7,6); Detergens (1,0 % Igepal) und Protease Inhibitoren (1mM PMSF, 10 μM Leupeptin, 1 μM Pepstatin A) direkt vor Gebrauch zugeben.
IP-Waschpuffer I (Puffer B):	150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10 mM TRIS/HCl (pH 7,6); Detergens (0,2 % Igepal) direkt vor Gebrauch zugeben.
IP-Waschpuffer II (Puffer C):	500 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10 mM TRIS/HCl (pH 7,6); Detergens (0,2 % Igepal) direkt vor Gebrauch zugeben.
IP-Fixierpuffer (Puffer D):	10 mM TRIS/HCl (pH 8,0)
Einfriermedium:	10 % DMSO (Sigma-Aldrich), 50 % FCS (Gibco® / Life Technologies) und 40% DMEM (Gibco® / Life Technologies)

Material und Methoden

LB-Medium:	1 % (w/v) Trypton (Bacto™), 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt (Bacto™)
1× PBS (pH 7,4):	136 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ ·2×H ₂ O; 1,5 mM KH ₂ PO ₄
RIPA-Puffer:	50 mM TRIS/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1,0 % Igepal; 0,1 % (w/v) SDS; 1 % Natriumdesoxycholat; Protease Inhibitoren (1mM PMSF, 10 μM Leupeptin, 1 μM Pepstatin A) direkt vor Gebrauch zugeben.
10x TBE:	900 mM TRIS; 900 mM Borsäure; 20 mM EDTA (pH 8,0)
TBE-Probenpuffer:	10 % (v/v) Glycerol in TBE mit Bromphenolblau
10x TBST:	0,1 M TRIS/HCl (pH 8,0); 1,5 M NaCl; 5 % (v/v) Tween 20

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Arbeiten

Molekularbiologische Arbeiten zur Klonierung von Vektoren, darunter Agarosegel Analysen, Restriktionen und Ligationen wurden nach Sambrook und Russel (Sambrook and Russell 2001) beziehungsweise Green und Sambrook durchgeführt (Green and Sambrook 2012).

4.2.1.1 Konstruktion des lentiviralen Vektors pPR-GIP

Zur Klonierung des lentiviralen Vektors pPR-GIP wurde der lentivirale Expressionsvektor pUC2CL6IPwo zunächst so umgebaut, dass in 5' Richtung der enthaltene SFFV (*spleen focus-forming virus*) Promotor, die multiple Klonierungsstelle sowie die IRES (*internal ribosomal entry site*) und das Anitibiotika Resistenzgen (Puromycin N-Acetyltransferase) entfernt wurden. Dies geschah mittels der Restriktionsenzyme PstI und BsrGI. Der so entstandene linearisierte Teilvektor pUC-BsrGI/PstI diente der weiteren Klonierung. Anschließend wurde (Primer 1 und 2, 4.1.8 Oligonukleotide III) eine Sequenz mit einer minimalen Klonierungsstelle (für die zu untersuchenden Promotoren) direkt vor der Kozak-Sequenz der SEAP-cDNA geschaffen (NheI und EcoRI Stelle) und diese Sequenz in den Vektor kloniert, um diesen so wieder zu verschließen. Die SEAP-cDNA Sequenz wurde zuvor so verändert, dass die interne PstI-Stelle (Primer 5 und 6, 4.1.8 Oligonukleotide III) sowie eine Mutation (Primer 9 und 10, 4.1.8 Oligonukleotide III) entfernt beziehungsweise korrigiert wurden. Danach wurde über die zuvor ebenfalls eingefügte HpaI-Stelle mit der BsrGI-Stelle eine ClaI-Stelle sowie die IRES und das Puromycinresistenzgen eingefügt (Primer 11 und 12, 4.1.8 Oligonukleotide III). Über die resultierenden HpaI- und ClaI-Stellen wurde schlussendlich der GAPDH Promotor eingebaut (Primer 13 und 14, 4.1.8 Oligonukleotide III).

4.2.1.2 Konstruktion des lentiviralen Vektors pwI-GIP

Zur Klonierung des lentiviralen Vektors pPR-GIP-wI wurde zunächst (Primer 3 und 4, 4.1.8 Oligonukleotide III) die minimale Klonierungsstelle, von pPR-GIP, vor der SEAP cDNA entfernt. Anschließend wurde zwischen die U5-Sequenz und die *Primer-Bindingsite* des

lentiviralen Vektors die minimale Klonierungsstelle zur Integration der Promotoren kloniert. Mittels der PvuI/NarI-Stelle wurde der entstandene Vektor erneut linearisiert und die entsprechende Sequenz, erweitert um die Klonierungsstelle, synthetisiert und kloniert (Primer 13 und 14, 4.1.8).

4.2.1.3 Phosphatase-Reportergenassay

Die Phosphataseaktivität im Reportergenassays wurde mit dem *Great EscAPe™ SEAP Chemiluminescence Kit 2.0* (Clontech) bestimmt. Dazu wurden, nach dem Beginn des Experiments, alle 24 Stunden der Zellüberstand (100 µL von $2,5 \times 10^5$ Zellen) entnommen und bei -20 °C aufbewahrt. Anschließend wurde die entnommene Menge durch neues Medium ersetzt. Experimente wurden nach 72 Stunden beendet und die Phosphatase-Aktivität bestimmt. Zusammen mit der Entnahme des 72 Stunden-Überstandes wurden die älteren Proben (24 und 48 Stunden-Wert) aufgetaut und alle dem Protokoll folgend aufbereitet. Dazu wurden die Zellreste abzentrifugiert und aus 25 µL des geklärten Überstandes folgend dem *Great EscAPe™ Kit* mit Hilfe des MicroLumat LB96P (Berthold) die Phosphatase-Aktivität bestimmt. Dieses geschah 20 Minuten nach Zugabe des Substrates für 1 und 10 Sekunden.

4.2.1.4 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde den Protokollen des *EndoFree® Plasmid Purification Handbook* (Maxi) oder dem *QIAprep® Miniprep Handbook* und den dazugehörigen Kits von Qiagen folgend gewonnen.

4.2.1.5 Sequenzgerichtete Mutationen

Die Mutagenese der Promotorkonstrukte, Minigene und Vektoren erfolgte nach dem Protokoll und mittels des *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Dazu wurden die angegebenen Primer (4.1.8 und 4.1.13) genutzt. Zur Herstellung der Δ PRDM1- und Δ NF- κ B- bzw. Δ PRDM1/ Δ NF- κ B-Konstrukte wurde der Vektor (des Δ PRDM1- bzw. kompletten Tapasinpromotors) als Template im Vektor pSEAP2-Basic genutzt.

4.2.1.6 Gewinnung unmarkierter Gesamt-RNA

Bei der Präparation von Gesamt-RNA, welche nicht der Aufreinigung neusynthetisierter RNA diene und bei der die Zellen nicht dementsprechend vorbehandelt worden waren, wurde nach dem Protokoll des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) gearbeitet. Zuvor wurden 5×10^5 Zellen mittels und folgend dem Protokoll des *QIAshredder* (Qiagen) lysiert und homogenisiert.

4.2.1.7 Markierung neusynthetisierter RNA und deren Aufreinigung

Je 5×10^5 adhärenente humane Fibroblasten (MRC-5 Zellen) wurden mit 4 mL/Loch in einer 6-Loch-Zellkultur-Platte kultiviert. Zur Markierung von neusynthetisierter RNA wurde 4-Thiouridin-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 200 μ M ins Medium zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation mit dem 4-Thiouridin wurde das Medium komplett von den Zellen entfernt, diese mit einem Milliliter (1 mL) Trizol geerntet (Zellschaber) und die Lösung von jeweils sechs 6-Loch-Zellkulturplatten vereinigt. Die resultierende Lösung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur gelagert, um alle Nukleoproteinkomplexe zu denaturieren. Anschließend wurden 1,2 mL Chloroform (Chloroform, Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1) zugegeben und die Lösung gut gemixt. Nach 2 bis 3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation (15 Minuten, 4 °C für 12.000 g) zur Trennung der wässrigen von der phenolhaltigen Phase. 3 mL der oberen, wässrigen Phase wurden mit demselben Volumen RNA-Präzipitationslösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur vermischt und zur Präzipitation für 20 Minuten bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet erneut zentrifugiert (4 °C, 2 Minuten 7.000 g), vollständig von Flüssigkeit befreit und abschließend in 150 μ L DEPC-H₂O aufgenommen. Um die neusynthetisierte RNA (mit Thiouridin-Einbau) zu biotinylieren, wurden 30 μ g RNA in 210 μ L DEPC-H₂O aufgenommen, mit 30 μ L RNA-Bindepuffer versetzt und danach 60 μ L Biotin-Stammlösung zugegeben. Die resultierende RNA-Lösung (300 μ L) wurde für 90 Minuten und Raumtemperatur bei 800 rpm (Heizblock) geschüttelt. Um nicht gebundenes Biotin zu entfernen, wurde die RNA-Lösung (300 μ L) in *Phase-Lock-Heavy Tubes* für 1 Minute bei 16.000 g „anzentrifugiert“ und währenddessen je 300 μ L Chloroform (Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1) pro Ansatz zugegeben und anschließend gut gemixt (2-3 Minuten, bis sich die Luftblasen vermindern, Vortexmischer). Für 5 Minuten wurde die Lösung bei 20.000 g mittels der *Phase-Lock-Heavy Tubes* aufgetrennt. Die wässrige (obere)

Material und Methoden

Phase wurde folgend mit einem Volumen (der Markierungsreaktion zuvor; 300 μL) Isopropanol inklusive 10 % NaCl vermischt (Vortexmischer). Zur Präzipitation der RNA wurde für 20 Minuten bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit 1 mL Ethanol (70 %, 4 °C) gewaschen (10 Minuten, 4 °C und 20.000 g). Abschließend wurde die RNA in 100 μL 1 \times TE aufgenommen und weiterverarbeitet oder bei -80 °C aufbewahrt. 30 μg biotinylierte RNA (bis zu 100 μg RNA (\leq 100 μL Volumen) möglich) wurden zur Präzipitation der markierten (neusynthetisierten) RNA eingesetzt und dafür 10 Minuten bei 65 °C aufgeköcht, anschließend auf Eis gelagert und mit 100 μL $\mu\text{MacsBeads}$ für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 800 rpm (Heizblock) geschüttelt. Die μMacs -Säulen wurden in den magnetischen Halter montiert und mit 1 mL RNA-Waschpuffer equilibriert. Anschließend wurde die RNA-*Bead*-Lösung auf die Säulen gegeben und der Durchfluss verworfen (oder der Aufreinigung der unmarkierten RNA zugeführt). Die Säulen wurden dann je 3-mal (900 μL) mit 65 °C RNA-Waschpuffer gewaschen (der erste Durchfluss dient ebenfalls der Aufreinigung von unmarkierter RNA, wenn dieses geplant ist). In ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf, 1,5 mL) wurden 750 μL RLT-Puffer (*Qiagen RNeasy MinElute*) vorgelegt und die *Bead*-gekoppelte RNA mittels 2-maliger Spülung mit 100 μL DTT (100 mM DTT) gelöst. Die weitere Aufreinigung passierte nach dem Protokoll von *Qiagen RNeasy MinElute*.

Zur Aufreinigung der unmarkierten RNA (zwei vorherigen Durchflüsse) wurde der jeweilige Durchfluss vereinigt und mit 1 mL Isopropanol (keine NaCl-Zugabe notwendig) versetzt und wie zuvor präzipitiert.

4.2.1.8 Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA geschah nach dem folgenden Schema:

PCR Ansatz:

5,0 μL RNA (1,5 μg DNase I behandelt (wie folgend unter 4.2.1.9))
3,0 μL H₂O (DEPC)
1,0 μL dNTPs (10mM)
1,0 μL Oligo(dT)₂₀ [50 μM], oder *Random hexamers* (50 ng/ μL)
2,0 μL RT-Puffer (10-fach)
1,0 μL SuperScript III Polymerase
2,0 μL DTT (0,1 M)
1,0 μL RNaseOUT
4,0 μL MgCl₂ (25 mM)
1,0 μL RNase H

PCR-Programm:

65 °C, 5 min
<0 °C, 1 min
25 °C 10 min
50 °C 50 min
85 °C 5 min
37 °C 20 min

4.2.1.9 Semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR)

Zur gelelektrophoretischen Analyse von Transkripten (semi-quantitative Auswertung) aus Gesamt-RNA wurde dem *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen) folgend gearbeitet. Dazu wurde stets DNase I behandelte Gesamt-RNA (1 µL DNase I (*Amplification Grade*, Life Technologies) in 1-fachem DNase I Puffer je 1 µg RNA) eingesetzt. Es wurde jeweils eine Zyklenzahl ermittelt, welche für das jeweilige Amplikon eine Analyse des linearen Bereiches der Amplifikation erlaubte (wenn nicht anders markiert, bei gegebener RNA-Menge von 50 ng). Die Anzahl der optimalen Zyklenanzahl wurde in 5er Schritten bestimmt. Für die *Annealing*-Temperatur wurde eine Temperatur gewählt, die zwei Grad geringer war als die des Primers, welcher die niedrigste Schmelztemperatur aufwies (siehe 4.1.9).

PCR Ansatz:

4,0 µL 5x Puffer
 0,5 µL dNTP-Mix (10 mM)
 1,0 µL Primer 1 (0,5 µM)
 1,0 µL Primer 2 (0,5 µM)
 0,5 µL Enzym-Mix
 2,0 µL RNA
 11,0 µL H₂O (DEPC)

PCR-Programm:

50 °C	30 min	
95 °C	15 min	
94 °C	30 sec	X Zyklen
X °C	60 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	

4.2.1.10 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die Echtzeit-Analyse (*real-time*) von Transkripten (quantitative Auswertung) aus Gesamt-RNA wurde mit dem *QuantiTect[®]SYBR[®]Green RT-PCR Kit* (Qiagen) und folgend dem dazugehörigen Protokoll durchgeführt.

Zur quantitativen Analyse der RT-PCRs diente das *LightCycler 1.5* - Gerät sowie die *LightCycler Relative Quantification Software Version 1.01*. Die erhaltenen Kreuzpunkte (*crossing points*) wurden anschließend mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode (Schmittgen and Livak 2008) verrechnet und gegen die Transkriptmengen von GAPDH oder 18SrRNA abgeglichen. Für die qRT-PCR wurden zwischen 150-500 ng DNase I behandelte Gesamt-RNA (1 µL DNase I (*Amplification Grade*, Life Technologies) in 1-fachem DNase I Puffer je 1 µg RNA)

Material und Methoden

eingesetzt. Zum *Annealing* wurde eine Temperatur gewählt, welche zwei Grad geringer war als die des Primers, welcher die niedrigste Schmelztemperatur aufwies (siehe 4.1.6).

<u>PCR Ansatz:</u>	<u>Steigungsmaß:</u>	<u>PCR-Programm:</u>
5,0 µL 2×SYBR Green Mix	20 °C/s	50 °C 20 min
0,5 µL Primer 1 (0,5 µM)	20 °C/s	95 °C 15 min
0,5 µL Primer 2 (0,5 µM)	20 °C/s	94 °C 15 sec
0,1 µL RT Mix	20 °C/s	X °C 30 sec
1,9 µL H ₂ O	2 °C/s	72 °C 30 sec
2,0 µL RNA		45 Zyklen

Zum Ende der Amplifikation wurde in allen Fällen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Diese startete mit einer Denaturierung bei 95 °C (0 Sekunden) und folgender Amplikon-Anlagerung bei 65 °C (60 Sekunden) sowie abschließendem Schmelzen bis 95 Grad mit einem Steigungsmaß (*transition rate / slope*) von 0,1 °C pro Sekunde.

4.2.1.11 Quantitative PCR (qPCR) für cDNA- und gDNA-Analysen (ChIP)

Für die quantitative Analyse von cDNA (4.2.1.8) und Fragmenten aus gDNA der Chromatin Immunpräzipitation wurde das *LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit* (Roche) verwendet. Zur Analyse der PCRs diente das *LightCycler 1.5* - Gerät und die *LightCycler Relative Quantification Software Version 1.01*. Die erhaltenen Kreuzpunkte (*crossing points*) wurden für die gDNA-Analyse mittels einer fiktiven, optimalen Eichgeraden und deren Steigung in Fragmentmengen umgerechnet. Die so bestimmten Werte für den jeweiligen gDNA-Teil von Input und IP wurden verrechnet und die Fragmentmengen in Prozent von 5 % oder 10 % Input dargestellt. Für die *Annealing*-Temperatur wurde eine Temperatur gewählt, die zwei Grad geringer war als die des Primers, welcher die niedrigste Schmelztemperatur aufwies (siehe 4.1.7.).

<u>PCR Ansatz:</u>	<u>Steigungsmaß:</u>	<u>PCR-Programm:</u>
5,0 µL Master Mix	20 °C/s	
1,0 µL Primer 1 (0,5 µM)	20 °C/s	95 °C 10 min
1,0 µL Primer 2 (0,5 µM)	20 °C/s	94 °C 10 sec
11,0 µL H ₂ O	20 °C/s	X °C 10 sec
2,0 µL DNA	20 °C/s	72 °C 10 sec
		45 Zyklen

Zum Ende der Amplifikation wurde in allen Fällen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Diese startete mit einer Denaturierung bei 95 °C (0 Sekunden) und folgendem *Annealing* bei

65 °C (60 Sekunden) sowie abschließendem Schmelzen bis 95 Grad mit einem Steigungsmaß (*transition rate / slope*) von 0,1 °C pro Sekunde.

4.2.1.12 Semiquantitative PCR (sqPCR) für gDNA-Analysen (ChIP)

Für die semiquantitative Analyse von gDNA-Fragmenten der Chromatin Immunpräzipitation wurde die *Taq-Polymerase* (Invitek) verwendet. Die Ansätze wurden in 50 µL-Ansätzen pipettiert und zur Analyse der PCRs wurden 5-15 µL mittels Agarosegel (1,5 %) analysiert. Für die *Annealing*-Temperatur wurde eine Temperatur gewählt, die zwei Grad geringer war als die des Primers, welcher die niedrigste Schmelztemperatur aufwies (siehe 4.1.10).

