

**Konstruktion und Analyse einer *full length* cDNA-Bank
des humanen Cytomegalovirus und deren Anwendung zur
Identifikation von IFN Antagonisten**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Marco Maywald
aus Duisburg

Düsseldorf, Mai 2015

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. med. Hartmut Hengel

Korreferent: Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 2015

ZUSAMMENFASSUNG.....	7
SUMMARY.....	8
1 EINLEITUNG	9
1.1 Interferone	9
1.1.1 Typ I, Typ II und Typ III Interferone	9
1.1.2 Jak/STAT Signaltransduktion	9
1.1.3 IFN induzierte Genexpression.....	11
1.2 Humane Cytomegaloviren.....	13
1.2.1 Aufbau und Genomorganisation.....	13
1.2.2 Genexpression und Replikation.....	15
1.2.3 Klinische Bedeutung	16
1.3 HCMV Immunevasion	17
1.3.1 IFN Antagonisten	17
1.3.2 Inhibitoren der IFN induzierten Genprodukte.....	18
1.4 Ziel dieser Arbeit	19
2 ERGEBNISSE	21
2.1 Erstellung von cDNA-Banken aus HCMV-infizierten Zellen	21
2.1.1 Das Gateway-System als Klonierungsprinzip	21
2.1.2 5'-Cap-Selektion zur Anreicherung von <i>full length</i> Transkripten.....	23
2.1.3 Detektion und Analyse von HCMV Transkripten.....	25
2.1.4 Repräsentatives Abbild des HCMV Transkriptoms.....	27
2.2 Eigenschaften der HCMV cDNA-Bank	32
2.2.1 Polycistronische cDNAs werden begrenzt durch 3'-coterminale Enden	32
2.2.2 Ein erweitertes Kodierungspotential des HCMV Genoms.....	36
2.2.3 <i>Antisense</i> Transkription von kodierenden Genregionen.....	41
2.2.4 Nicht kodierende virale Transkripte der cDNA-Bank.....	43
2.2.5 Gespleißte virale Transkripte der cDNA-Bank	44
2.3 Expression der HCMV cDNAs	47
2.3.1 Der lentivirale Vektor pMACE als Expressionsvektor der cDNA-Bank.....	47
2.4 Funktionelles FACS-Screening der cDNA-Bank nach IFN-Antagonisten	54
2.4.1 Zelllinien-Screening zur Etablierung einer IFN-induzierbaren Reporterzelllinie	55
2.4.2 Anreicherung eines Modell-IFN-Antagonisten im FACS.....	57
2.4.3 Anreicherung einer IFN-insensitiven Subpopulation im FACS-Screening	60
2.4.4 Stathmin-1 als potentieller Regulator des Jak/STAT Signalwegs.....	65
3 DISKUSSION	71
3.1 Einsicht in das komplexe HCMV Transkriptom	71
3.2 Die cDNA-Bank als Instrument zur Entschlüsselung von HCMV Genfunktionen ..	79
3.3 Stathmin-1 – mehr als nur ein Regulator der Mikrotubuli-Organisation?.....	83
4 MATERIAL UND METHODEN.....	87
4.1 Materialien.....	87

4.1.1	Geräte	87
4.1.2	Chemikalien und Biochemikalien	88
4.1.3	Puffer und Lösungen	91
4.1.4	Primer	93
4.1.5	Plasmide	95
4.1.6	Antikörper.....	96
4.1.7	<i>E. coli</i> Stämme.....	96
4.1.8	Humane Zelllinien	97
4.1.9	Viren	97
4.2	Arbeiten mit <i>E.coli</i>	98
4.2.1	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> für Plasmid-Transformationen	98
4.2.2	Transformation kompetenter <i>E.coli</i>	98
4.2.3	Glycerol-Dauerkulturen.....	98
4.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	99
4.3.1	Zellkultur	99
4.3.2	Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff	99
4.3.3	Transfektion.....	99
4.3.4	IFN- γ Behandlung	100
4.4	Virologische Arbeiten.....	100
4.4.1	Herstellung eines gereinigten HCMV-Stocks	100
4.4.2	Infektion mit HCMV	100
4.4.3	Titration von HCMV	101
4.4.4	Herstellung lentiviraler Partikel und Infektion von Zielzellen.....	101
4.5	Molekularbiologische Methoden.....	102
4.5.1	RNA-Isolation	102
4.5.2	cDNA-Synthese und Klonierung in pENTR	102
4.5.3	cDNA-Transfer von pENTR in pMACE durch homologe Rekombination.....	102
4.5.4	Präparation von Plasmid-DNA.....	102
4.5.5	Klonierung von pIRES- <i>STMN1</i> , pMACE, und puc2CL6IEGwo-SeV C-HA....	102
4.5.6	PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	103
4.5.7	Restriktionsverdau.....	104
4.5.8	Präparation genomischer DNA eukaryotischer Zellen.....	104
4.5.9	Präparation viraler DNA aus Virionen	105
4.5.10	Sequenzierung	105
4.5.11	Southern Blot.....	105
4.5.12	Slot Blot.....	105
4.5.13	Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter Sonden	106
4.5.14	DIG-Detektion.....	106
4.6	Proteinanalytische und immunologische Methoden.....	106
4.6.1	Western Blot.....	106

4.6.2 Durchfluscytometrie	108
4.6.3 FACS-Sortierung.....	109
LITERATURVERZEICHNIS	110
ABKÜRZUNGEN	129
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	134
TABELLENVERZEICHNIS.....	136
ANHANG	137
Zusätzliche Abbildungen und Tabellen.....	137
Lebenslauf	141
Vorträge	143
Poster	143
DANKSAGUNG	145
ERKLÄRUNG	147

ZUSAMMENFASSUNG

Die IFN- γ induzierte Signalkaskade beruht auf der Integrität des Jak/STAT Signalwegs. Das humane Cytomegalovirus (HCMV) unterbindet die IFN- γ Signaltransduktion durch vielfältige redundante Mechanismen, die eine Degradation von Jak1, die Dephosphorylierung von STAT1 und die Stilllegung STAT1 abhängiger Promotoren umfassen. Diese redundanten Inhibitionsmechanismen verdeutlichen vor dem Hintergrund des ungewöhnlich umfangreichen HCMV-Kodierungspotentials von mehr als 700 *open reading frames* (ORFs) die Notwendigkeit neuer Screening-Ansätze zur Identifikation der verantwortlichen HCMV kodierten Genprodukte innerhalb einer viralen cDNA-Bank.