PCR Ansatz:

5,0 µL 10-fach Reaktionspuffer
1,5 µL MgCl₂ (50 mM)
1,0 µL dNTPs (12,5 mM jeweils)
1,0 µL Primer 1 (0,5 µM)
1,0 µL Primer 2 (0,5 µM)
0,5 µL *Taq*-Polymerase (2,5 Einheiten)
38,0 µL H₂O
2,0 µL gDNA

PCR-Programm:

95 °C	5 min	30 Zyklen
95 °C	60 sec	
X °C	60 sec	
72 °C	60 sec	
72 °C	10 min	

4.2.1.13 Herstellung von RIPA-Zelllysaten

Um RIPA-Lysate anzufertigen wurden je 5×10^5 Zellen von entsprechenden Zellkulturplatten gewonnen (mittels Zellschaber in eiskaltem Medium) für 5 Minuten bei 400 g pelletiert, zum Waschen zweimal in PBS gelöst sowie zentrifugiert (5 Minuten, 4 °C, 400 g) und dann in 100 µL RIPA-Puffer für 20 Minuten (auf Eis) lysiert. Durch 30-minütige Zentrifugation bei 16.000 g wurden Membranreste und Kerne pelletiert und anschließend als Pellet verworfen. Der Überstand, in Probenpuffer (Western) aufgenommen und bei 95 °C für 5 Minuten aufgeköcht, wurde auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und analysiert.

4.2.1.14 Denaturierende SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine in der denaturierenden (mit Natriumdodecylsulfat) SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) erfolgte für 1 Stunde, bei 16 mA pro Gel (in der Minigel-Twin-Apparatur von Biometra und entsprechendem Puffer (Laufpuffer (Western))). Dazu wurde ein Acrylamid-Trenngel (12 %) mitsamt -Sammelgel (5 %) angefertigt (siehe folgendes Schema).

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid (30 %):	4,8 mL	1,5 mL
2 M TRIS/HCl (pH 8,5):	2,5 mL	-
0,5 M TRIS/HCl (pH 6,8):	-	1,2 mL
Saccharose (60 %):	-	2,1 mL
SDS (20 %):	60 µL	45 µL
H ₂ O:	4,5 mL	4,2 mL
TEMED:	24 µL	12 µL
APS (10 %):	144 µL	120 µL

4.2.1.15 Westernblot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Westernblot, durch entsprechende spezifische Antikörper, analysiert. Der Transfer der Proteine auf eine Membran (Protran®-Nitrocellulose-Transfermembran) wurde im Elektrobloetter (Biometra), durch das *Semi-dry*-Blotverfahren und folgendem Aufbau gewährleistet.

Minus-Pol:	3 × Whatman®-Papier (3MM) [feucht in Blotpuffer (Western)] SDS-Gel Protran®-Nitrocellulose-Transfermembran
Plus-Pol:	3 × Whatman®-Papier (3MM) [feucht in Blotpuffer (Western)]

Nach dem Blotten (60 Minuten, 16 V und 1 A) wurde die Membran Ponceau-Rot (Ponceau S Lösung) angefärbt, um den Transfer der Proteine kontrollieren zu können. Nach dem Abwaschen (dreimal mit 1-fach TBST) dieser reversiblen Färbung wurde die Membran für 45 Minuten in 1-fach TBST (inklusive 5 % Milchpulver) blockiert. Anschließend wurde zuerst der primäre Antikörper in dieser Lösung verdünnt (1 zu 500) und die Membran bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert, bevor sie auch mit dem sekundären Antikörper (mit gebundener Peroxidase) unter gleichen Verhältnissen behandelt wurde. Die Lösung des primären Antikörpers wurde nach Benutzung aufbewahrt und mehrfach benutzt, zwischen primärem und sekundärem Antikörper wurde die Membran gewaschen (1-fach TBST, 5-mal, 5 Minuten bei Raumtemperatur). Schließlich wurden die Proteine mittels des *ECL Prime*-Kits auf *BioMax MR*-Filmen als Banden erkennbar gemacht.

4.2.1.16 Protein-Markierung (metabolisch) und Immunpräzipitation

Mittels ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein (*EasyTag Express ^{35}S protein labeling mix* (PerkinElmer)) wurden 1×10^6 Zellen einer metabolischen Markierung unterzogen um die radioaktiv markierten Proteine in der Immunpräzipitation analysieren zu können. Dazu wurden die Zellen für 1 Stunde, bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 in Methionin- und Cystein-freiem Medium kultiviert und so die Aufnahme der gleichzeitig zugegebenen, markierten Aminosäuren ($10\text{ }\mu\text{L}$ ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein ($\sim 10\text{ MBq}$)) erhöht.

Danach wurden die Zellen in 1 mL IP-Lysepuffer für 30 Minuten auf Eis lysiert. Anschließend wurde das Zelllysate für 30 Minuten (16.000 g , $4\text{ }^\circ\text{C}$) zentrifugiert und der resultierende Überstand mit entsprechenden Antikörpern für 1 Stunde bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ in einem Überkopfschüttler inkubiert. Die gebildeten Immunkomplexe wurden danach, mit Protein-A-Sepharose (PAS, $40\text{ }\mu\text{L}$ (1:1 IP-Waschpuffer I)), ebenfalls für 1 Stunde im Überkopfschüttler bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ gebunden. Das PAS-Pellet wurde abschließend mit 1 mL IP-Waschpuffer I und II gewaschen (2-mal 45 Sekunden , 16.000 g), in Probenpuffer (Western) aufgenommen, aufgeköcht und wie unter 4.2.1.14 aufgetrennt ($17 \times 15\text{ cm}$ statt Minigel). Um die präzipitierten Proteine sichtbar zu machen, wurde das resultierende Gel in IP-Fixierpuffer fixiert, entwässert, getrocknet (Geltrockner) und schließlich ein Film *BioMax MR* durch die radioaktiv markierten Proteine belichtet.

4.2.1.17 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Die Gewinnung von Chromatin für die Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) erfolgte nach dem Protokoll und mit den Chemikalien des „*Pierce[®] Chromatin Prep Module*“. 1×10^7 MRC-5 Zellen (humane Fibroblasten) wurden kultiviert und entsprechend stimuliert oder infiziert und mit Formaldehyd (Endkonzentration 1% im Medium) für 10 Minuten bei Raumtemperatur die Proteine und das Chromatin verknüpft. Danach wurden die fixierten Zellen mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 1% im Medium), für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 2-mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber in 10 mL (inklusive $100\text{ }\mu\text{L}$ *Halt Cocktail*) Lösung gebracht und bei 3.000 g für 5 Minuten pelletiert.

Die Zellen wurden mit $500\text{ }\mu\text{L}$ Lysepuffer I (inklusive Proteaseinhibitoren) versetzt und sorgfältig gelöst, für 15 Sekunden gemischt (Vortexmischer) und für 10 Minuten auf Eis

Material und Methoden

inkubiert. Nach Zentrifugation (9.000 g, 3 Minuten) wurden die resultierenden Zellkerne in 500 μ L MNase Verdauerpuffer resuspendiert und 1,5 μ L *Micrococcal Nuclease* (15 Einheiten) zugegeben, um durch die Endonuklease die gDNA partiell abzubauen. Der Verdau fand bei 37 °C für 15 Minuten statt, wobei alle 5 Minuten kurz gemischt (Vortexmischer) wurde. Nach dem Stoppen der Reaktion (50 μ L Stop-Lösung zugeben, mischen (Vortexmischer) und für 5 Minuten auf Eis inkubieren) wurden die Kerne pelletiert (9.000 g, 5 Minuten). Zur Kernlyse wurde das Pellet in 250 μ L Lysepuffer II (inklusive Protease-/Phosphataseinhibitoren) inkubiert (15 Minuten auf Eis, bei 15 Sekunden Mischschritten (Vortexmischer) alle 5 Minuten). Nach einer Zentrifugation bei 9.000 g für 5 Minuten wurde das Chromatin im Überstand abgenommen und bei -80 °C zur Verwendung in der ChIP weggefroren.

Die Chromatin Immunpräzipitation wurde dem *ChIP-IT™ Express* Protokoll (Active Motif) folgend und mit den dazugehörigen Chemikalien durchgeführt. In ein Reaktionsgefäß (Eppendorf, 1,5 mL) wurden 25 μ L Protein G gebundene magnetische Kugeln vorgelegt und 10 μ L ChIP I Puffer, 1 μ L Protease Inhibitor Cocktail, 25 μ g Chromatin (Maximum von 60 μ L, H₂O), 2,5 μ g des gewünschten Antikörpers zugegeben und mit H₂O auf 100 μ L eingestellt. Abschließend wurde die Lösung für 4 Stunden bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Eine Menge von 5 % des Chromatins wird zusätzlich in einem weiteren Reaktionsgefäß (Eppendorf, 1,5 mL) vorgelegt und auf Eis gelagert (Input Probe). Danach wurde das Reaktionsgefäß (Eppendorf, 1,5 mL) in einen magnetischen Ständer gegeben und der Überstand entfernt, das Pellet aus magnetischen Kugeln 1-mal mit 800 μ L ChIP Puffer I und 2-mal mit 800 μ L ChIP-Puffer II gewaschen und in 50 μ L Elutionspuffer AM2 aufgenommen. Um die Kugeln zu lösen, wurde die Mischung für 15 Minuten leicht rotierend inkubiert. Mit 50 μ L *Reverse Cross-linking Buffer* wurde das Chromatin eluiert und im magnetischen Ständer die magnetischen Kugeln aus dem Chromatin entfernt. Synchron wurden das zuvor auf Eis gelagerten Input-Chromatin mit H₂O auf 10 μ L aufgefüllt, 88 μ L ChIP Puffer II und 2 μ L NaCl (5M) zugegeben. Sowohl die ChIP als auch Input Proben wurden für 20 Minuten aufgekocht (95 °C) und anschließend nach Abkühlung mit 2 μ L Proteinase K vermischt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert (zeitgleich wurde bei Raumtemperatur die Proteinase K Stop-Lösung aufgewärmt). Nach der Zugabe von 2 μ L Stop-Lösung war das Chromatin bereit für die PCR-Analyse.

4.2.2 Arbeiten mit prokaryontischen Zellen

4.2.2.1 Chemisch-kompetente *E. coli*

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* wurden „frische“ *E. coli* (Übernachtskultur) in 160 mL LB-Medium bis zu einer Dichte von 0,5 OD₅₅₀ wachsen gelassen. Folgend wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt und für 10 Minuten (3.200 g, 4 °C) pelletiert. Danach folgte je eine Inkubation auf Eis (10 Minuten) und eine Zentrifugation (10 Minuten, 3.200 g, 4 °C) in 40 mL kalten MgCl₂- und CaCl₂-Lösungen zu je 100 mM. Abschließend wurde das resultierende Pellet in 800 µL kaltem 12 %-igem Glycerol (inklusive 100 mM CaCl₂) aufgenommen (30 Minuten auf Eis), in Reaktionsgefäßen (Eppendorf, 1,5 mL) á 60 µL schnell auf -196 °C temperiert und damit zur Lagerung (-80 °C) vorbereitet.

4.2.2.2 Transformation

Zur Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* wurde je einem *E. coli*-Aliquot der entsprechende Vektor zugegeben sowie zeitgleich für 10-15 Minuten auf Eis aufgetaut. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden und einer Lagerung für 2 Minuten auf Eis, wurden die Bakterien nach Zugabe von 1 mL vorgewärmtem LB-Medium (frei von Antibiotika) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert (800 rpm (Heizblock)). Danach wurden sie auf LB-Agar unter Selektionsdruck (Antibiotikum) ausplattiert.

4.2.2.3 *E. coli*-Dauerkulturen

E. coli-Dauerkulturen wurden aus „frischen“ Kulturen (5 mL LB-Medium) hergestellt. Dazu wurde die Kultur im Verhältnis 3:1 mit Glycerol vermischt. Die Dauerkulturen konnten längerfristig bei -80 °C gelagert werden.

4.2.3 Zellkultur-Arbeiten

4.2.3.1 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden in DMEM (Gibco® / Life Technologies), ergänzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS (Gibco® / Life Technologies) und 1 % Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL, Gibco® / Life Technologies), bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Zur Passagierung der Zellen wurden diese mit PBS und anschließend Phenolrot-freier Trypsin-Lösung (2,5% Gibco® / Life Technologies) gewaschen, kurz bei 5 % CO₂ und 37 °C gelagert und schließlich wie gewünscht in Medium verdünnt und ausgesät.

4.2.3.2 Transfektion

Eukaryontische Zellen wurden mittels *SuperFect Transfection Reagent* (Qiagen) den Angaben des Herstellers entsprechend oder folgend dem *General Protocol for nucleofection of adherent cell lines* (Amaxa Biosystems) transfiziert. Zur Transfektion mit dem *Nucleofector™ 2b Device* von Lonza wurde für die hierfür verwendeten Zellen experimentell das Nukleofektions-Programm X001 als optimal bestimmt.

4.2.3.3 Lentivirale Transduktion

Lentiviren wurden in HEK 293T Zellen (60 cm²), bei 80 % Konfluenz hergestellt. Dazu wurden je 6 µg des Transfer-Vektors (inklusive entsprechendem Konstrukt), des Vektors pCD/NL-BH (Gag/Pol, Tat, Rev) sowie pCMV-VSV-G (VSV-G) transfiziert. Dieses geschah mittels Polyethylenimin (PEI). 955 µL DMEM Medium wurden dazu mit 45 µL PEI (1 µg/µL) vermischt und parallel mit DMEM Medium die je 6 µg Vektor-DNA auf 1 mL aufgefüllt. Nach kurzem Vermischen beider Lösungen wurden diese für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde der Transfektionsmix mit 4 mL frischem DMEM Medium (wie unter 4.2.3.1) auf die Zellen gegeben und diese über Nacht inkubiert. Nach erneuter Zugabe von frischem Medium (4.2.3.1) wurde für 24 Stunden Überstand (inklusive Lentiviren) produziert und dieser steril filtriert (0,45 µm Filter). Versetzt mit

Protamin (10 µg/mL) wurden je 3 mL des Überstandes auf die zu transduzierenden Zellen (ca. 5×10^5) gegeben. Diese wurden für 15-20 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ gelagert bevor die Transduktionseffizienz durch Zentrifugation (2 Stunden, 800g) erhöht wurde. Die Selektion von erfolgreich transduzierten Zellen passierte mittels Puromycin (5 µg/mL).

4.2.3.4 Kryokonservierung humaner Zellen

Um eine dauerhafte Konservierung von Zellen zu gewährleisten, wurden diese bei -196 °C gelagert (Cryotherm Biosafe MD). Dieses geschah mit der Hilfe von Einfriermedium in 1,8 mL-Kryoröhrchen (Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc.) und Einfrierbehältern (Nalgene®, Thermo Fisher Scientific Inc.), wodurch eine optimale Gefriertrate von -1 °C pro Minute erreicht werden konnte.

Einzufrierende Zellen wurden abtrypsiniert (siehe 4.2.3.1) in Medium aufgenommen, bei 400 g für 5 Minuten (Zentrifugengefäß, 50 mL) pelletiert, in 1,5 mL Einfriermedium aliquotiert, wie zuvor beschrieben auf -80 °C temperiert und abschließend bei -196 °C (flüssiger Stickstoff) aufbewahrt.

4.2.4 Arbeiten mit HCMV

4.2.4.1 Infektionsversuche mit HCMV

HCMV-Infektionen (in der Zellkultur) wurden grundsätzlich durch Zentrifugation optimiert. Dazu wurde ausschließlich mit Zellkulturen in Zellkulturplatten gearbeitet und diese bei Raumtemperatur 2-mal für 20 Minuten bei 800 g zentrifugiert.

5 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ActD	Actinomycin D
β_2m	Beta-2-Mikroglobulin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}C$	Grad Celcius
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer binding protein</i>
CHX	Cycloheximid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	alle vier Desoxynukleotide (A, C, G, T)
DPE	<i>downstream core promotor element</i>
ds	<i>double stranded</i> , Doppelstrang/doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	<i>Early</i>
EBNA1	<i>EBV nuclear antigen 1</i>
EBV	Epstein Barr Virus, Humanes Herpes Virus 4, HHV 4
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
gp	<i>gene product</i> , Gen-Produkt
GR	<i>glucocorticoid receptor</i>
G-run	<i>Guanosine-run</i> , Guanosin-Wiederholung (GGGG)
GTF	<i>general transcription factors</i>
h	<i>hour</i> , Stunde
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , Humanes Leukozytenantigen

Abkürzungsverzeichnis

HSV-1	Humanes Herpesvirus 1, HHV-1
hnRNP	<i>heterogeneous ribonucleoprotein</i> , nukleäres Ribonucleoprotein
h.p.i.	<i>hours post infection</i> , Stunden nach Infektion
IE	<i>Immediate early</i>
IFN $\alpha/\beta/\gamma$	Interferon alpha, beta, gamma
IHNV	<i>Infectious hematopoietic necrosis virus</i>
IL	Interleukin
<i>Inr</i>	<i>initiator element</i>
IP	Immunpräzipitation
IRF-3	<i>interferon regulatory factor-3</i>
k	Kilo (10^3)
kDa	Kilodalton
L	Liter (mL, μ L)
L	Late
LANA-1	<i>latency-associated nuclear antigen 1</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i> , Nährmedium nach Giuseppe Bertani
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
M	Mol pro Liter (Konzentration)
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MIEP	<i>major immediate-early promoter</i>
min	<i>minute</i> , Minute
mock	gleich behandelt ohne Infektion
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid</i> , 3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano (10^{-9})
NC2	<i>negative cofactor 2</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
p	Piko (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Abkürzungsverzeichnis

pAK	polyklonaler Antikörper
PAS	Protein A Sepharose
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> , Wasserstoffionen-Aktivität
PIC	<i>preinitiation complex</i>
PIC	<i>protease inhibitor cocktail</i>
PLC	<i>peptide loading complex</i> , Peptidbeladungskomplex
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonylfluoride</i> , Phenylmethylsulfonylfluorid
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay (buffer)</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
Sp1	<i>specificity protein 1</i>
ss	<i>single stranded</i> , Einzelstrang/einzelsträngig
Std. n. I.	Stunden nach Infektion
TAF	<i>TBP associated factor</i>
TBE	<i>Tris, boric acid and EDTA buffer</i> ; TRIS, Borsäure und EDTA Puffer
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TBST	<i>tris-buffered saline with Tween 20</i> ; TRIS, Natriumchlorid Puffer mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TNF α	<i>Tumor necrosis faktor alpha</i> , Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstartpunkt
Tween 20	Polysorbat 20 (Sigma-Aldrich)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen je Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht je Volumen
wt	Wildtyp

6 Literaturverzeichnis

1. Abarca-Heidemann K., Friederichs S., Klamp T., Boehm U., Guethlein L.A., and Ortman B. (2002). Regulation of the expression of mouse TAP-associated glycoprotein (tapasin) by cytokines. *Immunology Letters*. **83**(3): p. 197-207.
2. Adelman K. and Lis J.T. (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat Rev Genet*. **13**(10): p. 720-731.
3. Ahn K., Angulo A., Ghazal P., Peterson P.A., Yang Y., and Früh K. (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **93**(20): p. 10990-10995.
4. Albert T.K., Grote K., Boeing S., and Meisterernst M. (2010). Basal core promoters control the equilibrium between negative cofactor 2 and preinitiation complexes in human cells. *Genome Biol*. **11**(3): p. R33.
5. Baltimore D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*. **35**(3): p. 235-41.
6. Banerji J., Rusconi S., and Schaffner W. (1981). Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*. **27**(2 Pt 1): p. 299-308.
7. Bangia N., Lehner P.J., Hughes E.A., Surman M., and Cresswell P. (1999). The N-terminal region of tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex. *Eur J Immunol*. **29**(6): p. 1858-70.
8. Barnden M.J., Purcell A.W., Gorman J.J., and McCluskey J. (2000). Tapasin-Mediated Retention and Optimization of Peptide Ligands During the Assembly of Class I Molecules. *The Journal of Immunology*. **165**(1): p. 322-330.
9. Barreau C., Paillard L., and Osborne H.B. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Research*. **33**(22): p. 7138-7150.
10. Bartel D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. **116**(2): p. 281-297.
11. Beijerinck M.W., *Ueber ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter*. 1898: Koninkl. akad. van wetenschappen.
12. Belicha-Villanueva A., Golding M., McEvoy S., Sarvaiya N., Cresswell P., Gollnick S.O., and Bangia N. (2010). Identification of an alternate splice form of tapasin in human melanoma. *Hum Immunol*. **71**(10): p. 1018-26.
13. Benz C. and Hengel H., *MHC Class I-Subversive Gene Functions of Cytomegalovirus and their Regulation by Interferons-an Intricate Balance*, in *Molecular Evolution of Viruses — Past and Present*, Y. Becker and G. Darai, Editors. 2000, Springer US. p. 39-47.