Zur Herstellung einer HCMV cDNA-Bank wurden 5'-Cap bindende Antikörper eingesetzt, um auf *full length* cDNAs zu selektionieren und komplette kodierende Sequenzen von langen polycistronischen Transkripten sicherzustellen. Dadurch liefert die cDNA-Bank ein repräsentatives Abbild des HCMV Transkriptom und beinhaltet auch Transkripte geringer Abundanz, die in bisherigen cDNA-Banken fehlen. Die Anwesenheit von Transkripten, die ausschließlich für neu identifizierte ORFs kodieren, und viele Transkripte mit neu identifizierten ORFs an der 5'-nächstgelegenen Position bestätigen eine erweiterte Kodierungskapazität des HCMV Genoms. Zuvor unbeschriebene potentielle ORFs und *antisense* Transkripte deuten eine bisher nicht erfasste Komplexität der HCMV Genexpression an. Im Gegensatz zum hohen Kodierungspotential ist die Zahl der Polyadenylierungssignale im HCMV Genom limitiert. Deshalb ist die Nutzung eines Polyadenylierungssignal zur Terminierung unterschiedlicher mRNAs eine weitverbreitete Eigenschaft in diversen Genregionen. Infolgedessen tragen 81% aller mRNAs die genetische Information für mehrere ORFs.

Eine stabile Expression der HCMV cDNA-Bank nach lentiviraler Transduktion erlaubt ein funktionelles Screening nach potentiellen IFN- γ Antagonisten in aufeinanderfolgenden Sortierungerunden im FACS. Das MHC Klasse II Molekül HLA-DR dient hierbei als stark induzierbarer FACS-Marker des IFN- γ Signalwegs. Als *proof of principle* konnte ein STAT1 degradierender Modell-Antagonist der IFN- γ Signaltransduktion, das Sendaivirus C-Protein, im FACS-Screening aufgereinigt werden. Folglich eignet sich das Screening-Prinzip, um Transkripte der cDNA-Bank zu identifizieren, die für virale IFN- γ Antagonisten kodieren. Das Screening der transduzierten HCMV cDNA-Bank führte zur Identifikation von Stathmin-1 als einen neuen potentiellen Regulator des IFN Signalwegs.

SUMMARY

SUMMARY

IFN- γ induced signaling relies on the integrity of the Jak/STAT pathway. Human cytomegalovirus (HCMV) is able to counteract IFN- γ signaling by multiple redundant mechanisms including Jak1 degradation, STAT1 dephosphorylation and repression of STAT1-dependent promoters. The redundant inhibition of IFN- γ signaling accompanied by a recently reported enhanced coding capacity of HCMV comprising more than 700 open reading frames (ORFs) demonstrate the need for a comprehensive and improved screening approach to identify the responsible HCMV encoded gene products within a viral cDNA library.

In order to generate a HCMV cDNA library, 5'-cap-antibodies were used to select for *full length* cDNAs ensuring complete coding sequences even of large polycistronic transcripts. The generated cDNA library provides a representative image of the HCMV transcriptome including low-abundance transcripts which were absent from previous conventional cDNA libraries. Transcripts encoding exclusively for newly identified ORFs and many transcripts with newly identified ORFs at the most 5'-position confirmed the extended coding potential of the HCMV genome. Previously unrecognized potential ORFs and *antisense* transcripts indicated further levels of HCMV genetic complexity. In contrast to the very high coding potential the number of polyadenylation sites in the HCMV genome is surprisingly limited. The usage of the same polyadenylation signal to terminate different mRNAs is a common feature in various gene regions. Altogether 81% of all mRNAs carry the genetic information for more than one ORF.

Stable HCMV cDNA library expression by transduction of lentiviral vectors allowed a screening and enrichment of potential IFN- γ antagonists in successive sorting steps by FACS. MHC class II gene HLA-DR was chosen as a highly inducible FACS-marker of IFN- γ signaling. As a proof of principle a STAT1-degrading model IFN antagonist, the Sendai virus C protein, was purified by FACS-screening. This screening principle is utilized to identify cDNA library transcripts encoding for viral IFN- γ antagonists. FACS-screening of the transduced HCMV cDNA library identified Stathmin-1 as a potential new regulator of IFN signaling.