Literaturverzeichnis

14. Beutler N., Hauka S., Niepel A., Kowalewski D.J., Uhlmann J., Ghanem E., . . . Halenius A. (2013). A natural tapasin isoform lacking exon 3 modifies peptide loading complex function. *Eur J Immunol*.
15. Biegalka B.J., Lester E., Branda A., and Rana R. (2004). Characterization of the Human Cytomegalovirus UL34 Gene. *Journal of Virology*. **78**(17): p. 9579-9583.
16. Biesecker L.G., Mullikin J.C., Facio F.M., Turner C., Cherukuri P.F., Blakesley R.W., . . . Green E.D. (2009). The ClinSeq Project: piloting large-scale genome sequencing for research in genomic medicine. *Genome Res*. **19**(9): p. 1665-74.
17. Bodaghi B., Goureau O., Zipeto D., Laurent L., Virelizier J.-L., and Michelson S. (1999). Role of IFN- γ -Induced Indoleamine 2,3 Dioxygenase and Inducible Nitric Oxide Synthase in the Replication of Human Cytomegalovirus in Retinal Pigment Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*. **162**(2): p. 957-964.
18. Borysiewicz L.K., Graham S., Hickling J.K., Mason P.D., and Sissons J.G. (1988). Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: their precursor frequency and stage specificity. *Eur J Immunol*. **18**(2): p. 269-75.
19. Brennecke J., Stark A., Russell R.B., and Cohen S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology*. **3**(3).
20. Browning D.F. and Busby S.J.W. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Micro*. **2**(1): p. 57-65.
21. Bukur J., Herrmann F., Handke D., Recktenwald C., and Seliger B. (2010). Identification of E2F1 as an Important Transcription Factor for the Regulation of Tapasin Expression. *Journal of Biological Chemistry*. **285**(40): p. 30419-30426.
22. Bulger M. and Groudine M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*. **144**(3): p. 327-39.
23. Burke T.W. and Kadonaga J.T. (1996). Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev*. **10**(6): p. 711-24.
24. Burke T.W. and Kadonaga J.T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes & Development*. **11**(22): p. 3020-3031.
25. Butler J.E. and Kadonaga J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev*. **16**(20): p. 2583-92.
26. Canaan A., Haviv I., Urban A.E., Schulz V.P., Hartman S., Zhang Z., . . . Weissman S.M. (2009). EBNA1 regulates cellular gene expression by binding cellular promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106**(52): p. 22421-22426.
27. Cantrell S.R. and Bresnahan W.A. (2005). Interaction between the human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) and hDaxx regulates immediate-early gene expression and viral replication. *J Virol*. **79**(12): p. 7792-802.

28. Cao J. and Geballe A.P. (1996). Inhibition of nascent-peptide release at translation termination. *Molecular and Cellular Biology*. **16**(12): p. 7109-14.
29. Caput D., Beutler B., Hartog K., Thayer R., Brown-Shimer S., and Cerami A. (1986). Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **83**(6): p. 1670-1674.
30. Carninci P., Sandelin A., Lenhard B., Katayama S., Shimokawa K., Ponjavic J., . . . Hayashizaki Y. (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet*. **38**(6): p. 626-635.
31. Caspar D.L. and Klug A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **27**: p. 1-24.
32. Chee M.S., Bankier A.T., Beck S., Bohni R., Brown C.M., Cerny R., . . . Barrell B.G., *Analysis of the Protein-Coding Content of the Sequence of Human Cytomegalovirus Strain AD169*, in *Cytomegaloviruses*, J. McDougall, Editor. 1990, Springer Berlin Heidelberg. p. 125-169.
33. Chen C.-Y.A. and Shyu A.-B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*. **20**(11): p. 465-470.
34. Chou M.Y., Rooke N., Turck C.W., and Black D.L. (1999). hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Molecular and Cellular Biology*. **19**(1): p. 69-77.
35. Cloutier N. and Flamand L. (2010). Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus Latency-associated Nuclear Antigen Inhibits Interferon (IFN) β Expression by Competing with IFN Regulatory Factor-3 for Binding to IFNB Promoter. *Journal of Biological Chemistry*. **285**(10): p. 7208-7221.
36. Compton T. (2004). Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends in Cell Biology*. **14**(1): p. 5-8.
37. Cuevas-Bennett C. and Shenk T. (2008). Dynamic Histone H3 Acetylation and Methylation at Human Cytomegalovirus Promoters during Replication in Fibroblasts. *Journal of Virology*. **82**(19): p. 9525-9536.
38. Dani C., Piechaczyk M., Audigier Y., El Sabouty S., Cathala G., Marty L., . . . Jeanteur P. (1984). Characterization of the transcription products of glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase gene in HeLa cells. *European Journal of Biochemistry*. **145**(2): p. 299-304.
39. Danilczyk U.G., Cohen-Doyle M.F., and Williams D.B. (2000). Functional relationship between calreticulin, calnexin, and the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin. *J Biol Chem*. **275**(17): p. 13089-97.

Literaturverzeichnis

40. Davison A., Eberle R., Ehlers B., Hayward G., McGeoch D., Minson A., . . . Thiry E. (2009). The order Herpesvirales. *Archives of Virology*. **154**(1): p. 171-177.
41. Davison A.J. (2002). Evolution of the herpesviruses. *Veterinary Microbiology*. **86**(1–2): p. 69-88.
42. Dick T.P., Bangia N., Peaper D.R., and Cresswell P. (2002). Disulfide Bond Isomerization and the Assembly of MHC Class I-Peptide Complexes. *Immunity*. **16**(1): p. 87-98.
43. Dissemmond J., Kothen T., Mörs J., Weimann T.K., Lindeke A., Goos M., and Wagner S.N. (2003). Downregulation of tapasin expression in progressive human malignant melanoma. *Archives of Dermatological Research*. **295**(2): p. 43-49.
44. Doerfler W. (1991). Patterns of DNA methylation--evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism. A proposal. *Biol Chem Hoppe Seyler*. **372**(8): p. 557-64.
45. Dölken L. and Jonjic S. (2009). All for One and One for All: Herpesviral MicroRNAs Close in on Their Prey. *Cell Host & Microbe*. **5**(4): p. 315-317.
46. Dolken L., Ruzsics Z., Radle B., Friedel C.C., Zimmer R., Mages J., . . . Koszinowski U.H. (2008). High-resolution gene expression profiling for simultaneous kinetic parameter analysis of RNA synthesis and decay. *RNA*. **14**(9): p. 1959-72.
47. Dong G., Wearsch P.A., Peaper D.R., Cresswell P., and Reinisch K.M. (2009). Insights into MHC Class I Peptide Loading from the Structure of the Tapasin-ERp57 Thiol Oxidoreductase Heterodimer. *Immunity*. **30**(1): p. 21-32.
48. Doody G.M., Stephenson S., McManamy C., and Tooze R.M. (2007). PRDM1/BLIMP-1 Modulates IFN- γ -Dependent Control of the MHC Class I Antigen-Processing and Peptide-Loading Pathway. *The Journal of Immunology*. **179**(11): p. 7614-7623.
49. Driessler F., Venstrom K., Sabat R., Asadullah K., and Schottelius A.J. (2004). Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF- κ B activity: a role for p50. *Clinical & Experimental Immunology*. **135**(1): p. 64-73.
50. Dynan W.S. and Tjian R. (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*. **35**(1): p. 79-87.
51. Ehltng C., Lai W.S., Schaper F., Brenndörfer E.D., Matthes R.-J., Heinrich P.C., . . . Bode J.G. (2007). Regulation of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) mRNA Stability by TNF- α Involves Activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 Cascade. *The Journal of Immunology*. **178**(5): p. 2813-2826.
52. El Ouakfaoui S., Heitz D., Paquin R., and Beaulieu A.D. (1999). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates tapasin expression in human neutrophils. *J Leukoc Biol*. **65**(2): p. 205-10.

Literaturverzeichnis

53. Epstein W. and Beckwith J.R. (1968). Regulation of Gene Expression. *Annual Review of Biochemistry*. **37**(1): p. 411-436.
54. Esquivel F., Yewdell J., and Bennink J. (1992). RMA/S cells present endogenously synthesized cytosolic proteins to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. **175**(1): p. 163-8.
55. Farrell H.E., Vally H., Lynch D.M., Fleming P., Shellam G.R., Scalzo A.A., and Davis-Poynter N.J. (1997). Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature*. **386**(6624): p. 510-514.
56. Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., and Sonenberg N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*. **9**(2): p. 102-114.
57. Fowler K.B., Stagno S., Pass R.F., Britt W.J., Boll T.J., and Alford C.A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med*. **326**(10): p. 663-7.
58. Fraser C.M., Gocayne J.D., White O., Adams M.D., Clayton R.A., Fleischmann R.D., . . . Venter J.C. (1995). The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*. **270**(5235): p. 397-404.
59. Friedman R.C., Farh K.K.-H., Burge C.B., and Bartel D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*. **19**(1): p. 92-105.
60. Fullwood M.J., Han Y., Wei C.L., Ruan X., and Ruan Y. (2010). Chromatin interaction analysis using paired-end tag sequencing. *Curr Protoc Mol Biol*. **Chapter 21**: p. Unit 21 15 1-25.
61. Fullwood M.J., Liu M.H., Pan Y.F., Liu J., Xu H., Mohamed Y.B., . . . Ruan Y. (2009). An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature*. **462**(7269): p. 58-64.
62. Furset G., Fløisand Y., and Sioud M. (2008). Impaired expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in monocyte-derived dendritic cells in response to Toll-like receptor-7/8 ligands. *Immunology*. **123**(2): p. 263-271.
63. Gaboli M., Kotsi P.A., Gurrieri C., Cattoretti G., Ronchetti S., Cordon-Cardo C., . . . Pandolfi P.P. (2001). Mzf1 controls cell proliferation and tumorigenesis. *Genes & Development*. **15**(13): p. 1625-1630.
64. Garneau D., Revil T., Fiset J.-F., and Chabot B. (2005). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein F/H Proteins Modulate the Alternative Splicing of the Apoptotic Mediator Bcl-x. *Journal of Biological Chemistry*. **280**(24): p. 22641-22650.
65. Gatherer D., Seirafian S., Cunningham C., Holton M., Dargan D.J., Baluchova K., . . . Davison A.J. (2011). High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**(49): p. 19755-19760.

Literaturverzeichnis

66. Gerritsen M.E., Williams A.J., Neish A.S., Moore S., Shi Y., and Collins T. (1997). CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(7): p. 2927-32.
67. Gershenzon N.I. and Ioshikhes I.P. (2005). Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis. *Bioinformatics.* **21**(8): p. 1295-300.
68. Ghosh S. and Hayden M.S. (2008). New regulators of NF-[kappa]B in inflammation. *Nat Rev Immunol.* **8**(11): p. 837-848.
69. Gil R., Sabater-Muñoz B., Latorre A., Silva F.J., and Moya A. (2002). Extreme genome reduction in *Buchnera* spp.: Toward the minimal genome needed for symbiotic life. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **99**(7): p. 4454-4458.
70. Gilbert M.J., Riddell S.R., Plachter B., and Greenberg P.D. (1996). Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature.* **383**(6602): p. 720-722.
71. Goodman R.H. and Smolik S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes & Development.* **14**(13): p. 1553-1577.
72. Gozani O., Feld R., and Reed R. (1996). Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A. *Genes and Development.* **10**(2): p. 233-243.
73. Grainger L., Cicchini L., Rak M., Petrucelli A., Fitzgerald K.D., Semler B.L., and Goodrum F. (2010). Stress-Inducible Alternative Translation Initiation of Human Cytomegalovirus Latency Protein pUL138. *Journal of Virology.* **84**(18): p. 9472-9486.
74. Greaves R.F., Brown J.M., Vieira J., and Mocarski E.S. (1995). Selectable insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome using the *Escherichia coli* guanosine phosphoribosyl transferase (gpt) gene. *Journal of General Virology.* **76**(9): p. 2151-2160.
75. Green M.R. and Sambrook J., *Molecular cloning : a laboratory manual.* 2012, Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
76. Greenwood A.D., Tsangaras K., Ho S.Y., Szentiks C.A., Nikolin V.M., Ma G., . . . Osterrieder N. (2012). A potentially fatal mix of herpes in zoos. *Curr Biol.* **22**(18): p. 1727-31.
77. Greenwood R., Shimizu Y., Sekhon G.S., and DeMars R. (1994). Novel allele-specific, post-translational reduction in HLA class I surface expression in a mutant human B cell line. *J Immunol.* **153**(12): p. 5525-36.
78. Grey F., Meyers H., White E.A., Spector D.H., and Nelson J. (2007). A Human Cytomegalovirus-Encoded microRNA Regulates Expression of Multiple Viral Genes Involved in Replication. *PLoS Pathog.* **3**(11): p. e163.

Literaturverzeichnis

79. Gruber A.R., Fallmann J., Kratochvill F., Kovarik P., and Hofacker I.L. (2011). AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic Acids Res.* **39(Database issue)**: p. D66-9.
80. Halenius A., Hauka S., Dolken L., Stindt J., Reinhard H., Wiek C., . . . Hengel H. (2011). Human cytomegalovirus disrupts the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex and inhibits tapasin gene transcription. *J Virol.* **85(7)**: p. 3473-85.
81. Halenius A., Momburg F., Reinhard H., Bauer D., Lobigs M., and Hengel H. (2006). Physical and Functional Interactions of the Cytomegalovirus US6 Glycoprotein with the Transporter Associated with Antigen Processing. *Journal of Biological Chemistry.* **281(9)**: p. 5383-5390.
82. Hammond S.M., Boettcher S., Caudy A.A., Kobayashi R., and Hannon G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science.* **293(5532)**: p. 1146-1150.
83. Hansen S.G., Powers C.J., Richards R., Ventura A.B., Ford J.C., Siess D., . . . Fruh K. (2010). Evasion of CD8+ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science.* **328(5974)**: p. 102-6.
84. Harvey Lodish A.B., Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. (2000). Molecular Cell Biology, 4th edition. *Book*.
85. Haugen S.P., Ross W., and Gourse R.L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat Rev Micro.* **6(7)**: p. 507-519.
86. Hengel H., Brune W., and Koszinowski U.H. (1998). Immune evasion by cytomegalovirus—survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends in Microbiology.* **6(5)**: p. 190-197.
87. Hengel H., Koopmann J.-O., Flohr T., Muranyi W., Goulmy E., Hämmerling G.J., . . . Momburg F. (1997). A Viral ER-Resident Glycoprotein Inactivates the MHC-Encoded Peptide Transporter. *Immunity.* **6(5)**: p. 623-632.
88. Hengel H., Lucin P., Jonjic S., Ruppert T., and Koszinowski U.H. (1994). Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J Virol.* **68(1)**: p. 289-97.
89. Hengel H., Reusch U., Geginat G., Holtappels R., Ruppert T., Hellebrand E., and Koszinowski U.H. (2000). Macrophages escape inhibition of major histocompatibility complex class I-dependent antigen presentation by cytomegalovirus. *J Virol.* **74(17)**: p. 7861-8.
90. Herberg J.A., Beck S., and Trowsdale J. (1998). TAPASIN, DAXX, RGL2, HKE2 and four new genes (BING 1, 3 to 5) form a dense cluster at the centromeric end of the MHC. *Journal of Molecular Biology.* **277(4)**: p. 839-857.

Literaturverzeichnis

91. Herberg J.A., Sgouros J., Jones T., Copeman J., Humphray S.J., Sheer D., . . . Trowsdale J. (1998). Genomic analysis of the Tapasin gene, located close to the TAP loci in the MHC. *European Journal of Immunology*. **28**(2): p. 459-467.
92. Herrmann F., Trowsdale J., Huber C., and Seliger B. (2003). Cloning and functional analyses of the mouse tapasin promoter. *Immunogenetics*. **55**(6): p. 379-388.
93. Hershkovitz D., Gross Y., Nahum S., Yehezkel S., Sarig O., Uitto J., and Sprecher E. (2011). Functional Characterization of SAMD9, a Protein Deficient in Normophosphatemic Familial Tumoral Calcinosis. *J Invest Dermatol*. **131**(3): p. 662-669.
94. Hewitt E.W., Gupta S.S., and Lehner P.J. (2001). The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *EMBO J*. **20**(3): p. 387-396.
95. Hiller M., Zhang Z., Backofen R., and Stamm S. (2007). Pre-mRNA Secondary Structures Influence Exon Recognition. *PLoS Genet*. **3**(11): p. e204.
96. Horton R., Wilming L., Rand V., Lovering R.C., Bruford E.A., Khodiyar V.K., . . . Beck S. (2004). Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. **5**(12): p. 889-899.
97. Howarth M., Williams A., Tolstrup A.B., and Elliott T. (2004). Tapasin enhances MHC class I peptide presentation according to peptide half-life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**(32): p. 11737-42.
98. Hsu J.Y., Juven-Gershon T., Marr M.T., 2nd, Wright K.J., Tjian R., and Kadonaga J.T. (2008). TBP, Mot1, and NC2 establish a regulatory circuit that controls DPE-dependent versus TATA-dependent transcription. *Genes Dev*. **22**(17): p. 2353-8.
99. Huang M.T.F. and Gorman C.M. (1990). Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Research*. **18**(4): p. 937-947.
100. Hulpke S., Tomioka M., Kremmer E., Ueda K., Abele R., and Tampé R. (2012). Direct evidence that the N-terminal extensions of the TAP complex act as autonomous interaction scaffolds for the assembly of the MHC I peptide-loading complex. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **69**(19): p. 3317-3327.
101. Hwang J. and Kalejta R.F. (2007). Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. *Virology*. **367**(2): p. 334-338.
102. Ishihama A. (2012). Prokaryotic genome regulation: a revolutionary paradigm. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. **88**(9): p. 485-508.
103. Jablonski J.A., Buratti E., Stuani C., and Caputi M. (2008). The Secondary Structure of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcript Modulates Viral Splicing and Infectivity. *Journal of Virology*. **82**(16): p. 8038-8050.

Literaturverzeichnis

104. Jabs D.A., Enger C., and Bartlett J.G. (1989). Cytomegalovirus retinitis and acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of ophthalmology*. **107**(1): p. 75-80.
105. Jacob F. (1966). Genetik der Bakterienzelle. Nobelvortrag am 11. Dezember 1965. *Angewandte Chemie*. **78**(14): p. 704-713.
106. Jacob F. and Monod J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol*. **3**: p. 318-56.
107. Jacob F., Ullman A., and Monod J. (1964). [THE PROMOTOR, A GENETIC ELEMENT NECESSARY TO THE EXPRESSION OF AN OPERON]. *C R Hebd Seances Acad Sci*. **258**: p. 3125-8.
108. Jault F.M., Jault J.M., Ruchti F., Fortunato E.A., Clark C., Corbeil J., . . . Spector D.H. (1995). Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *Journal of Virology*. **69**(11): p. 6697-704.
109. Johnson D.R. and Mook-Kanamori B. (2000). Dependence of Elevated Human Leukocyte Antigen Class I Molecule Expression on Increased Heavy Chain, Light Chain (β 2-Microglobulin), Transporter Associated with Antigen Processing, Tapasin, and Peptide. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(22): p. 16643-16649.
110. Johnson D.S., Mortazavi A., Myers R.M., and Wold B. (2007). Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science*. **316**(5830): p. 1497-502.
111. Johnson P.F. and McKnight S.L. (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem*. **58**: p. 799-839.
112. Jones T.R., Wiertz E.J., Sun L., Fish K.N., Nelson J.A., and Ploegh H.L. (1996). Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **93**(21): p. 11327-11333.
113. Juven-Gershon T., Hsu J.-Y., Theisen J.W.M., and Kadonaga J.T. (2008). The RNA polymerase II core promoter — the gateway to transcription. *Current Opinion in Cell Biology*. **20**(3): p. 253-259.
114. Juven-Gershon T., Hsu J., and Kadonaga J. (2006). Molecular Basis of Transcription. *Biochemical Society Transactions*. **34**(part 6).
115. Juven-Gershon T. and Kadonaga J.T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology*. **339**(2): p. 225-229.
116. Kadonaga J.T. (2002). The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Experimental and Molecular Medicine*. **34**(4): p. 259-264.
117. Kalejta R.F., *Functions of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins Prior to Immediate Early Gene Expression*, in *Human Cytomegalovirus*, T. Shenk and M. Stinski, Editors. 2008 a, Springer Berlin Heidelberg. p. 101-115.

Literaturverzeichnis

118. Kalejta R.F. (2008 b). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev.* **72**(2): p. 249-265.
119. Khan K.A., Coaquette A., Davrinche C., and Herbein G. (2009). Bcl-3-Regulated Transcription from Major Immediate-Early Promoter of Human Cytomegalovirus in Monocyte-Derived Macrophages. *The Journal of Immunology.* **182**(12): p. 7784-7794.
120. Khan S., de Giuli R., Schmidtke G., Bruns M., Buchmeier M., van den Broek M., and Groettrup M. (2001). Cutting edge: neosynthesis is required for the presentation of a T cell epitope from a long-lived viral protein. *J Immunol.* **167**(9): p. 4801-4.
121. Kienast A., Preuss M., Winkler M., and Dick T.P. (2007). Redox regulation of peptide receptivity of major histocompatibility complex class I molecules by ERp57 and tapasin. *Nat Immunol.* **8**(8): p. 864-72.
122. Kim E., Magen A., and Ast G. (2007). Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **35**(1): p. 125-31.
123. Kim T.H., Barrera L.O., Zheng M., Qu C., Singer M.A., Richmond T.A., . . . Ren B. (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature.* **436**(7052): p. 876-80.
124. Kotenko S.V., Sacconi S., Izotova L.S., Mirochnitchenko O.V., and Pestka S. (2000). Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **97**(4): p. 1695-1700.
125. Kowalik T.F., Wing B., Haskill J.S., Azizkhan J.C., Baldwin A.S., and Huang E.S. (1993). Multiple mechanisms are implicated in the regulation of NF-kappa B activity during human cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **90**(3): p. 1107-1111.
126. Krek A., Grün D., Poy M.N., Wolf R., Rosenberg L., Epstein E.J., . . . Rajewsky N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics.* **37**(5): p. 495-500.
127. Krol J., Loedige I., and Filipowicz W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* **11**(9): p. 597-610.
128. Kunsch C., Ruben S.M., and Rosen C.A. (1992). Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology.* **12**(10): p. 4412-4421.
129. Kwong A.D., Kruper J.A., and Frenkel N. (1988). Herpes simplex virus virion host shutoff function. *Journal of Virology.* **62**(3): p. 912-921.
130. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Meyer J., Borkhardt A., and Tuschl T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA.* **9**(2): p. 175-179.

Literaturverzeichnis

131. Landis E., Palti Y., Dekoning J., Drew R., Phillips R., and Hansen J. (2006). Identification and regulatory analysis of rainbow trout tapasin and tapasin-related genes. *Immunogenetics*. **58**(1): p. 56-69.
132. Lareau L.F., Inada M., Green R.E., Wengrod J.C., and Brenner S.E. (2007). Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature*. **446**(7138): p. 926-929.
133. Le Mée S., Fromigué O., and Marie P.J. (2005). Sp1/Sp3 and the myeloid zinc finger gene MZF1 regulate the human N-cadherin promoter in osteoblasts. *Experimental Cell Research*. **302**(1): p. 129-142.
134. Lee J.-S. and Shilatifard A. (2007). A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **618**(1-2): p. 130-134.
135. Lee R.C., Feinbaum R.L., and Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. **75**(5): p. 843-54.
136. Lee W., Haslinger A., Karin M., and Tjian R. (1987). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature*. **325**(6102): p. 368-72.
137. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., . . . Kim V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. **425**(6956): p. 415-419.
138. Lefave C.V., Squatrito M., Vorlova S., Rocco G.L., Brennan C.W., Holland E.C., . . . Cartegni L. (2011). Splicing factor hnRNPH drives an oncogenic splicing switch in gliomas. *EMBO J*. **30**(19): p. 4084-97.
139. Lemon B. and Tjian R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & Development*. **14**(20): p. 2551-2569.
140. Leonhardt R.M., Keusekotten K., Bekpen C., and Knittler M.R. (2005). Critical Role for the Tapasin-Docking Site of TAP2 in the Functional Integrity of the MHC Class I-Peptide-Loading Complex. *The Journal of Immunology*. **175**(8): p. 5104-5114.
141. Lettice L.A., Heaney S.J.H., Purdie L.A., Li L., de Beer P., Oostra B.A., . . . de Graaff E. (2003). A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Human Molecular Genetics*. **12**(14): p. 1725-1735.
142. Lewis B.P., Burge C.B., and Bartel D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. **120**(1): p. 15-20.
143. Li G., Fullwood M.J., Xu H., Mulawadi F.H., Velkov S., Vega V., . . . Sung W.K. (2010). ChIA-PET tool for comprehensive chromatin interaction analysis with paired-end tag sequencing. *Genome Biol*. **11**(2): p. R22.

Literaturverzeichnis

144. Lie W.R., Myers N.B., Gorka J., Rubocki R.J., Connolly J.M., and Hansen T.H. (1990). Peptide ligand-induced conformation and surface expression of the Ld class I MHC molecule. *Nature*. **344**(6265): p. 439-41.
145. Lifton R.P., Goldberg M.L., Karp R.W., and Hogness D.S. (1978). The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **42 Pt 2**: p. 1047-51.
146. Lim K.I. (2012). Retroviral integration profiles: their determinants and implications for gene therapy. *BMB Rep*. **45**(4): p. 207-12.
147. Liu Y., Zhang Z., Zhao X., Wei H., Deng J., Cui Z., and Zhang X.E. (2012). Human cytomegalovirus UL94 is a nucleocytoplasmic shuttling protein containing two NLSs and one NES. *Virus Res*. **166**(1-2): p. 31-42.
148. Loeffler and Frosch (1897). Summarischer Bericht über die Ergebnisse der Untersuchungen der Commission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche. *Dtsch med Wochenschr*. **23**(39): p. 617-617.
149. Lu M. and Shenk T. (1996). Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *Journal of Virology*. **70**(12): p. 8850-7.
150. Lund E., Güttinger S., Calado A., Dahlberg J.E., and Kutay U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*. **303**(5654): p. 95-98.
151. Lutz C.S. and Moreira A. (2011). Alternative mRNA polyadenylation in eukaryotes: an effective regulator of gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. **2**(1): p. 22-31.
152. Lwoff A., Horne R., and Tournier P. (1962). A System of Viruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. **27**: p. 51-55.
153. Mahnke K., Bedke T., and Enk A.H. (2007). Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cellular Immunology*. **250**(1-2): p. 1-13.
154. Majewski J. and Ott J. (2002). Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Res*. **12**(12): p. 1827-36.
155. Makar K.W. and Wilson C.B. (2004). Sounds of a silent Blimp-1. *Nat Immunol*. **5**(3): p. 241-242.
156. Malecova B., Gross P., Boyer-Guittaut M., Yavuz S., and Oelgeschlager T. (2007). The initiator core promoter element antagonizes repression of TATA-directed transcription by negative cofactor NC2. *J Biol Chem*. **282**(34): p. 24767-76.
157. Maquat L.E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **5**(2): p. 89-99.

Literaturverzeichnis

158. Marcinowski L., Lidschreiber M., Windhager L., Rieder M., Bosse J.B., Rädle B., . . . Dölken L. (2012). Real-time Transcriptional Profiling of Cellular and Viral Gene Expression during Lytic Cytomegalovirus Infection. *PLoS Pathog.* **8(9)**: p. e1002908.
159. Markel G., Lieberman N., Katz G., Arnon T.I., Lotem M., Drize O., . . . Mandelboim O. (2002). CD66a Interactions Between Human Melanoma and NK Cells: A Novel Class I MHC-Independent Inhibitory Mechanism of Cytotoxicity. *The Journal of Immunology.* **168(6)**: p. 2803-2810.
160. Mavinakere M.S. and Colberg-Poley A.M. (2004). Dual targeting of the human cytomegalovirus UL37 exon 1 protein during permissive infection. *Journal of General Virology.* **85(2)**: p. 323-329.
161. McCullough A.J. and Berget S.M. (2000). An Intronic Splicing Enhancer Binds U1 snRNPs To Enhance Splicing and Select 5' Splice Sites. *Molecular and Cellular Biology.* **20(24)**: p. 9225-9235.
162. McGeoch D.J. and Cook S. (1994). Molecular Phylogeny of the Alphaherpesvirinae Subfamily and a Proposed Evolutionary Timescale. *Journal of Molecular Biology.* **238(1)**: p. 9-22.
163. McGeoch D.J., Cook S., Dolan A., Jamieson F.E., and Telford E.A.R. (1995). Molecular Phylogeny and Evolutionary Timescale for the Family of Mammalian Herpesviruses. *Journal of Molecular Biology.* **247(3)**: p. 443-458.
164. McGeoch D.J., Dolan A., and Ralph A.C. (2000). Toward a Comprehensive Phylogeny for Mammalian and Avian Herpesviruses. *Journal of Virology.* **74(22)**: p. 10401-10406.
165. McGeoch D.J. and Gatherer D. (2005). Integrating Reptilian Herpesviruses into the Family Herpesviridae. *Journal of Virology.* **79(2)**: p. 725-731.
166. McGeoch D.J., Rixon F.J., and Davison A.J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research.* **117(1)**: p. 90-104.
167. Mencia M., Moqtaderi Z., Geisberg J.V., Kuras L., and Struhl K. (2002). Activator-specific recruitment of TFIID and regulation of ribosomal protein genes in yeast. *Mol Cell.* **9(4)**: p. 823-33.
168. Mizzen C.A. and Allis C.D. (1998). Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS.* **54(1)**: p. 6-20.
169. Monod J. and Jacob F. (1961). General Conclusions: Teleonomic Mechanisms in Cellular Metabolism, Growth, and Differentiation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* **26**: p. 389-401.
170. Moore M.J. and Proudfoot N.J. (2009). Pre-mRNA Processing Reaches Back to Transcription and Ahead to Translation. *Cell.* **136(4)**: p. 688-700.
171. Moran N.A. and Wernegreen J.J. (2000). Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Trends in Ecology & Evolution.* **15(8)**: p. 321-326.

Literaturverzeichnis

172. Moreau P., Hen R., Wasylyk B., Everett R., Gaub M.P., and Chambon P. (1981). The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. *Nucleic Acids Res.* **9**(22): p. 6047-68.
173. Moreira D. and Lopez-Garcia P. (2009). Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. *Nat Rev Micro.* **7**(4): p. 306-311.
174. Moshonov S., Elfakess R., Golan-Mashiach M., Sinvani H., and Dikstein R. (2008). Links between core promoter and basic gene features influence gene expression. *BMC Genomics.* **9**: p. 92.
175. Murphy J.C., Fischle W., Verdin E., and Sinclair J.H. (2002). Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J.* **21**(5): p. 1112-20.
176. Na S.Y., Lee S.K., Han S.J., Choi H.S., Im S.Y., and Lee J.W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem.* **273**(18): p. 10831-4.
177. Nachmani D., Stern-Ginossar N., Sarid R., and Mandelboim O. (2009). Diverse Herpesvirus MicroRNAs Target the Stress-Induced Immune Ligand MICB to Escape Recognition by Natural Killer Cells. *Cell Host & Microbe.* **5**(4): p. 376-385.
178. Newton-Foot M. and Gey van Pittius N.C. (2012). The complex architecture of mycobacterial promoters. *Tuberculosis*,(0).
179. Ni J.Z., Grate L., Donohue J.P., Preston C., Nobida N., O'Brien G., . . . Ares M. (2007). Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes & Development.* **21**(6): p. 708-718.
180. Nicholson P., Yepiskoposyan H., Metze S., Zamudio Orozco R., Kleinschmidt N., and Mühlemann O. (2010). Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **67**(5): p. 677-700.
181. Noonan J.P. and McCallion A.S. (2010). Genomics of Long-Range Regulatory Elements. *Annual Review of Genomics and Human Genetics.* **11**(1): p. 1-23.
182. Noppert S.J., Fitzgerald K.A., and Hertzog P.J. (2007). The role of type I interferons in TLR responses. *Immunol Cell Biol.* **85**(6): p. 446-457.
183. Noriega V., Redmann V., Gardner T., and Tortorella D. (2012). Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunol Res.* **54**(1-3): p. 140-51.
184. Odom D.T., Dowell R.D., Jacobsen E.S., Gordon W., Danford T.W., MacIsaac K.D., . . . Fraenkel E. (2007). Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nat Genet.* **39**(6): p. 730-2.

Literaturverzeichnis

185. Ohler U., Liao G.C., Niemann H., and Rubin G.M. (2002). Computational analysis of core promoters in the Drosophila genome. *Genome Biol.* **3**(12): p. RESEARCH0087.
186. Ota T., Suzuki Y., Nishikawa T., Otsuki T., Sugiyama T., Irie R., . . . Sugano S. (2004). Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet.* **36**(1): p. 40-5.
187. Panter M.S., Jain A., Leonhardt R.M., Ha T., and Cresswell P. (2012). Dynamics of Major Histocompatibility Complex Class I Association with the Human Peptide-loading Complex. *Journal of Biological Chemistry.* **287**(37): p. 31172-31184.
188. Pari G.S., Field A.K., and Smith J.A. (1995). Potent antiviral activity of an antisense oligonucleotide complementary to the intron-exon boundary of human cytomegalovirus genes UL36 and UL37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **39**(5): p. 1157-61.
189. Park B., Kim Y., Shin J., Lee S., Cho K., Früh K., . . . Ahn K. (2004). Human Cytomegalovirus Inhibits Tapasin-Dependent Peptide Loading and Optimization of the MHC Class I Peptide Cargo for Immune Evasion. *Immunity.* **20**(1): p. 71-85.
190. Parker R. and Sheth U. (2007). P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell.* **25**(5): p. 635-646.
191. Paulsson K. and Wang P. (2003). Chaperones and folding of MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* **1641**(1): p. 1-12.
192. Paulsson K.M., Jevon M., Wang J.W., Li S., and Wang P. (2006). The double lysine motif of tapasin is a retrieval signal for retention of unstable MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *J Immunol.* **176**(12): p. 7482-8.
193. Paulsson K.M., Kleijmeer M.J., Griffith J., Jevon M., Chen S., Anderson P.O., . . . Wang P. (2002). Association of tapasin and COPI provides a mechanism for the retrograde transport of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **277**(21): p. 18266-71.
194. Perkins N.D., Felzien L.K., Betts J.C., Leung K., Beach D.H., and Nabel G.J. (1997). Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science.* **275**(5299): p. 523-7.
195. Pesole G., Mignone F., Gissi C., Grillo G., Licciulli F., and Liuni S. (2001). Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene.* **276**(1-2): p. 73-81.
196. Phillips S.L., Cygnar D., Thomas A., and Bresnahan W.A. (2012). Interaction between the human cytomegalovirus tegument proteins UL94 and UL99 is essential for virus replication. *J Virol.* **86**(18): p. 9995-10005.