1 EINLEITUNG

1.1 Interferone

1.1.1 Typ I, Typ II und Typ III Interferone

Interferone stellen eine Gruppe von Cytokinen dar, die eine elementare Funktion in der angeborenen Immunität einnehmen. Interferone konnten bereits früh als lösliche Faktoren der Allantois-Membran Influenza-Virus infizierter Hühnereier identifiziert werden (Isaacs & Lindenmann, 1957). Der Name Interferon (IFN) leitet sich aus der Interferenz dieser Faktoren bezüglich einer Virus-Infektion ab, sodass die Zugabe von IFN andere nicht infizierte Zellen vor einer Virus-Infektion schützte. Mittlerweile erstrecken sich die Kenntnisse der biologischen Funktion von Interferonen neben der antiviralen Aktivität auch auf Bereiche der Immunmodulation und Tumorkontrolle. Interferone werden in Typ I und Typ II Interferone unterteilt, die sich im Rezeptor unterscheiden, der für die Signalweiterleitung benötigt wird. Daraus ergeben sich unterschiedliche Signalwirkungen. Typ I Interferone setzen sich klassisch aus IFN- α und IFN- β zusammen. Weitere humane Typ I Interferone werden als IFN- ϵ , IFN- κ und IFN- ω bezeichnet. IFN- δ und IFN- τ wurden bisher in Schweinen und Rindern identifiziert und besitzen keine humanen Homologe (Pestka *et al.*, 2004). Die IFN- α Genfamilie mit mindestens 13 Subtypen wird hauptsächlich in Leukozyten, insbesondere von plasmacytoiden dendritischen Zellen (pDCs) gebildet (Barchet *et al.*, 2002). IFN- β wird hingegen in nahezu allen Zelltypen als Antwort auf eine Virusinfektion durch die Aktivierung von PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*)-Rezeptoren produziert. Das einzige Typ II IFN, IFN- γ , wird von Zellen des Immunsystems wie aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphocyten sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) hergestellt. Zu den Typ III Interferonen zählen IFN- λ 1, IFN- λ 2 und IFN- λ 3, auch bekannt als Interleukin-29 (IL-29), IL-28A und IL-28B. Typ III Interferone besitzen ebenfalls antivirale Aktivität (Lopusna *et al.*, 2013).

1.1.2 Jak/STAT Signaltransduktion

Interferone wirken nicht selbst antiviral, sondern induzieren als Signalmoleküle in autokriner und parakriner Weise die Expression zahlreicher antiviraler Effektormoleküle. Die

EINLEITUNG

intrazelluläre Signaltransduktion von Interferonen nach Bindung an den jeweiligen Rezeptor erfolgt über den Jak/STAT Signalweg. Die Identifizierung von Komponenten des Jak/STAT Signalwegs in *Drosophila melanogaster* spricht für dessen Bedeutung und evolutionäre Konservierung (Dearolf, 1999). IFN Rezeptoren besitzen selbst keine katalytische Aktivität, sondern sind mit Janus (Jak) Kinasen assoziiert. Diese Familie von Tyrosin-Kinasen besteht in Säugetieren aus Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2. Die Ligandenbindung löst durch das Rearrangement und die Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten eine Autophosphorylierung und Aktivierung der Jak Kinasen aus, wodurch eine Kaskade sukzessiver Tyrosin-Phosphorylierungen des Rezeptors und von Transkriptionsfaktoren, den *signal transducers and activators of transcription* (STATs), initiiert wird. Die STAT Protein-Familie besteht in Säugetieren aus sieben Mitgliedern, STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b und 6. Durch Phosphorylierung aktivierte STATs bilden Dimere und translozieren in den Nukleus. Dort steuern sie die Expression einer Vielzahl von Zielgenen.

Die Signaltransduktion von IFN- α , IFN- β und IFN- γ zeichnet sich durch die genannten Gemeinsamkeiten aus, unterscheidet sich jedoch in der Zusammensetzung der Komponenten (Abb. 1.1), woraus sich ein zwar teilweise überlappendes, aber nicht redundantes Genexpressionsprofil ergibt (Der *et al.*, 1998). Der Rezeptor der Typ I Interferone setzt sich aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 zusammen und ist mit Jak1 und Tyk2 assoziiert. Aktivierte STAT1 und STAT2 Moleküle bilden ein Heterodimer, das nach Translokation in den Nukleus p48/IRF9 rekrutiert. Dieser ternäre Komplex wird als *interferon stimulated gene factor 3* (ISGF3) bezeichnet und bindet an ein spezifisches DNA-Motiv in Promotorregionen, das *interferon stimulated response element* (ISRE). Vergleichbar führt die IFN- γ Bindung an die Rezeptoruntereinheiten IFNGR1 und IFNGR2 zur Aktivierung von Jak1 und Jak2. Dadurch wird die Phosphorylierung von STAT1 ausgelöst, das Homodimere bildet, die auch als *gamma activated factor* (GAF) bezeichnet werden. Nach Translokation in den Nukleus bindet GAF *gamma activated sequences* (GAS). Typ I Interferone können auch in einem geringen Ausmaß GAF produzieren. Zusätzlich können beide IFN Typen auch zur Aktivierung weiterer STAT Moleküle beitragen. In beiden Fällen ist eine Relevanz für die Signalweiterleitung bisher weitestgehend unklar (Platanias, 2005). Typ I und Typ II Interferone induzieren auch die Serin-Phosphorylierung von STAT1, die weder für eine Translokation zum Nukleus noch eine Promotorbindung relevant ist, jedoch für die

EINLEITUNG

Etablierung einer vollständigen transkriptionellen Aktivierung IFN induzierter Gene essentiell ist (Wen & Darnell, 1997; Wen *et al.*, 1995).

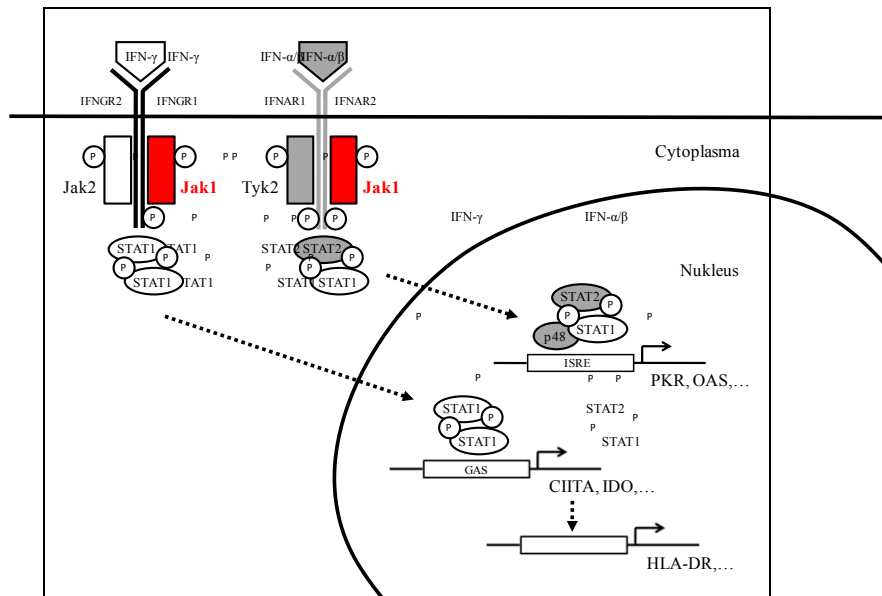


Abb. 1.1: Jak/STAT Signaltransduktion

Schematische Darstellung der IFN- γ und IFN- α/β Signaltransduktion. Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Signalkaskaden sind farblich hervorgehoben. Detaillierte Erläuterungen finden sich im Text.

1.1.3 IFN induzierte Genexpression

Die antivirale Aktivität der Interferone entfaltet sich in der Expression von *IFN stimulated genes* (ISGs), die entweder direkt antiviral wirken oder die adaptive Immunantwort beispielsweise durch eine gesteigerte Antigenpräsentation verbessern. Die essentielle Bedeutung für die Kontrolle von viralen Infektionen verdeutlicht sich in *in vivo* Studien durch eine erhöhte Anfälligkeit von STAT1-defizienten Säuglingen und *knockout*-Mäusen, denen Komponenten des Jak/STAT Signalwegs fehlen (Dupuis *et al.*, 2003; Durbin *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1994). Der antivirale Zustand manifestiert sich durch typische ISRE-abhängige Gene, wie die Proteinkinase R (PKR), die 2'-5'-Oligoadenylsynthetase (OAS) und die GTPase Mx. PKR wird durch doppelsträngige RNA (dsRNA), die während Virusinfektionen produziert wird, aktiviert. Aktivierte PKR phosphoryliert die α -Untereinheit des eukaryotischen Translations-Initiations-Faktors eIF2 α , wodurch dieser nicht mehr die

EINLEITUNG

Translation einleiten kann. OAS benötigt ebenfalls dsRNA zur Aktivierung und produziert Oligoadenylate mit unüblicher 2'-5'-Verknüpfung. Diese binden und aktivieren die RNase L, die cytoplasmatische RNAs spaltet. Beide Mechanismen vermitteln eine generelle Inhibition der zellulären Proteinsynthese, wodurch gleichzeitig auch die virale Genexpression blockiert wird. Wesentliche immunmodulatorische Funktionen von IFN- α/β betreffen die Steigerung der Cytotoxizität von NK-Zellen und eine proliferationsfördernde Wirkung auf Gedächtnis-T-Zellen (Goodbourn *et al.*, 2000).

IFN- γ induziert eine weite Bandbreite von Enzymen, die antiviral oder antimikrobiell wirken. Dies kann direkt oder indirekt über den IFN- γ induzierbaren Transkriptionsfaktor IRF-1 geschehen. Zu diesen Enzymen zählen p47 GTPasen (Taylor *et al.*, 2004), die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO). IDO katalysiert die Oxidation des Pyrrol-Rings der Aminosäure L-Tryptophan zu N-Formyl-Kynurenin, das zu dem stabilen Endprodukt Kynurenin metabolisiert wird. Dadurch entsteht eine lokale Unterversorgung der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan, die das Wachstum eines breiten Pathogen-Spektrums, von Protozoen bis Viren, einschränkt (Adams *et al.*, 2004; Bodaghi *et al.*, 1999; MacKenzie *et al.*, 2007). Außerdem besitzt IDO immunmodulatorische Eigenschaften, indem die Proliferation von T-Zellen inhibiert wird (Mellor & Munn, 2004). Unabhängig von der katalytischen Aktivität agiert IDO als Signalmolekül in pDCs (Pallotta *et al.*, 2011).

Sowohl Typ I als auch Typ II Interferone besitzen die Fähigkeit, die Transkription der *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I Gene zu induzieren und folglich die Antigen-Präsentation endogener Peptide an CD8⁺ T-Zellen zu fördern. Der MHC-I Komplex setzt sich aus einer Membran-verankerten schweren Kette und β 2-Microglobulin (β 2m) zusammen. Im ER bildet sich aus diesem Heterodimer zusammen mit TAP (*transporter associated with antigen processing*) und weiteren Komponenten der Peptid-Beladungskomplex (*peptide loading complex*, PLC). Proteasomal degradierte Peptide werden über TAP in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) geschleust und beladen den MHC-I Komplex, woraufhin dieser über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche gelangt. Auch die Expression weiterer Komponenten der Peptid-Beladung und Peptid-Prozessierung wird durch IFN- γ reguliert. IFN- γ induziert die Expression der Untereinheiten des Immunproteasoms, woraufhin sich Proteasomen bilden, die eine veränderte Peptid-Produktion und Antigen-Präsentation zur Folge haben (McCarthy & Weinberg, 2015).

EINLEITUNG

Im Gegensatz zu MHC-I Molekülen, die sich auf der Oberfläche von nahezu allen Zelltypen finden, fokussiert sich die Expression der MHC Klasse II auf professionelle Antigen-präsentierende Zellen (antigen presenting cells, APC) wie B-Zellen, dendritische Zellen und Monocyten/Makrophagen. Präsentiert werden exogene Antigene, die von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden. Der MHC-II Komplex besteht aus zwei Membran-verankerten Untereinheiten, α und β , die im ER mit der invarianten Kette CD74 (Ii) interagieren. Ein CD74-abgeleitetes Peptid, CLIP (*class II associated invariant chain peptide*), füllt die Peptid-Bindetasche aus, sodass eine vorzeitige Beladung ausgeschlossen wird. Nach dem Erreichen der Endosomen findet in einem Kompartiment, das als MIIC (*MHC class II containing compartment*) bezeichnet wird, die schrittweise Spaltung von CD74 statt. CLIP bleibt dabei mit der Peptid-Bindetasche assoziiert, bis es mit Hilfe von HLA-DM durch exogene Peptide ersetzt wird.