Literaturverzeichnis

197. Plachter B., Sinzger C., and Jahn G., *Cell Types Involved in Replication and Distribution of Human Cytomegalovirus*, in *Advances in Virus Research*, F.A.M. Karl Maramorosch and J.S. Aaron, Editors. 1996, Academic Press. p. 195-261.
198. Preston C.M. and Nicholl M.J. (2006). Role of the cellular protein hDaxx in human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *J Gen Virol.* **87**(Pt 5): p. 1113-21.
199. Pribnow D. (1975). Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. *Journal of molecular biology.* **99**(3): p. 419-443.
200. Pribnow D. (1975). Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **72**(3): p. 784-788.
201. Proudfoot N.J. (2011). Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes & Development.* **25**(17): p. 1770-1782.
202. Qian Z., Xuan B., Hong T.T., and Yu D. (2008). The Full-Length Protein Encoded by Human Cytomegalovirus Gene UL117 Is Required for the Proper Maturation of Viral Replication Compartments. *Journal of Virology.* **82**(7): p. 3452-3465.
203. Raoult D. (2009). There is no such thing as a tree of life (and of course viruses are out!). *Nat Rev Micro.* **7**(8): p. 615-615.
204. Raoult D. and Forterre P. (2008). Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nat Rev Micro.* **6**(4): p. 315-319.
205. Reeves M., Woodhall D., Compton T., and Sinclair J. (2010). Human Cytomegalovirus IE72 Protein Interacts with the Transcriptional Repressor hDaxx To Regulate LUNA Gene Expression during Lytic Infection. *Journal of Virology.* **84**(14): p. 7185-7194.
206. Reusser P., Riddell S., Meyers J., and Greenberg P. (1991). Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood.* **78**(5): p. 1373-1380.
207. Riu E., Chen Z.-Y., Xu H., He C.-Y., and Kay M.A. (2007). Histone Modifications are Associated with the Persistence or Silencing of Vector-mediated Transgene Expression In Vivo. *Mol Ther.* **15**(7): p. 1348-1355.
208. Rodriguez-Pascual F., Hausding M., Ihrig-Biedert I., Furneaux H., Levy A.P., Förstermann U., and Kleinert H. (2000). Complex Contribution of the 3'-Untranslated Region to the Expressional Regulation of the Human Inducible Nitric-oxide Synthase Gene: INVOLVEMENT OF THE RNA-BINDING PROTEIN HuR. *Journal of Biological Chemistry.* **275**(34): p. 26040-26049.
209. Rosenberg M. and Court D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu Rev Genet.* **13**: p. 319-53.

Literaturverzeichnis

210. Roth S.Y., Denu J.M., and Allis C.D. (2001). HISTONE ACETYLTRANSFERASES. *Annual Review of Biochemistry*. **70**(1): p. 81-120.
211. Saffert R.T. and Kalejta R.F. (2006). Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J Virol*. **80**(8): p. 3863-71.
212. Sambrook J. and Russell D.W., *Molecular cloning: a laboratory manual. Volume 1-3*, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
213. Schaller H., Gray C., and Herrmann K. (1975). Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage fd. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **72**(2): p. 737-741.
214. Schaub M.C., Lopez S.R., and Caputi M. (2007). Members of the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein H Family Activate Splicing of an HIV-1 Splicing Substrate by Promoting Formation of ATP-dependent Spliceosomal Complexes. *Journal of Biological Chemistry*. **282**(18): p. 13617-13626.
215. Schmittgen T.D. and Livak K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protocols*. **3**(6): p. 1101-1108.
216. Scholz M., Doerr H.W., and Cinatl J. (2003). Human cytomegalovirus retinitis: pathogenicity, immune evasion and persistence. *Trends in Microbiology*. **11**(4): p. 171-178.
217. Seeburg P.H., Nüsslein C., and Schaller H. (1977). Interaction of RNA Polymerase with Promoters from Bacteriophage fd. *European Journal of Biochemistry*. **74**(1): p. 107-113.
218. Seliger B., Schreiber K., Delp K., Meissner M., Hammers S., Reichert T., . . . Huber C.H. (2001). Downregulation of the constitutive tapasin expression in human tumor cells of distinct origin and its transcriptional upregulation by cytokines. *Tissue Antigens*. **57**(1): p. 39-45.
219. Sheppard K.A., Rose D.W., Haque Z.K., Kurokawa R., McInerney E., Westin S., . . . Collins T. (1999). Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol*. **19**(9): p. 6367-78.
220. Shiama N. (1997). The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell Biol*. **7**(6): p. 230-6.
221. Sikorski T.W. and Buratowski S. (2009). The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Current Opinion in Cell Biology*. **21**(3): p. 344-351.
222. Simone L.C., Smith B.L., and Solheim J.C. (2012). Impact of beta 2-microglobulin on tapasin expression and covalent association. *Cellular Immunology*. **279**(1): p. 66-69.
223. Smale S.T. and Kadonaga J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*. **72**: p. 449-79.

Literaturverzeichnis

224. Smith J.A. and Pari G.S. (1995). Expression of human cytomegalovirus UL36 and UL37 genes is required for viral DNA replication. *Journal of Virology*. **69**(3): p. 1925-31.
225. Smith J.D. and de Harven E. (1973). Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus Replication in WI-38 Cells I. Sequence of Viral Replication. *Journal of Virology*. **12**(4): p. 919-930.
226. Sorek R. and Ast G. (2003). Intronic sequences flanking alternatively spliced exons are conserved between human and mouse. *Genome Res*. **13**(7): p. 1631-7.
227. Stamminger T., Gstaiger M., Weinzierl K., Lorz K., Winkler M., and Schaffner W. (2002). Open Reading Frame UL26 of Human Cytomegalovirus Encodes a Novel Tegument Protein That Contains a Strong Transcriptional Activation Domain. *Journal of Virology*. **76**(10): p. 4836-4847.
228. Steimle V., Siegrist C., Mottet A., Lisowska-Grospierre B., and Mach B. (1994). Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*. **265**(5168): p. 106-109.
229. Stern-Ginossar N., Elefant N., Zimmermann A., Wolf D.G., Saleh N., Biton M., . . . Mandelboim O. (2007). Host Immune System Gene Targeting by a Viral miRNA. *Science*. **317**(5836): p. 376-381.
230. Stern-Ginossar N., Saleh N., Goldberg M.D., Prichard M., Wolf D.G., and Mandelboim O. (2009). Analysis of Human Cytomegalovirus-Encoded MicroRNA Activity during Infection. *Journal of Virology*. **83**(20): p. 10684-10693.
231. Stern-Ginossar N., Weisburd B., Michalski A., Le V.T.K., Hein M.Y., Huang S.-X., . . . Weissman J.S. (2012). Decoding Human Cytomegalovirus. *Science*. **338**(6110): p. 1088-1093.
232. Stern N., Markel G., Arnon T.I., Gruda R., Wong H., Gray-Owen S.D., and Mandelboim O. (2005). Carcinoembryonic Antigen (CEA) Inhibits NK Killing via Interaction with CEA-Related Cell Adhesion Molecule 1. *The Journal of Immunology*. **174**(11): p. 6692-6701.
233. Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., Klausner R.D., Collins F.S., . . . Marra M.A. (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(26): p. 16899-903.
234. Sugimoto K., Okamoto T., Sugisaki H., and Takanami M. (1975). The nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site on bacteriophage fd DNA. *Nature*. **253**(5491): p. 410-414.
235. Takanami M., Sugimoto K., Sugisaki H., and Okamoto T. (1976). Sequence of promoter for coat protein gene of bacteriophage fd. *Nature*. **260**(5549): p. 297-302.
236. Talukdar I., Sen S., Urbano R., Thompson J., Yates J.R., III, and Webster N.J.G. (2011). hnRNP A1 and hnRNP F Modulate the Alternative Splicing of Exon 11 of the Insulin Receptor Gene. *PLoS ONE*. **6**(11): p. e27869.

237. Tan P., Kropshofer H., Mandelboim O., Bulbuc N., Hammerling G.J., and Momburg F. (2002). Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading. *J Immunol.* **168**(4): p. 1950-60.
238. Thomas M.C. and Chiang C.M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **41**(3): p. 105-78.
239. Treisman R. (1985). Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell.* **42**(3): p. 889-902.
240. Valcárcel J., Gaur R.K., Singh R., and Green M.R. (1996). Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA of branch point and promotion base pairing with U2 snRNA. *Science.* **273**(5282): p. 1706-1709.
241. van der Strate B.W., Harmsen M.C., Schafer P., Swart P.J., The T.H., Jahn G., . . . Hamprecht K. (2001). Viral load in breast milk correlates with transmission of human cytomegalovirus to preterm neonates, but lactoferrin concentrations do not. *Clin Diagn Lab Immunol.* **8**(4): p. 818-21.
242. van Werven F.J., van Bakel H., van Teeffelen H.A., Altelaar A.F., Koerkamp M.G., Heck A.J., . . . Timmers H.T. (2008). Cooperative action of NC2 and Mot1p to regulate TATA-binding protein function across the genome. *Genes Dev.* **22**(17): p. 2359-69.
243. Visel A., Rubin E.M., and Pennacchio L.A. (2009). Genomic views of distant-acting enhancers. *Nature.* **461**(7261): p. 199-205.
244. Wahl M.C., Will C.L., and Lührmann R. (2009). The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell.* **136**(4): p. 701-718.
245. Walz A. and Pirrotta V. (1975). Sequence of the PR promoter of phage [lambda]. *Nature.* **254**(5496): p. 118-121.
246. Wang E., Dimova N., and Cambi F. (2007). PLP/DM20 ratio is regulated by hnRNPH and F and a novel G-rich enhancer in oligodendrocytes. *Nucleic Acids Research.* **35**(12): p. 4164-4178.
247. Wang E., Mueller W.F., Hertel K.J., and Cambi F. (2011). G Run-mediated Recognition of Proteolipid Protein and DM20 5' Splice Sites by U1 Small Nuclear RNA Is Regulated by Context and Proximity to the Splice Site. *Journal of Biological Chemistry.* **286**(6): p. 4059-4071.
248. Wang F.-Z., Weber F., Croce C., Liu C.-G., Liao X., and Pellett P.E. (2008). Human Cytomegalovirus Infection Alters the Expression of Cellular MicroRNA Species That Affect Its Replication. *Journal of Virology.* **82**(18): p. 9065-9074.
249. Wang Z. and Burge C.B. (2008). Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA.* **14**(5): p. 802-13.

Literaturverzeichnis

250. Wearsch P.A. and Cresswell P. (2007). Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat Immunol.* **8**(8): p. 873-81.
251. Wightman B., Ha I., and Ruvkun G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* **75**(5): p. 855-62.
252. Willy P.J., Kobayashi R., and Kadonaga J.T. (2000). A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science.* **290**(5493): p. 982-5.
253. Woodhall D.L., Groves I.J., Reeves M.B., Wilkinson G., and Sinclair J.H. (2006). Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J Biol Chem.* **281**(49): p. 37652-60.
254. Wu Z.-Z., Chow K.-P.N., Kuo T.-C., Chang Y.-S., and Chao C.C.K. (2011). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus sensitizes cancer cells to cisplatin by enhancing NF- κ B p50 homodimer formation and downregulating NAPA expression. *Biochemical Pharmacology.* **82**(12): p. 1860-1872.
255. Xiao X., Wang Z., Jang M., Nutiu R., Wang E.T., and Burge C.B. (2009). Splice site strength-dependent activity and genetic buffering by poly-G runs. *Nat Struct Mol Biol.* **16**(10): p. 1094-1100.
256. Yabe T., Kawamura S., Sato M., Kashiwase K., Tanaka H., Ishikawa Y., . . . Juji T. (2002). A subject with a novel type I bare lymphocyte syndrome has tapasin deficiency due to deletion of 4 exons by Alu-mediated recombination. *Blood.* **100**(4): p. 1496-1498.
257. Yang C., Bolotin E., Jiang T., Sladek F.M., and Martinez E. (2007). Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene.* **389**(1): p. 52-65.
258. Yewdell J.W., Reits E., and Neefjes J. (2003). Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* **3**(12): p. 952-961.
259. Yi R., Qin Y., Macara I.G., and Cullen B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development.* **17**(24): p. 3011-3016.
260. Yurochko A.D., Kowalik T.F., Huong S.M., and Huang E.S. (1995). Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *Journal of Virology.* **69**(9): p. 5391-400.
261. Zeng Y. and Cullen B.R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA.* **9**(1): p. 112-123.

Literaturverzeichnis

262. Zhang G., Raghavan B., Kotur M., Cheatham J., Sedmak D., Cook C., . . . Trgovcich J. (2007). Antisense Transcription in the Human Cytomegalovirus Transcriptome. *Journal of Virology*. **81**(20): p. 11267-11281.
263. Zhang Q. and Salter R.D. (1998). Distinct patterns of folding and interactions with calnexin and calreticulin in human class I MHC proteins with altered N-glycosylation. *J Immunol*. **160**(2): p. 831-7.
264. Zhong H., May M.J., Jimi E., and Ghosh S. (2002). The Phosphorylation Status of Nuclear NF- κ B Determines Its Association with CBP/p300 or HDAC-1. *Molecular Cell*. **9**(3): p. 625-636.
265. Zhou T. and Chiang C.M. (2001). The intronless and TATA-less human TAF(II)55 gene contains a functional initiator and a downstream promoter element. *J Biol Chem*. **276**(27): p. 25503-11.
266. Zimmermann A., Hauka S., Maywald M., Le V., Schmidt S., Däubener W., and Hengel H. (2013). Checks and balances between human cytomegalovirus replication and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Accepted for publication in J Gen Virol*.
267. Zou Y., Bresnahan W., Taylor R.T., and Stastny P. (2005). Effect of Human Cytomegalovirus on Expression of MHC Class I-Related Chains A. *The Journal of Immunology*. **174**(5): p. 3098-3104.

7 Publikationen (mit eigener Beteiligung)

Begutachtete Publikationen

- 1) Zimmermann A., **Hauka S.**, Maywald M., Le V.T., Schmidt S.K., Däubener W., Hengel H. (2013): Checks and balances between human cytomegalovirus replication and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Accepted for publication, J Gen Virol.*
- 2) Beutler N.*, **Hauka S.***, Niepel A., Kowalewski D.J., Uhlmann J., Ghanem E., Erkelenz S., Wiek C., Hanenberg H., Schaal H., Stevanovic S., Springer S., Momburg F., Hengel H., Halenius A. (2013): A natural tapasin isoform lacking exon 3 modifies peptide loading complex function. *Eur J Immunol. 43(6):1459-69.*
*Gleichberechtigte Erstautorenschaft
- 3) Halenius A., **Hauka S.**, Dölken L., Stindt J., Reinhard H., Wiek C., Hanenberg H., Koszinowski U.H., Momburg F., Hengel H. (2011): Human cytomegalovirus disrupts the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex and inhibits tapasin gene transcription. *J Virol. 85(7):3473-85.*

Publikationen in Vorbereitung

- 1) Vitenshtein A., Weisblum Y., **Hauka S.**, Halenius A., Oiknine-Djian E., Tsukerman P., Bauman Y., Bar-On Y., Stern-Ginossar N., Enk J., Ortenberg R., Markel G., Blumberg R., Hengel H., Jonjic S., Wolf D.G., Adler H., Kammerer R., Mandelboim O. (2013): Innate immune sensing of human viruses induces CEACAM1 mediated inhibition of virus production. *Manuscript in preparation.*

8 Vorträge

- 23rd Annual Meeting of the Society for Virology, Kiel, Deutschland, 03/2013 – Poster Präsentation: “*A genome integrated reporter-gene assay provides new insights into promoter regulation in HCMV-infected cells*”.
- 22nd Annual Meeting of the Society for Virology, Essen, Deutschland, 03/2012 – Vortrag: “*Human cytomegalovirus (HCMV)-dependent alteration of the MHC-encoded tapasin transcript; one promoter, two transcripts*”.
- 2nd MOI-Symposium of the Manchot Graduated School „Molecules of Infection“, Bergisch Gladbach, Deutschland 03/2012 – Vortrag: “*One promoter – two transcripts. Human cytomegalovirus (HCMV)-dependent alteration of the MHC-encoded tapasin transcript*”.
- 10th Workshop des GfV-Arbeitskreis "Immunbiologie von Virusinfektionen", Deidesheim, Deutschland 10/2011 – Vortrag: “*One promoter - two transcripts. Human cytomegalovirus (HCMV)-dependent alteration of the MHC-encoded tapasin transcript*”.
- 1st MOI-Symposium of the Manchot Graduated School „Molecules of Infection“, Bergisch Gladbach, Deutschland 04/2011 – Vortrag: “*Probing the human cytomegalovirus (HCMV)-dependent suppression of the MHC-encoded tapasin promoter*”.
- 9th Workshop des GfV-Arbeitskreis "Immunbiologie von Virusinfektionen", Deidesheim, Deutschland 10/2010 – Vortrag: “*Probing the human cytomegalovirus (HCMV)-dependent suppression of the MHC-encoded tapasin promoter*”.
- 8th Workshop des GfV-Arbeitskreis "Immunbiologie von Virusinfektionen", Deidesheim, Deutschland 10/2009 – Vortrag: “*HCMV Mediated transcriptional repression of the MHC-encoded chaperon tapasin*”.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt und bisher nicht anderweitig als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Sebastian Hauka

Duisburg, den 12.12.2013

Danksagung

Ich möchte diese Arbeit, wie schon die „hierherführende Diplomarbeit“, meiner viel zu früh verstorbenen Oma Elfriede widmen. Auch wenn der Weg von Interesse und Enthusiasmus nun im Kleinstmöglichen, „der Welt der Viren“, mündete, fand er doch maßgeblichen Anfang in unserer Begeisterung für „die Großen der Biologie“ an Land, zu Wasser und in der Luft.

Bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, die mir das Ausleben eben dieser Begeisterung, das Studium und schließlich die Promotion ermöglicht hat und mich in jeder Hinsicht und Situation unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Hartmut Hengel für die Aufnahme an seinem Institut, die Bereitstellung des Promotionsplatzes und die Betreuung der Arbeit danken.

Außerdem danke ich insbesondere Prof. Dr. Rolf Wagner für die Annahme und die Mitbetreuung dieser Arbeit.

Ich danke meinen Freund(inn)en für Geduld, Verständnis, aufbauende sowie beratende Worte und vieles, vieles mehr. Der größte Dank aber gilt Euch dafür, dass Ihr stets Sorge tragt, diese Arbeit auch mal bei Seite zu legen und den Kopf woanders zu haben.

Ein besonderer Dank gilt Anne Halenius für die Betreuung und die Aufnahme in die MHC-Gruppe. Das Ganze verknüpft mit der Möglichkeit, selbständig und offen „am Promotor rum doktor'n“ und einen langen Ausflug ins Land des Spleißens wagen zu können. Es war mehr als NeTT ...

Ich danke speziell der MHC-Gruppe und ganz allgemein „all‘ den Labormenschen“ für die angenehme Zeit und Atmosphäre.

DANKE !!!