Die Expression von MHC-II mit seinen Isotypen HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP ist transkriptionell streng reguliert. Neben der konstitutiven Expression in APCs ist eine IFN- γ induzierte Expression in zahlreichen nicht-APCs möglich (Boss, 1997). Der entscheidende Faktor der konstitutiven und induzierten MHC-II Expression ist CIITA (*class II transactivator*), ein Cofaktor, der mit weiteren Transkriptionsfaktoren der MHC-II Promotoren interagiert. Die CIITA Expression selbst wird hierbei durch IFN- γ aktiviert.

1.2 Humane Cytomegaloviren

1.2.1 Aufbau und Genomorganisation

Humane Cytomegaloviren (HCMV) gehören zur Familie der *Herpesviridae* und gelten als prototypische Vertreter der β -*Herpesviridae*. Da HCMV eines von acht humanpathogenen Herpesviren darstellt, ist auch die Bezeichnung humanes Herpesvirus Nr.5 (HHV-5) üblich. Der Name Cytomegalovirus leitet sich von den typischen zellmorphologischen Veränderungen nach HCMV Infektion ab. Dieser cytopathische Effekt zeichnet sich durch eine Größenzunahme der Zellen und charakteristische cytoplasmatische Inklusionen aus. CMV ist strikt Spezies-spezifisch, sodass in vielen Säugetieren distinkte CMVs existieren.

EINLEITUNG

Das 200-300 nm große HCMV Virion weist die typische herpesvirale Struktur auf. Ein aus fünf Proteinen bestehendes ikosaedrisches Capsid umgibt das lineare dsDNA Genom. Das Capsid ist wiederum eingebettet in eine Protein-Matrix, dem Tegument, das sich größtenteils aus abundanten Phosphoproteinen zusammensetzt. Das Tegument wird von einer Membranhülle (*envelope*) umschlossen, die zahlreiche Glykoproteine enthält.

HCMV besitzt mit ca. 230 kb das physikalisch größte Genom unter den humanpathogenen Herpesviren. Zwei Regionen, *unique long (UL)* und *unique short (US)*, werden durch terminale (*TRL, TRS*) und interne *Repeat*-Regionen (*IRL, IRS*) begrenzt. Die ursprüngliche Sequenzierung des Genoms des HCMV Laborstamms AD169 prognostizierte ungefähr 200 ORFs (open reading frames), die für Proteine kodieren (Bankier *et al.*, 1991; Chee *et al.*, 1990). AD169 enthält infolge der intensiven Passagierung in Fibroblasten ein genetisches Arrangement, das die zusätzlichen ORFs der *ULb'*-Region klinischer Isolate durch eine duplizierte *Repeat*-Region (*IRL*) ersetzt (Cha *et al.*, 1996). Folgende Untersuchungen von HCMV Stämmen mit niedriger Passagierung, die im Wesentlichen dem Wildtyp in klinischen Isolaten entsprechen, konnten durch Sequenzvergleiche mit CMVs anderer Spezies 165-252 kodierende Gene festlegen (Davison *et al.*, 2003; Dolan *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2003a; Murphy *et al.*, 2003b). Weiterführende Untersuchungen konnten vier neue kodierende Transkripte identifizieren und deuteten bereits an, dass weitere, insbesondere für kleine Proteine kodierende ORFs bestehen könnten (Gatherer *et al.*, 2011; Varnum *et al.*, 2004). Diese Hypothese konnte kürzlich bestätigt werden und legt eine bisher beispiellose Komplexität des HCMV Genoms offen, indem 751 Protein kodierende ORFs identifiziert wurden, von denen 147 ORFs zuvor bereits Kodierungspotential zugesprochen wurde (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Die gewählte Methode, das *ribosome profiling*, nutzt die Assemblierung der Ribosomen an translatierten mRNA-Sequenzen. Nach Zugabe von Translationsinhibitoren arretieren die Ribosomen entweder am Startcodon oder im Bereich des ORFs, sodass translatierte Regionen vor einer RNase Degradation geschützt sind. Eine Sequenzierung der Fragmente definiert die kodierende Region. Neu identifizierte ORFs sind häufig innerhalb von klassischen ORFs (interne ORFs), *upstream* von klassischen ORFs (uORFs) oder *antisense* zu klassischen ORFs lokalisiert. Viele dieser ORFs besitzen ein nicht kanonisches Startcodon, insbesondere CUG. Die Funktion einer Vielzahl der neu identifizierten aber auch klassischen ORFs ist trotz Jahrzehnten der HCMV Forschung weiterhin unklar (Van Damme & Van Loock, 2014). Neben kodierenden mRNAs produziert

EINLEITUNG

HCMV ebenfalls polyadenylierte abundante lange nicht kodierende RNAs (>200 bp, *long non-coding* RNAs, lncRNAs) und *antisense* Transkripte zu kodierenden Regionen (Gatherer *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007). Eine weitere Klasse nicht kodierender HCMV RNAs stellen microRNAs (miRNAs) dar, die aus längeren Transkripten, pre-miRNAs, nach deren Prozessierung entstehen (Hook *et al.*, 2014). HCMV miRNAs besitzen eine regulatorische Funktion auf zelluläre und virale Ziel-mRNAs, indem eine partielle komplementäre Bindung üblicherweise an die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) der Ziel-mRNA zur Inhibition der Translation, mRNA Degradation oder beidem führt.

Das HCMV Genom ist vollständig sequenziert und steht als BAC (*bacterial artificial chromosome*) zur Verfügung (Borst *et al.*, 1999; Sinzger *et al.*, 2008). Dadurch ergeben sich zielgerichtete Mutagenese-Techniken in *E. coli*, die nach Transfektion der BAC-DNA in permissive Zellen eine Rekonstitution und Analyse des mutierten Virus erlauben. Genomweite Analysen konnten auf diese Weise 45 für das Wachstum in Fibroblasten essentielle Gene und 117 nicht essentielle Gene identifizieren (Dunn *et al.*, 2003).

1.2.2 Genexpression und Replikation

Die HCMV Genexpression findet streng koordiniert statt und lässt sich in drei Phasen unterteilen: die sehr frühe (*immediate early*, IE), die frühe (*early*, E) und die späte Phase (*late*, L). IE-Genexpression tritt unmittelbar nach Zelleintritt auf und benötigt lediglich zelluläre Transkriptionsfaktoren, aber keine *de novo* Synthese viraler Proteine. Zu den wichtigsten IE-Genprodukten zählen IE1/pp72 und IE2/pp86 unter Kontrolle des MIEP (*major immediate early promoter*), die eine E-Genexpression ermöglichen. L-Genexpression geht mit der viralen DNA-Synthese einher und führt vor allem zur Produktion der Strukturproteine der nächsten Generation von Virionen. Der Replikationszyklus ist verhältnismäßig langsam und benötigt 72-96 Stunden.

Charakteristisch für Herpesviren ist die Fähigkeit zur Latenz in bestimmten Zelltypen (CD14⁺ Monozyten und deren CD34⁺ Vorläuferzellen). Dabei wird nach Zelleintritt die Genexpression auf ein Minimum reduziert, sodass keine Tochter-Virionen gebildet werden. Eine latente Infektion kann auf unbestimmte Zeit unerkant vom Immunsystem persistieren und bei gewissen Stimuli den lytischen Replikationszyklus reaktivieren (Kumar & Herbein, 2014).

1.2.3 Klinische Bedeutung

HCMV ist weltweit verbreitet. Die Seroprävalenz liegt bei Erwachsenen in Westeuropa und den USA bei 40-80% (Staras *et al.*, 2006), steigt jedoch in Entwicklungsländern üblicherweise über 90% (Adjei *et al.*, 2006; Kothari *et al.*, 2002). HCMV Übertragungen finden von der Mutter auf das Kind pränatal, perinatal oder postnatal statt. Im Erwachsenenalter wird HCMV hauptsächlich sexuell übertragen, wobei sich HCMV Partikel in zahlreichen Körperflüssigkeiten (Speichel, Tränen, Urin, genitale Ausscheidungen, Muttermilch) finden. In der Regel verläuft eine HCMV Infektionen in immunkompetenten Individuen asymptomatisch. HCMV wird durch eine Kombination aus angeborener und adaptiver Immunität kontrolliert, verbleibt aber aufgrund der Latenz lebenslang im Körper. In seltenen Fällen tritt ein der Epstein-Barr-Virus (EBV, HHV-4) Mononukleose vergleichbares Krankheitsbild auf (Klemola & Kaariainen, 1965; Lajo *et al.*, 1994).

Die HCMV (Super-) Infektion stellt die häufigste kongenitale Infektion während der Schwangerschaft dar. Insbesondere bei einer Primärinfektion erhöht sich das Risiko einer Transmission auf den Föten (35-50%), die nach einer Reaktivierung deutlich seltener stattfindet (0,2-2%; Griffiths & Baboonian, 1984; Stagno *et al.*, 1982). Auftretende Symptome einer kongenitalen Infektion sind Hepatosplenomegalie, Trombozytopenie, Petechien, Mikrozephalie, Retinitis und Hepatitis bis hin zu schweren Komplikationen mit letalem Verlauf. Langzeitfolgen beinhalten Schwerhörigkeit bis zur Taubheit, geistige Retardation sowie motorische Einschränkungen (Pass *et al.*, 2006; Ross & Boppana, 2005).

Immunkompromittierte Individuen weisen aufgrund der eingeschränkten Immunantwort ein erhöhtes Risiko einer HCMV Erkrankung auf. Infolgedessen zählt HCMV bei AIDS Patienten zu den häufigsten opportunistischen Infektionen. In immunsupprimierten Empfängern von Organtransplantaten und AIDS Patienten kann eine Primärinfektion oder die Reaktivierung einer latenten Infektion organ- bzw. lebensbedrohliche Erkrankungen wie Retinitis, Hepatitis und Enzephalitis hervorrufen, die mit den vorhandenen antiviralen Medikamenten nur bedingt behandelbar sind.