Appendix

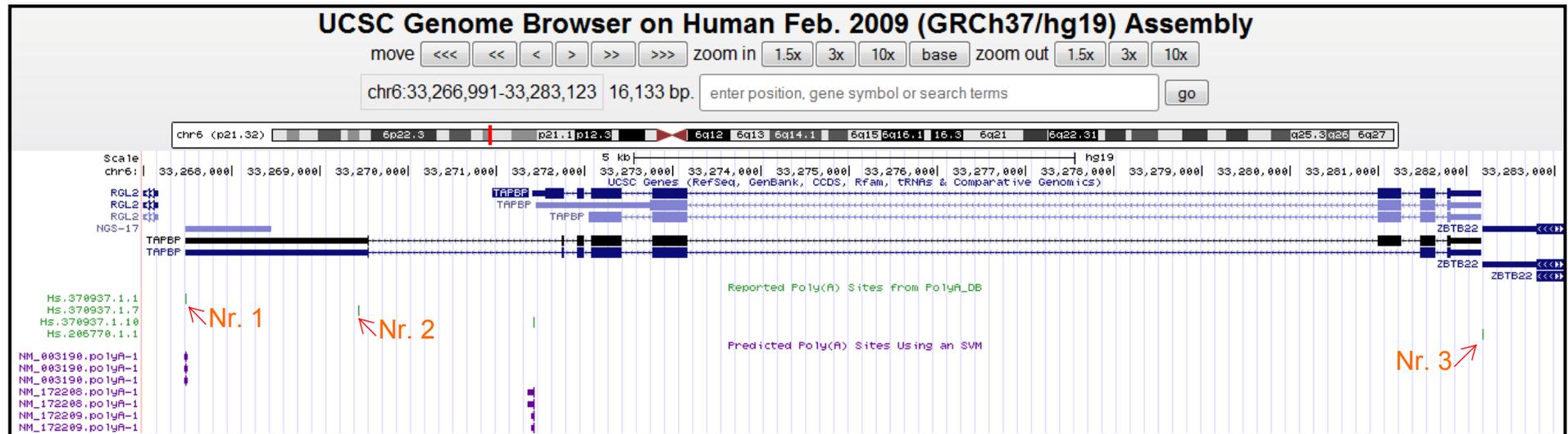


Abbildung 38: Übersicht von vorhergesagten und experimentell gefundenen Poly-Adenylierungssignalen des Tapsintranskriptes. Die Grafik bildet eine Zusammenfassung der gesammelten Daten des *Genome Browsers* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) für die Ergebnisse vom Juli 2003 (NCBI34/hg16), Mai 2004 (NCBI35/hg17), März 2006 (NCBI36/hg18) und Februar 2009 (GRCh37/hg19). Vorhergesagte (*predicted*) und experimentell gefundene (*reported*) Signale (von http://exon.umdj.edu/polya_db) sind in einer Grafik zusammengefasst. Gezeigt ist ein Poly-Adenylierungssignal (Nr. 1), welches sowohl vorhergesagt als auch experimentell gefunden wurde. Das zweite Poly-Adenylierungssignal (Nr. 2) ist das in der vorliegenden Arbeit als „alternative Poly-Adenylierungsstelle“ benannte. Das dritte Poly-Adenylierungssignal gehört zum vorhergesagten Transkript des Gens ZBTB22 (NM_005453). Dieses Signal liegt bereits in der Sequenz des Tapsinpromotors wenige Nukleotide von der NF- κ B-Bindestelle (p65/p50/c-rel) des fokussierten Teils des Kernpromotors entfernt (Abbildung 37).

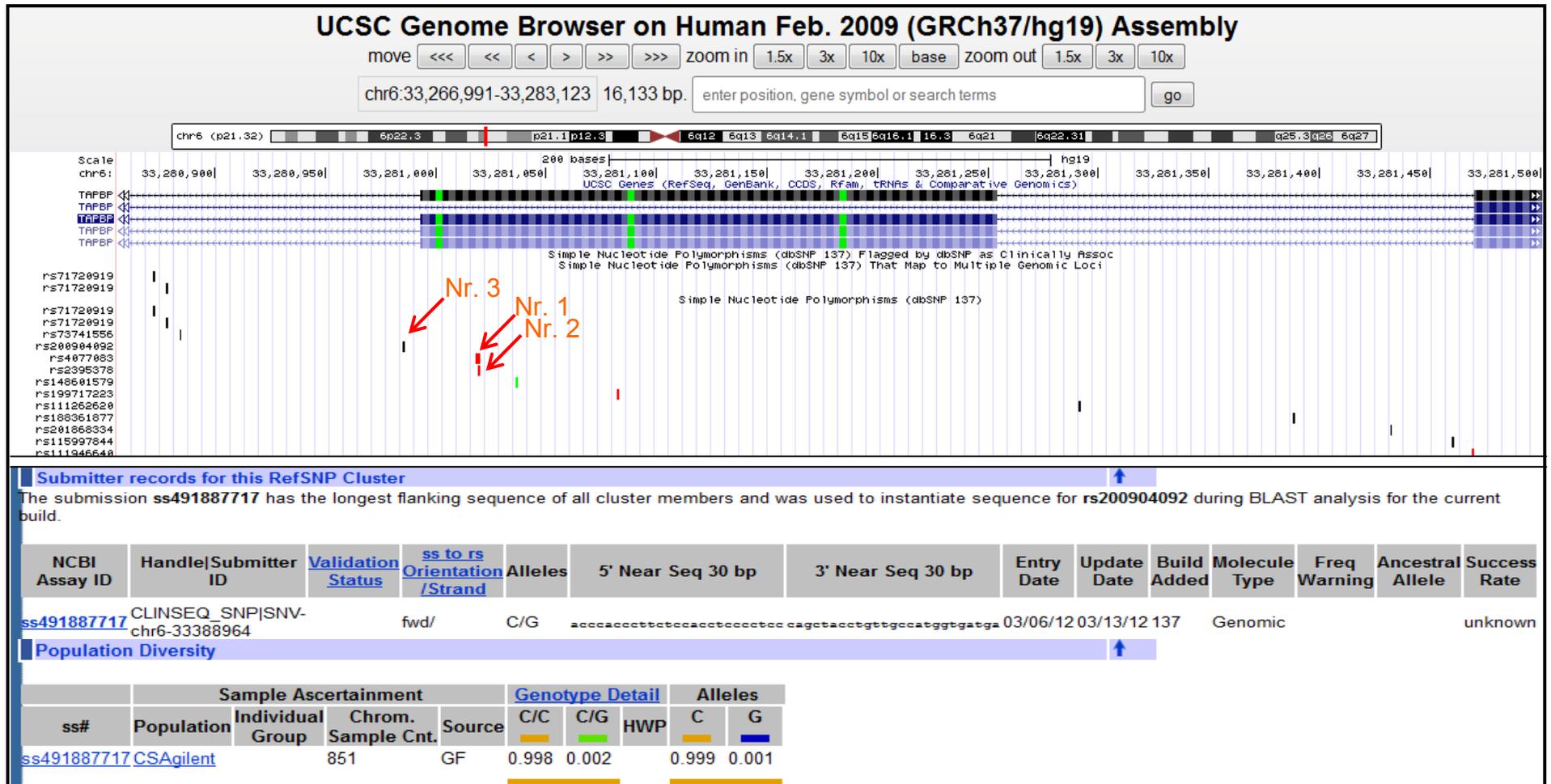


Abbildung 39: Übersicht von „simple nucleotide polymorphisms“ im Bereich des Spleißdonors von Exon 3. „Simple nucleotide polymorphisms“ umschließen sowohl SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) als auch kleine Nukleotidinsertionen und -deletionen. Die Grafik ist ein Auszug der Zusammenfassung von gesammelten Daten des *Genome Browsers* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) für die Ergebnisse vom Juli 2003 (NCBI34/hg16), Mai 2004 (NCBI35/hg17), März 2006 (NCBI36/hg18) und Februar 2009 (GRCh37/hg19). Die Daten der Untersuchung/Datensammlung „*All SNPs(137)*“ sind gezeigt. Nummer 1 (rs4077083) ist ein SNP und Nummer 2 (rs2395378) ist auch als Nukleotiddeletion (*simple nucleotide polymorphism*) gezeigt worden. Beide sind in 2.3.4 näher beschrieben. Nummer 3 (rs200904092) ist ein SNP welcher zu einer Mutation in einem der unter 2.3.5 und 2.3.6 beschriebenen *G-runs* führt. Dieser SNP trat bei einer Untersuchung von 1.000 Proben 1-mal auf (Biesecker, Mullikin *et al.* 2009).

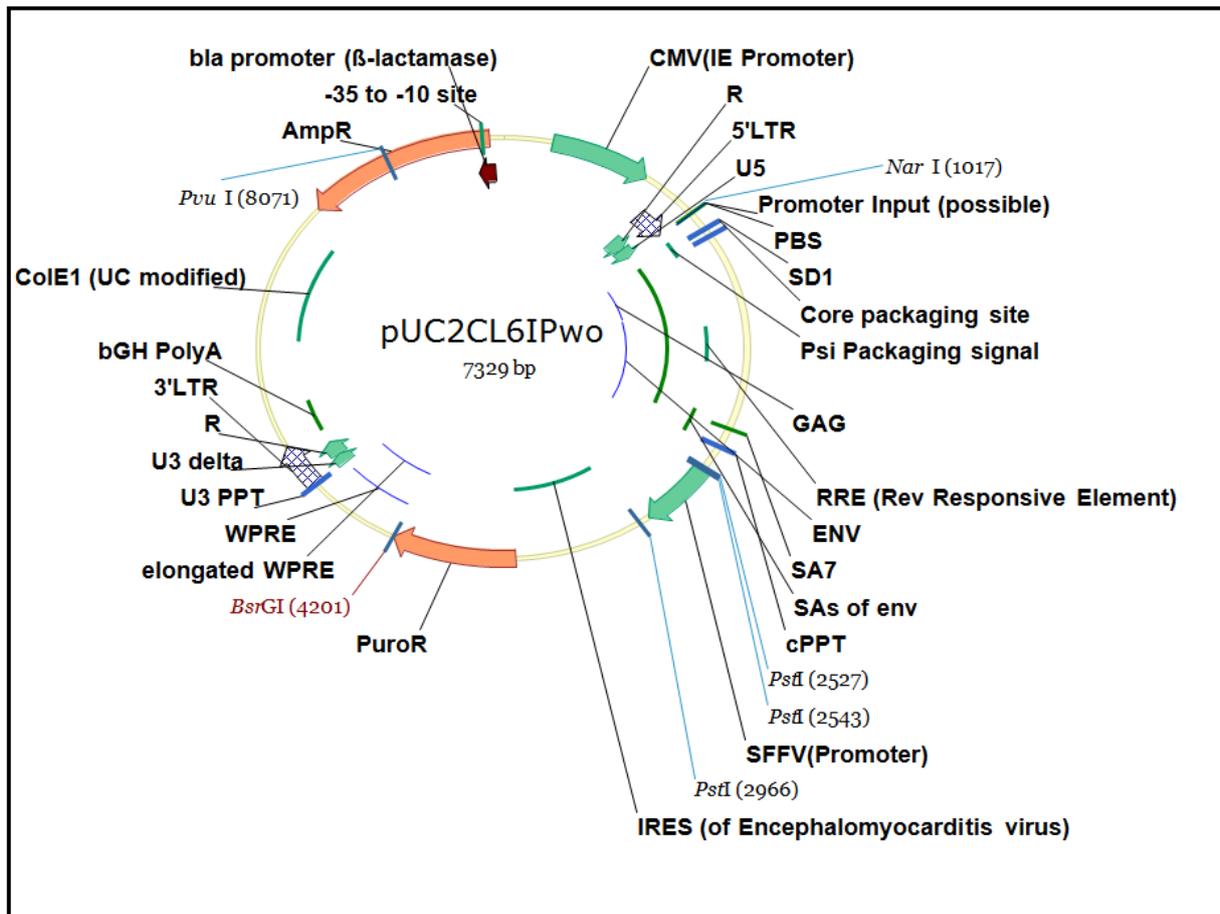


Abbildung 40: Skizzierte Übersicht des lentiviralen Vektors pUC2CL6IPwo. Der lentivirale Vektor pUC2CL6IPwo (Halenius, Hauka *et al.* 2011) wurde als „Backbone“ zur Klonierung der Vektoren pPR-GIP und pwI-GIP genutzt. Gezeigt ist die zirkuläre Ansicht des Vektors mit den gekennzeichneten kodierten Bereichen sowie den klonierungsrelevanten Restriktionsstellen mittels der Vector NTI Advance 10 (Life Technologies) Software.

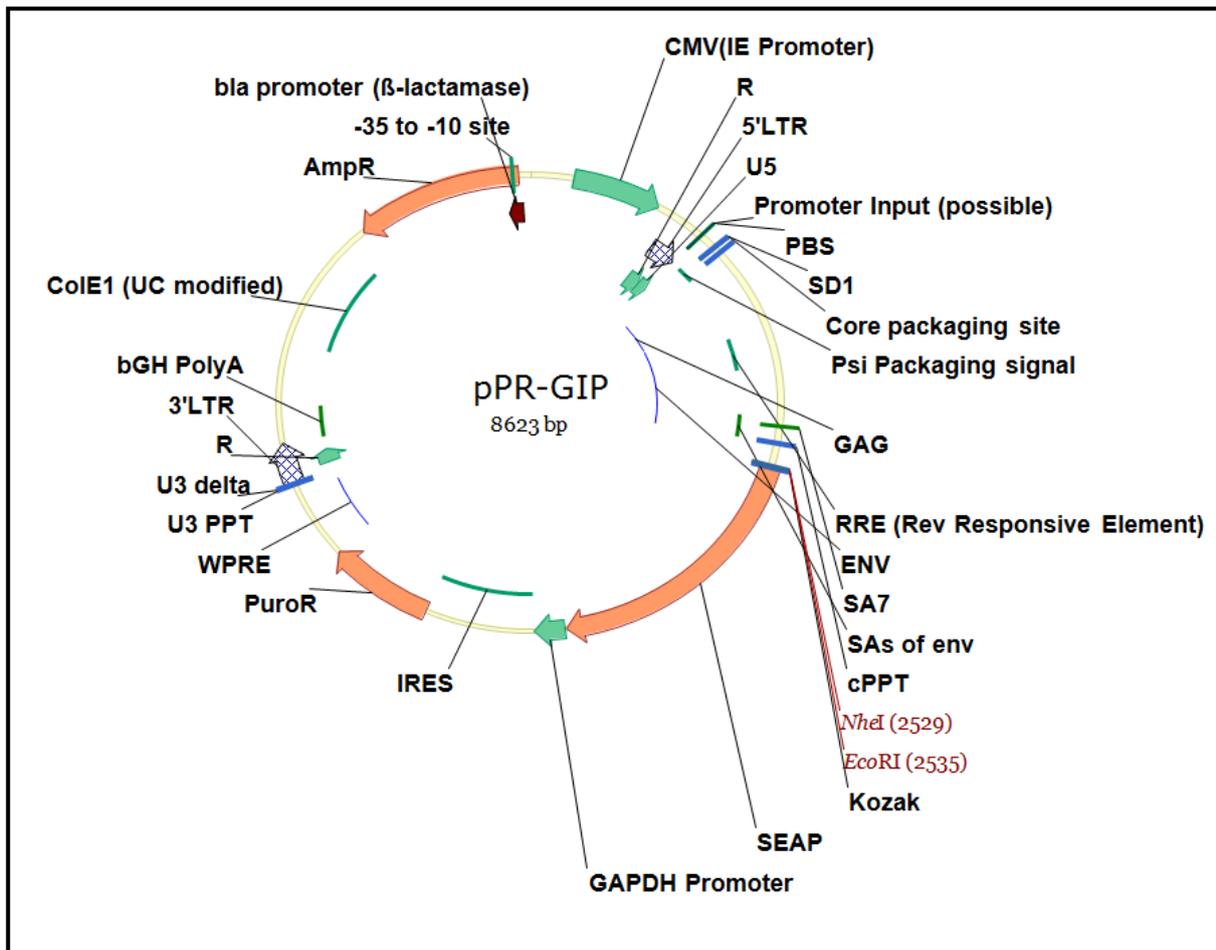


Abbildung 41: Skizzierte Übersicht des klonierten lentiviralen Vektors pPR-GIP. Mit Hilfe des klonierten lentivirale Vektors pPR-GIP (sowie pCD/NL-BH (Gag/Pol, Tat, Rev), pCMV-VSV-G (VSV-G)) wurde der stabile Reportergenassay in die ausgewählten Zellen integriert. Die Promotorsequenzen wurden mittels NheI und EcoRI kloniert. Gezeigt ist die zirkuläre Ansicht des Vektors mit den gekennzeichneten kodierten Bereichen sowie den klonierungsrelevanten Restriktionsstellen mittels der Vector NTI Advance 10 (Life Technologies) Software.