1.3 HCMV Immunevasion

1.3.1 IFN Antagonisten

Nahezu alle Komponenten des IFN-Systems sind als Ziele viraler Evasions-Strategien beschrieben. Bekannte Beispiele hierfür sind die V- und C-Proteine der Paramyxoviren, deren Angriffsziel STAT Proteine darstellen (Horvath, 2004). Insbesondere HCMV zeigt eine facettenreiche Immunevasion von der initialen Induktion durch PAMPs (Abate *et al.*, 2004; Browne & Shenk, 2003; Taylor & Bresnahan, 2006a; b) bis hin zur IFN-induzierten Signaltransduktion (Trilling *et al.*, 2012). Sowohl der IFN- α/β als auch der IFN- γ induzierte Signalweg werden zeitlich gestaffelt reguliert. Bereits 6 hpi (*hours post infection*) verhindert IE1/pp72 durch eine Interaktion mit STAT1 und STAT2 die Bindung von ISGF3 an ISRE Sequenzen (Paulus *et al.*, 2006). Zusätzlich induziert IE1 überraschenderweise IFN-unabhängig, aber STAT1-abhängig die Expression klassischer IFN- γ responsibler Gene u.a. von inflammatorischen Chemokinen (Knoblach *et al.*, 2011), die möglicherweise eine Rolle in der HCMV-Dissemination spielen, indem zirkulierende Leukocyten angelockt werden (Lacotte *et al.*, 2009). Zum gleichen Zeitpunkt inhibiert HCMV durch einen Mechanismus *downstream* der STAT1 Phosphorylierung und nukleären Translokation, die zu diesem Zeitpunkt noch intakt sind, eine IFN- γ induzierte CIITA Promotor-Aktivierung und folglich eine HLA-DR Expression (Le Roy *et al.*, 1999). Im Folgenden treten Dephosphorylierungen von STAT1 und STAT2 auf (Le *et al.*, 2008). Die Aktivierung der zellulären Tyrosin-Phosphatase SHP2 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2*) durch HCMV resultiert dabei in der Dephosphorylierung von STAT1. Anschließend reduzieren sich auch die Proteinmengen von p48 (Miller *et al.*, 1999), STAT2 (Le *et al.*, 2008) und Jak1 (Miller *et al.*, 1998) in Folge der HCMV Infektion. Ein posttranslationaler Mechanismus, der vermutlich eine proteasomale Degradation einschließt, führt zum Verlust von Jak1 in HCMV infizierten Zellen, sodass eine IFN- γ induzierte Expression von CIITA und HLA-DR vollständig blockiert wird (Miller *et al.*, 1998). Die multiplen Inhibitions-Mechanismen der IFN Signaltransduktion erscheinen redundant; jedoch garantiert die zeitlich koordinierte Inhibition von Kinasen, Transkriptionsfaktoren und Promotoren eine effiziente Stilllegung der IFN induzierbaren Zielgene. Diese Strategie stellt ein allgemeines Muster der HCMV vermittelten Immunevasion dar (siehe 1.3.2). Mit Ausnahme von IE1/pp72 konnte bisher kein für die Inhibition der IFN Signaltransduktion verantwortliches HCMV Genprodukt identifiziert werden.

1.3.2 Inhibitoren der IFN induzierten Genprodukte

Zusätzlich zu der allgemeinen Inhibition der IFN Signaltransduktion, die eine Expression von IDO (Zimmermann *et al.*, 2014) und den Untereinheiten des Immunproteasoms (Khan *et al.*, 2004) einschränken, existieren spezifische Antagonisten IFN induzierbarer Effektormoleküle. Die IRS1 und TRS1 Genprodukte binden dsRNA und vermeiden eine dsRNA-abhängige Aktivierung von PKR und RNase L (Child *et al.*, 2004). Gleich mehrere Genprodukte der US2-11 Region sind involviert in der Inhibition einer effizienten Antigen-Präsentation durch MHC-I und MHC-II Moleküle. Das IE-Genprodukt US3 hält MHC-I Moleküle im ER zurück (Ahn *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1996) und verhindert eine optimale Peptidbeladung durch eine Interaktion mit Tapasin, einem Chaperon des Peptid-Beladungskomplexes (Park *et al.*, 2004). Zusätzlich bindet US3 an das MHC-II α/β Heterodimer und unterbindet eine Assoziation mit CD74, sodass ein Transport zu MIIC Kompartimenten reduziert wird (Hegde *et al.*, 2002). Die E-Genprodukte US2 und US11 initiieren unabhängig voneinander eine Dislokation neu synthetisierter schwerer Ketten vom ER in das Cytosol, woraufhin diese im Proteasom degradiert werden (Wiertz *et al.*, 1996a; Wiertz *et al.*, 1996b). Ein Unterschied besteht in der MHC-I Allel-Spezifität von US2 und US11 (Barel *et al.*, 2003a; Barel *et al.*, 2003b). Nur US2 vermittelt außerdem eine Degradation von HLA-DR- α und HLA-DM- α (Tomazin *et al.*, 1999). US6 verhindert einen Peptid-Import in das ER-Lumen durch TAP, wodurch keine TAP abhängige Peptid-Beladung stattfindet (Ahn *et al.*, 1997; Hengel *et al.*, 1997). US10 verzögert den Transport von MHC-I Molekülen zur Zelloberfläche (Furman *et al.*, 2002). Neben den US2-11 Proteinen exprimiert HCMV eine miRNA, miR-US4 (Kim *et al.*, 2011). Diese miRNA reguliert spezifisch die mRNA der Aminopeptidase ERAP1 (*endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*), die an der N-terminalen Prozessierung der Peptide nach dem Transport durch TAP beteiligt ist. Auch eine pp71 (UL82) abhängige verzögerte MHC-I Maturation (Trgovcich *et al.*, 2006) und eine pp65 (UL83) vermittelte lysosomale Degradation von HLA-DR (Odeberg *et al.*, 2003) sind beschrieben. Infizierte Zellen werden aufgrund des Verlusts von MHC-I auf der Zelloberfläche zugänglich für eine Lyse durch NK-Zellen. Fehlende inhibitorische Signale werden durch eine Oberflächenexpression von HLA-E sowie des viralen MHC-I Homologs UL18 und durch die Retention von Liganden aktivierender NK-Rezeptoren im ER kompensiert (Wilkinson *et al.*, 2008).