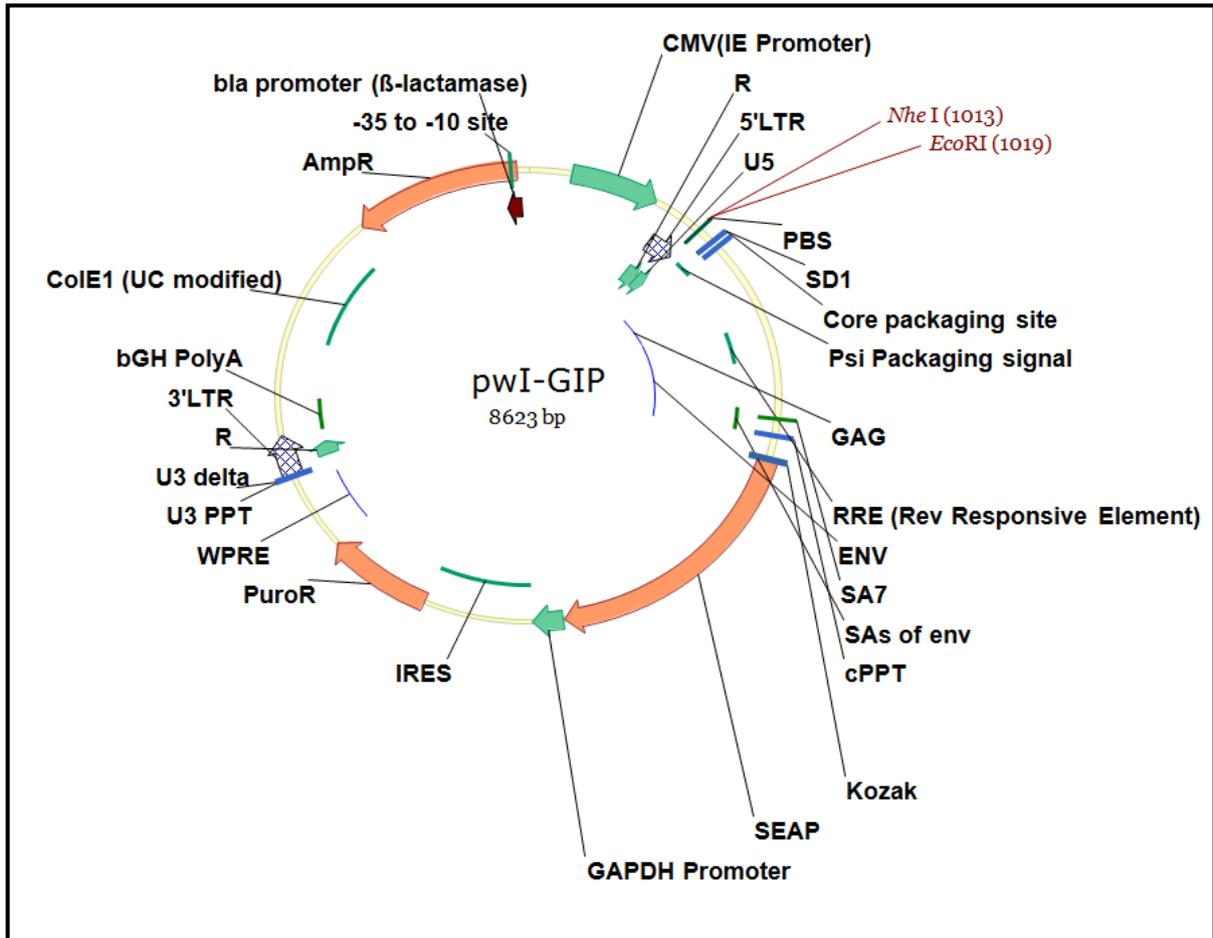


Abbildung 42: Skizzierte Übersicht des klonierten lentiviralen Vektors pwI-GIP. Mit Hilfe des klonierten lentiviralen Vektors pwI-GIP (sowie pCD/NL-BH (Gag/Pol, Tat, Rev), pCMV-VSV-G (VSV-G)) wurde der stabile Reporterassay in die ausgewählten Zellen integriert. Die Promotorsequenzen wurden mittels NheI und EcoRI kloniert. Durch die Verschiebung der Promotor-Integrationsstelle wurde ein System entworfen, in dem durch die Einbringung eines Spleißereignisses die Stabilität der mRNA und damit die Expression erhöht werden sollte (Huang and Gorman 1990). Wenngleich eine erfolgreiche Integration nachgewiesen werden konnte, zeigte sich, dass es keine Möglichkeit gab, den gewählten Promotor gezielt zu induzieren beziehungsweise diese Induktion per SEAP-Expression zu messen. Daher wurde dieses System vorerst verworfen und mit dem pPR-GIP Vektoren gearbeitet. Gezeigt ist die zirkuläre Ansicht des Vektors mit den gekennzeichneten kodierten Bereichen sowie den klonierungsrelevanten Restriktionsstellen, mittels der Vector NTI Advance 10 (Life Technologies) Software.

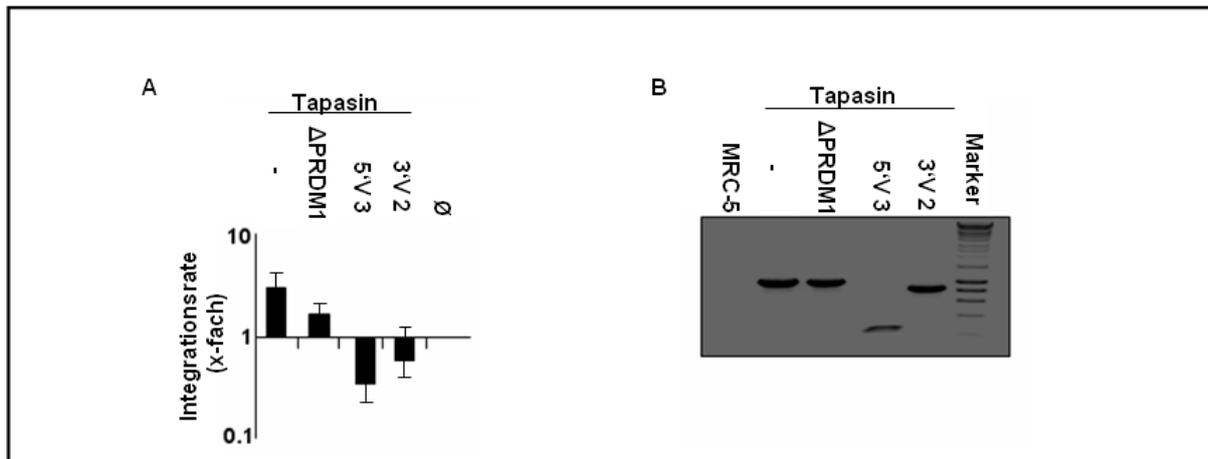


Abbildung 43: Relative Integrationsraten ausgesuchter Promotoren im stabilen Reporterassay. (A) Integrationsraten verschiedener Promotorverkürzungen (sowohl in 5' als auch 3'Richtung) und -mutationen. Die qPCR wurde mittels spezifischer Primer (4.1.11) zur Detektion der integrierten Reporter-Gen-Sequenzen (unabhängig vom jeweiligen Promotor) durchgeführt. Die Integrationsrate wurde im Verhältnis zum Tapasinpromotor (endogen, pro Zelle zwei Allele) bestimmt und der Mittelwert aller gezeigten Integrationsraten als Standard (1-fach) festgelegt. Um den Mittelwert, der in der qPCR auf 1 gesetzt wurde, bewegen sich die Integrationsraten in einem Rahmen von 5-fachem Unterschied. (B) Kontroll-PCR der Sequenzlängen integrierter Promotoren. Die sqPCR wurde mittels spezifischer Primer (4.1.11) zur Bestimmung der Länge der integrierten Promotorsequenzen (ausserhalb der Promotorsequenzen gelegen) durchgeführt.

Appendix

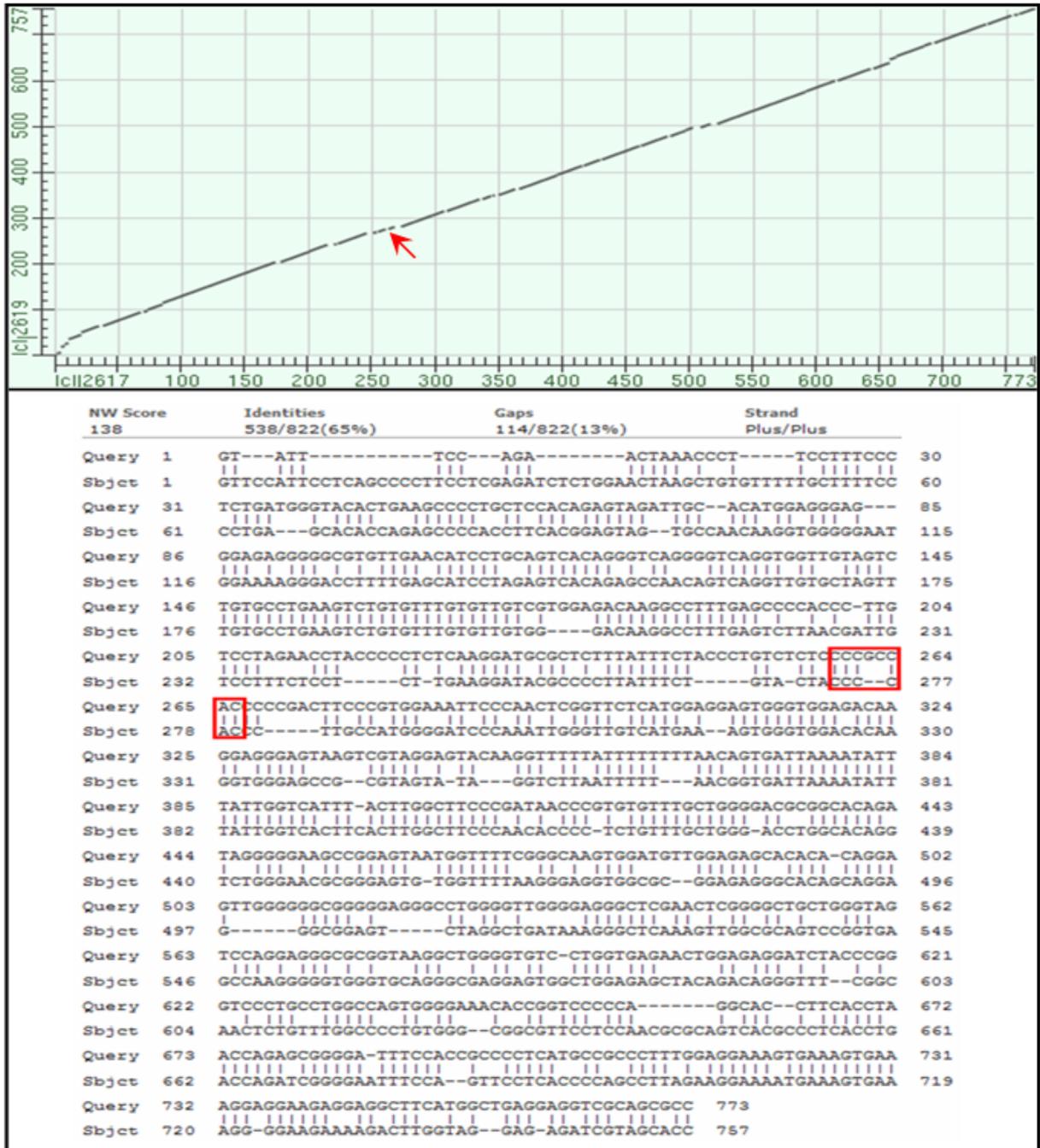


Abbildung 44: Alignment des humanen (Query) mit dem murinen (Sbjct) Tapasinpromotor. Mit dem „Needleman-Wunsch Global Align“-Analysewerkzeug des NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) wurden die Sequenzen des humanen mit den Sequenzen des murinen Tapasinpromotors verglichen. Dabei ergab sich eine Übereinstimmung von 65%. Die rote Markierung hebt die Bindestelle des Mzfl Transkriptionsfaktors hervor (nachträglich eingefügt), innerhalb dieser Sequenz sind in der Mausequenz zwei Nukleotide der Kernsequenz fehlend.

Appendix

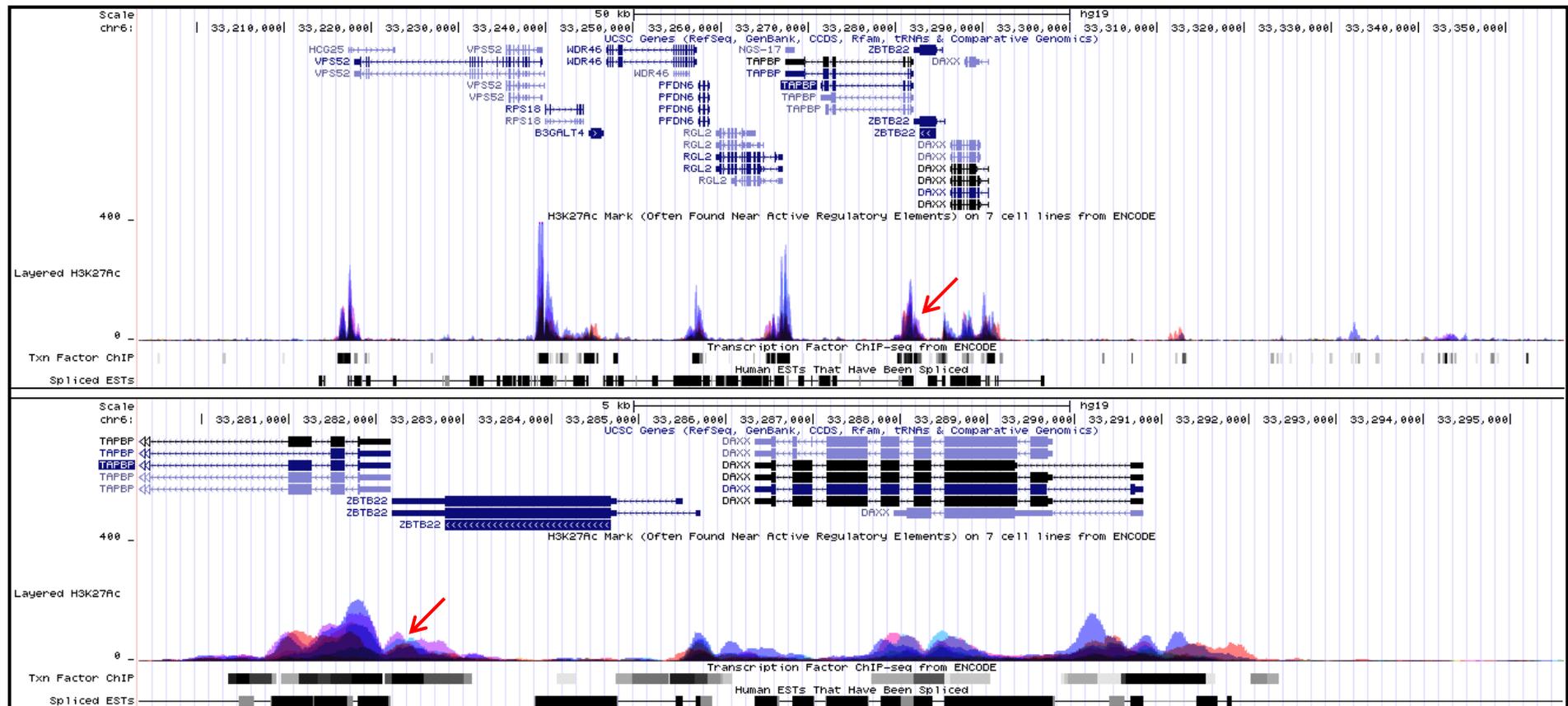


Abbildung 46: Übersicht der Histon 3 (Lysin 27) Acetylierung im Bereich des Tapasingens. Gezeigt sind die Histon 3 Acetylierung am Lysin 27 im erweiterten Bereich des Tapasingens (oben) und dem Bereich des Tapasinpromotors (unten). Die Grafik ist ein Auszug der Zusammenfassung von gesammelten Daten des *Genome Browsers* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) für die Ergebnisse vom Juli 2003 (NCBI34/hg16), Mai 2004 (NCBI35/hg17), März 2006 (NCBI36/hg18) und Februar 2009 (GRCh37/hg19). Die Daten der Untersuchung/Datensammlung „ENCODE“ von 7 unterschiedlichen Zelllinien sind gezeigt. Die roten Pfeile markieren jeweils den Bereich des fokussierten Teils des Kernpromotors (Abbildung 37).

Appendix

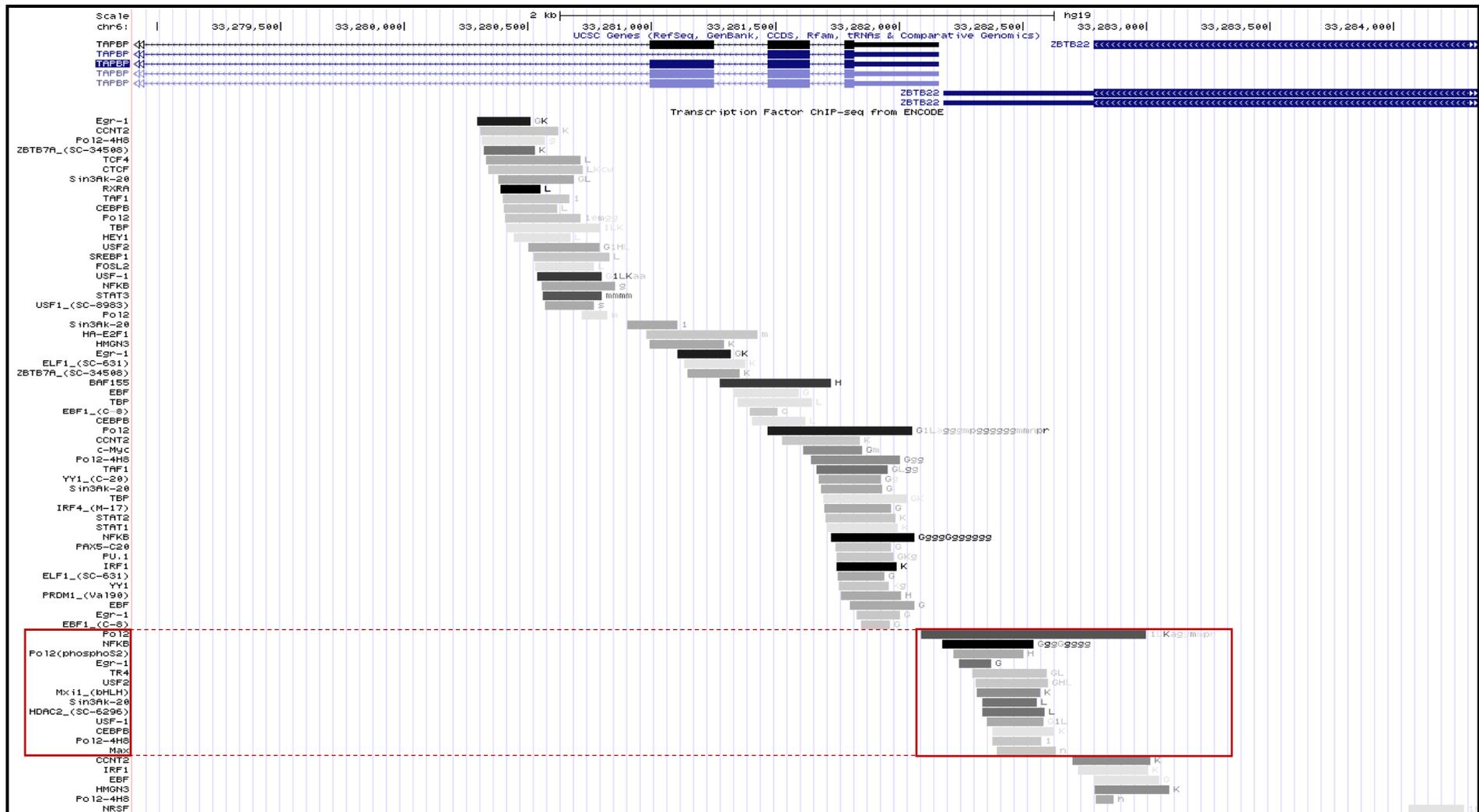


Abbildung 47: Übersicht der experimentell gefundenen Transkriptionsfaktorbindungen im Bereich des Tapasinpromotors. Gezeigt sind die in einem ChIP-seq-Screen (Daten der Untersuchung/Datensammlung „ENCODE“) erhaltenen Daten für Transkriptionsfaktorbindungen bzw. die Sequenzen, welche in der ChIP präzipitiert wurden. Die Grafik ist ein Auszug der Zusammenfassung von gesammelten Daten des *Genome Browsers* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) für die Ergebnisse vom Juli 2003 (NCBI34/hg16), Mai 2004 (NCBI35/hg17), März 2006 (NCBI36/hg18) und Februar 2009 (GRCh37/hg19). Rot markiert sind die Transkriptionsfaktoren (bzw. Sequenzen) welche in den Bereich des fokussierten Teils des Kernpromotors (Abbildung 37) fallen.

Appendix

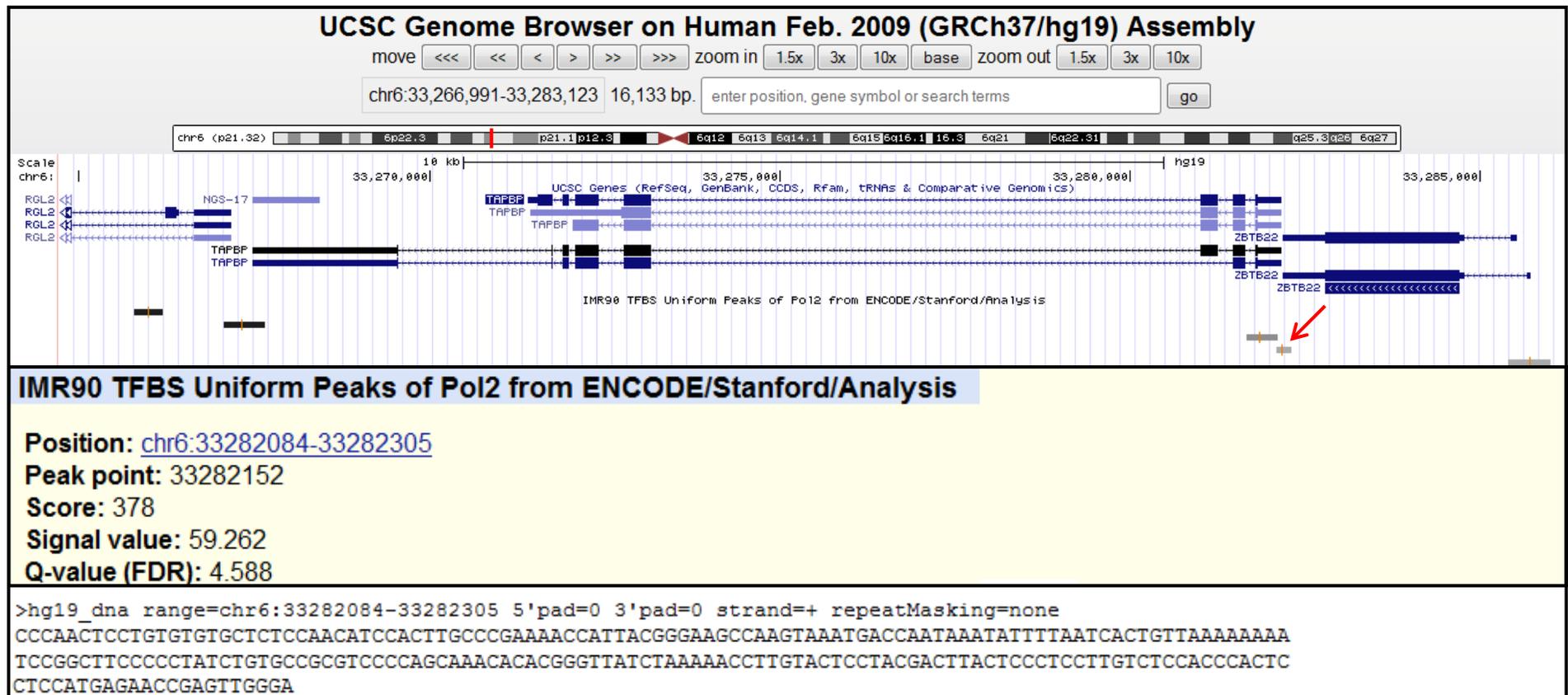


Abbildung 48: Übersicht von experimentell (ChIP-seq) gefundenen Transkriptionsfaktorbindestellen (Polymerase 2). Die Grafik ist ein Auszug der Zusammenfassung von gesammelten Daten des *Genome Browsers* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) für die Ergebnisse vom Juli 2003 (NCBI34/hg16), Mai 2004 (NCBI35/hg17), März 2006 (NCBI36/hg18) und Februar 2009 (GRCh37/hg19). Die Daten aus 91 humanen Zellarten wurden von der „*ENCODE TFBS ChIP-seq*“-Gruppen generiert. Die gezeigten Daten beschränken sich auf die Daten für die Polymerase 2 und den Tapasin (respektive Rgl2) Promotor. Der rote Pfeil markiert eine Bindung der Polymerase II im Bereich des fokussierten Teils des Kernpromotors (Abbildung 37). Weiterhin sind die Grunddaten dieses Ergebnisses sowie die in der ChIP-seq erhaltene Sequenz gegeben.

Appendix



Abbildung 49: Übersicht der gespleißten humanen ESTs (*expressed sequence tags*) im Bereich des Tapasingens. Gezeigt sind Transkripte aller der von der UCSC (*University of California, Santa Cruz, Genome Browser*) gesammelten/bekanntesten Daten. Die Grafik ist ein Auszug der Zusammenfassung von gesammelten Daten des *Genome Browsers* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) für die Ergebnisse vom Juli 2003 (NCBI34/hg16), Mai 2004 (NCBI35/hg17), März 2006 (NCBI36/hg18) und Februar 2009 (GRCh37/hg19). Die roten Pfeile markieren die Sequenzen welche den längsten 5'UTR-Bereich bilden und vom fokussierten Teil des Kernpromotors (Abbildung 37) transkribiert sein könnten. Transkript BI523615 wurde in den Screening-Analysen von Strausberg und Mitarbeitern gefunden (Strausberg, Feingold *et al.* 2002).

Appendix

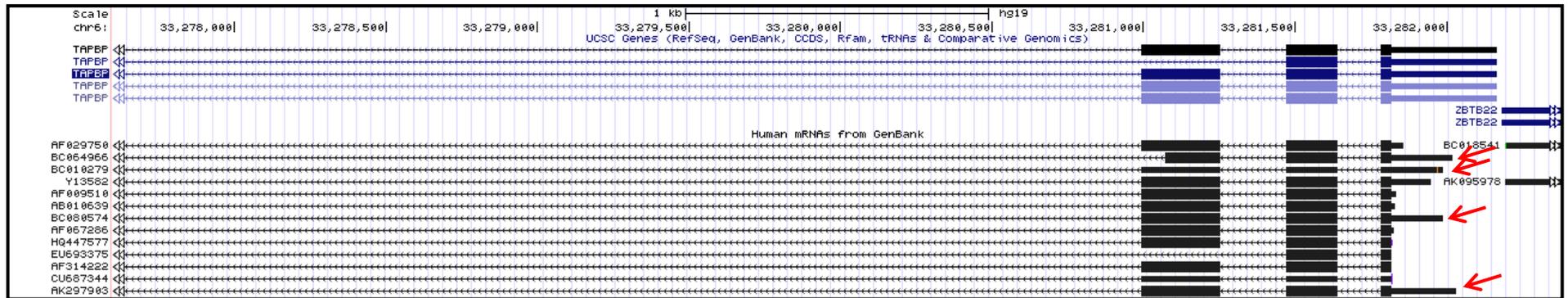


Abbildung 50: Übersicht von gefundenen mRNAs im Bereich des Tapasgens. Gezeigt sind Transkripte aller der von der UCSC (*University of California, Santa Cruz, Genome Browser*) gesammelten/bekanntesten Daten. Die Grafik ist ein Auszug der Zusammenfassung von gesammelten Daten des *Genome Browsers* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) für die Ergebnisse vom Juli 2003 (NCBI34/hg16), Mai 2004 (NCBI35/hg17), März 2006 (NCBI36/hg18) und Februar 2009 (GRCh37/hg19). Die roten Pfeile markieren die Sequenzen welche den längsten 5'UTR-Bereich bilden. Transkript BC010279, BC064966 und BC080574 wurde in den Screening-Analysen von Strausberg und Mitarbeitern gefunden (Strausberg, Feingold *et al.* 2002). Das Transkript AK297903 in den Screening-Analysen von Ota und Kollegen (Ota, Suzuki *et al.* 2004).

Appendix

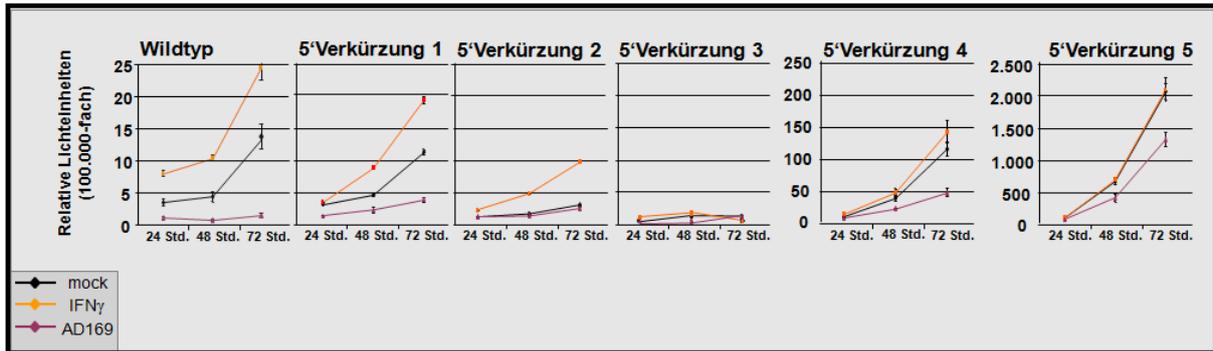


Abbildung 51: 5' Verkürzungen des Tapasinpromotors in infizierten und IFN γ -stimulierten MRC-5 Fibroblasten. Transduzierte Reportergene unter der Kontrolle von Tapasinpromotor-Verkürzungen (und der die Wildtypsequenz) in MRC-5 Fibroblasten wurden kontrollbehandelt (mock), IFN γ (500 U/mL) stimuliert sowie HCMV infiziert. Die Phosphataseexpression wurde zu den angegebenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 Stunden) als Akkumulation gemessen und in RLU dargestellt. Gezeigt sind aus der Verrechnung in Abbildung 33 jeweils einzelne Ergebnisse nur eines Experimentes und einer Transduktion.

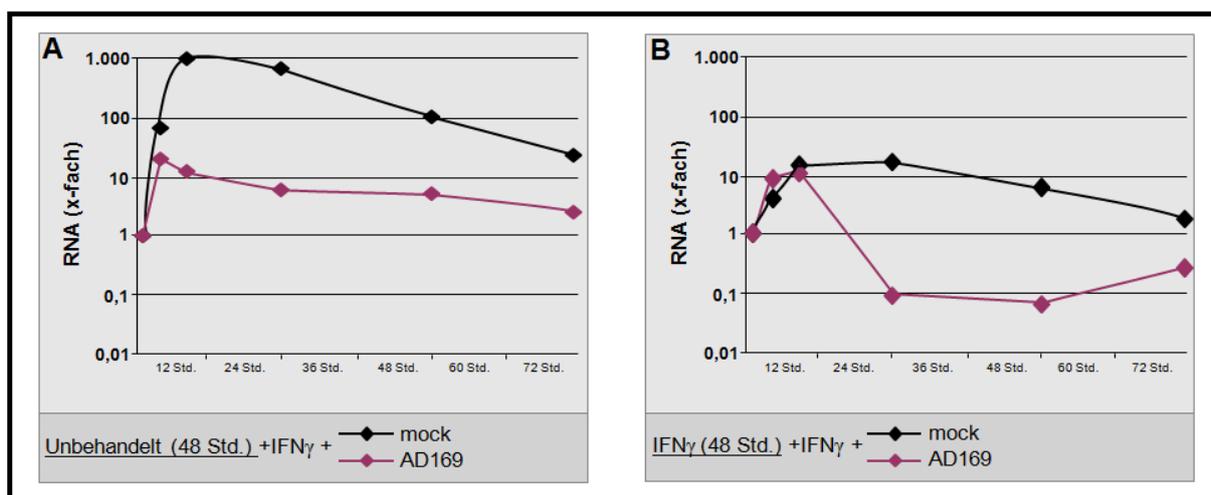


Abbildung 52: Die durch IFN γ -induzierten IDO-Transkriptmengen können durch HCMV reguliert werden. MRC-5 Fibroblasten wurden HCMV-(MOI 5, schwarze Kurven) und mock-infiziert (rote Kurven) sowie zeitgleich IFN γ behandelt. Die RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten (0, 4, 8, 24, 48, 72 Stunden nach Infektion/Stimulation) extrahiert. Die IDO Transkription wurde mittels quantitativer qRT-PCR (aus 500 ng RNA) analysiert. (A) Zellen wurden 48 Stunden vor Infektion/Stimulation ausplattiert und nicht weiter behandelt. (B) 48 Stunden vor Infektion/Stimulation wurden die Zellen mit 500 U(nits, Einheiten) IFN γ stimuliert.

Die IDO-Transkriptmengen veranschaulichen die Interferenz von HCMV mit der IFN γ -Signalkaskade. Dieses passiert unabhängig davon, ob Zellen bereits vor der Infektion IFN γ -stimuliert wurden (B) oder nicht (A). In beiden Fällen liegt die Reduktion bei einem Faktor von 100 (Zimmermann, Hauka *et al.* 2013).

Die genaue Rolle von IDO, während der HCMV-Infektion, konnte *in vitro* und *in vivo* bisher nicht abschließend geklärt werden. So wurde gezeigt, dass IDO über den Abbau von Tryptophan die Replikation von HCMV empfindlich stören kann. In Monozyten dagegen kann es zu einer Induktion von IDO kommen, wodurch die regulatorischen T-Zellen (Tregs) negativ reguliert werden und folgend die Immunantwort geschwächt wird (Bodaghi, Goureau *et al.* 1999, Furset, Fløisand *et al.* 2008, Mahnke, Bedke *et al.* 2007).

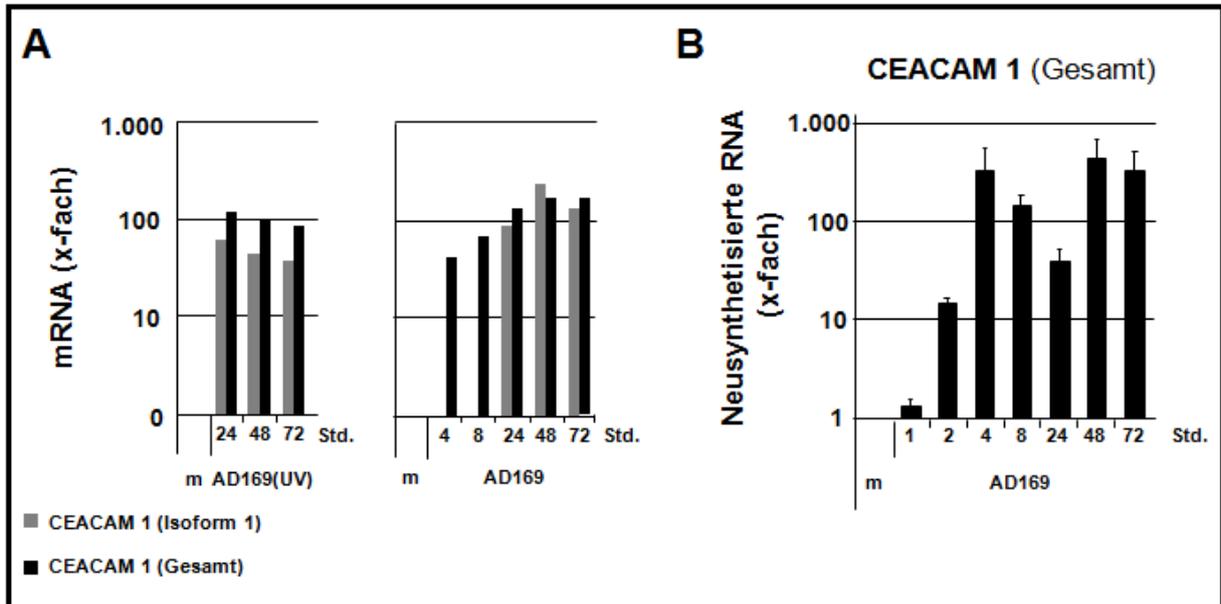


Abbildung 53: HCMV-Partikel und Virus-Replikation induzieren die CEACAM1-Transkription. (A) MRC-5 Fibroblasten wurden mit HCMV infiziert oder mit UV-inaktivierten Viruspartikeln beziehungsweise mock behandelt. RNA wurde zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung (mock und UV-inaktivierten Viruspartikeln), respektive nach 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden nach HCMV-Infektion (AD169) extrahiert. Die Transkription der CEACAM1 Isoform 1 (graue Balken) sowie die aller nicht-Isoform 1 CEACAM1 Transkripte (Gesamt, schwarzer Balken) wurde, mittels spezifischer Primer, per qRT-PCR analysiert und ist in x-fach von mock, zu den markierten Zeitpunkten, dargestellt. (B) RNA aus HCMV und mock-infizierten MRC-5 Fibroblasten wurde zu den angegebenen Zeitpunkten für eine Stunde 4-Thiouridin markiert, anschließend aufgereinigt, separiert (Methodik: 2.4.1), in cDNA umgeschrieben und per qPCR analysiert. Die Neusyntheserate ist in x-fach von mock zu den angegebenen Zeitpunkten gezeigt.

HCMV ist nicht nur in der Lage spezifische Transkripte negativ zu beeinflussen (siehe IDO zuvor), sondern auch sie selektiv zu induzieren. So ist bekannt, dass die Reduktion der NK-Zellen Effizienz mediiert durch CEACAM1 (Isoform 1) unterstützend auf die HCMV-Infektion wirken kann (Markel, Lieberman *et al.* 2002, Stern, Markel *et al.* 2005).

Untersucht wurden hier die CEACAM1 Isoform 1, welche ein ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) besitzt und alle weiteren Isoformen, welche dieses ITIM nicht kodieren (als CEACAM (Gesamt) markiert). Bereits 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit dem UV-inaktiviertem Virus zeigte sich eine deutliche Erhöhung der mRNA-Mengen aller CEACAM1-Isoformen. Während der kompletten Replikationsphase des Virus war CEACAM1 induziert.

Interessanterweise ergaben sich zwei Induktionsphasen für die Transkription von CEACAM1 (Abbildung 53B). Im Verlauf der Infektion war die Induktion stabil und führt zu der Theorie einer viral induzierten, aktiven Kontrolle der Transkription, startend 24 Stunden nach Infektion.