1.4 Ziel dieser Arbeit

Obwohl multiple Hinweise und Phänotypen der HCMV vermittelten Inhibition des Jak/STAT Signalwegs seit längerem beschrieben sind (Baron & Davignon, 2008; Le Roy *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1998), ist es bislang nicht gelungen, die verantwortlichen Gene zu identifizieren. Zuerst wurde eine systematische Analyse von BAC-abgeleiteten Deletionsmutanten zur Identifizierung der HCMV IFN-Antagonisten durchgeführt. Da viele HCMV-Deletionsmutanten einen vergleichsweise niedrigen Virustiter aufwiesen, war ein Screening auf Einzelzellebene unumgänglich, um infizierte und nicht infizierte Zellen unterscheiden zu können. Daher wurde ein FACS-basierendes Screening-System etabliert (Diplomarbeit M. Maywald, 2009), in dem IFN- γ -induzierbare Proteine (HLA-DR oder IDO) als Marker der IFN-Induktion und HCMV kodierte Fc γ -Rezeptoren (Atalay *et al.*, 2002; Budt *et al.*, 2004; Lilley *et al.*, 2001) als Marker der HCMV-Infektion gemessen wurden. In der FACS-Analyse kann dadurch zwischen infizierten Zellen mit blockiertem IFN-Signalweg und nicht infizierten IFN-responsiblen Zellen eindeutig unterschieden werden, wobei ein Anteil von nur 5% infizierten Zellen zur Beurteilung der Fähigkeit der Mutante zur Regulation der IFN-Signaltransduktion ausreicht. Die systematische Analyse von HCMV-Deletionsmutanten, die immerhin etwa die Hälfte der Kodierungskapazität des Virusgenoms abdecken, führte jedoch nicht zur Identifizierung von Kandidatengen. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der möglichen Redundanz von immunevasiven HCMV-Proteinen, wie sie bereits bei Antagonisten der MHC-Klasse-I Präsentation (Halenius *et al.*, 2015) oder NK-Zell Aktivierung detailliert beschrieben sind (Wilkinson *et al.*, 2008). Demzufolge hätte die Deletion eines IFN-Antagonisten in einer untersuchten Mutante aufgrund der redundanten Wirkung anderer Gene keine oder nur geringe messbare Auswirkungen. Zusätzlich sind Genprodukte, die von essentiellen Bereichen des Genoms kodiert werden oder Teil einer essentiellen Transkriptionseinheit sind, von einem Screening ausgeschlossen, da sich Deletionsmutanten nicht oder nur mit Hilfe von komplementierenden Zellen herstellen ließen.

Beide Fälle verdeutlichen die Vorteile eines *gain of function* Ansatzes, wie sie die funktionelle Analyse möglichst vieler HCMV-Gene innerhalb einer cDNA-Bank bietet. Unterstrichen wird die Bedeutung der Analyse einer cDNA-Bank durch den erheblichen Anstieg der tatsächlich translatierten HCMV Genprodukte auf mehr als 700, die in bisherigen genomweiten Analysen außer Acht gelassen wurden (Stern-Ginossar *et al.*, 2012).

ERGEBNISSE

Bereits publizierte HCMV cDNA-Banken (Ma *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007; Bachelorarbeit M. Preuten, 2011) zeigen jedoch Mängel in Vollständigkeit und Qualität der cDNA-Konstrukte. Zum einen fehlen Transkripte für bedeutende immunregulatorische HCMV-Proteine wie beispielsweise den MHC-I Antagonisten US2, zum anderen enthalten viele Klone nicht kodierende cDNAs (Zhang *et al.*, 2007). Außerdem sind viele cDNAs entweder 5'- oder 3'-verkürzt. Hieraus ergab sich die Notwendigkeit der Herstellung einer repräsentativen Expressions-cDNA-Bank zur Identifizierung der HCMV kodierten IFN-Antagonisten.

Ziel dieser Arbeit war somit die Herstellung einer repräsentativen *full length* HCMV Expressions-cDNA-Bank. In einem anschließenden funktionellen FACS-Screening der cDNA-Bank ließen sich Kandidatengene zur Inhibition des IFN Signalwegs anhand der etablierten IFN- γ induzierbaren Marker identifizieren.

2 ERGEBNISSE

2.1 Erstellung von cDNA-Banken aus HCMV-infizierten Zellen

2.1.1 Das Gateway-System als Klonierungsprinzip

Aufgrund der streng regulierten Genexpression von Herpesviren ist es notwendig, RNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion zu isolieren, damit eine cDNA-Bank das HCMV-Transkriptom möglichst vollständig widerspiegelt. Bei der Wahl dieser Zeitpunkte wurde sich an dem beschriebenen Verlauf der HCMV vermittelten Inhibition der Jak/STAT Signalkaskade orientiert, um sicherzustellen, dass Transkripte der zu identifizierenden IFN-Antagonisten exprimiert werden. Bereits 24 hpi ist eine Degradation von Jak1 feststellbar, die sich bis zum Ende des Replikationszyklus nach 72 h fortsetzt (Le *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 1998). Dementsprechend wurde RNA von infizierten MRC-5 Zellen 24 hpi und 72 hpi zur Herstellung der cDNA-Bank verwendet. Die immunevasive Wirkung der HCMV IFN Antagonisten wurde größtenteils in MRC-5 Zellen, die eine hohe Suszeptibilität für HCMV Infektionen aufweisen, beschrieben oder bestätigt. Die Genprodukte des HCMV Laborstamms AD169 reichen hierbei aus, um die IFN Signaltransduktion vollständig zu inhibieren. Um möglichst viele HCMV Gene inklusive der *ULb'*-Region zu erfassen, wurde zusätzlich der HCMV Stamm TB40/E verwendet. Die Klonierung der cDNA-Bank erfolgte zunächst mittels Gateway-Technologie in den pDONR-Vektor. Hierdurch wurde eine einfache Subklonierung in verschiedene Vektor-Systeme auf Basis von sequenzgesteuerter homologer Rekombination zur späteren funktionellen Analyse der cDNA-Bank ermöglicht. Die Gateway-Technologie basiert auf den Prinzipien der homologen Rekombination des Bakteriophagen λ (Landy, 1989). Die Rekombination findet zwischen zwei interagierenden DNA-Molekülen mit spezifischen *att* (*attachment*) Rekombinationsstellen statt. Die cDNA-Synthese begann mit der Anlagerung biotinylierter Poly(T) 3'-Primer, die auch eine *attB2*-Sequenz enthalten, an den mRNA-Poly(A)-Schwanz (Abb. 2.1 I). Im Idealfall fand mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) eine vollständige Synthese des ersten cDNA-Strangs bis zum 5'-Cap der mRNA statt. Im Falle eines vorzeitigen Abbruchs der RT-Reaktion wurden die daraus resultierenden verkürzten cDNA/RNA Hybride per RNase I verdaut (Abb. 2.1 II). Um den Syntheseprozess zu optimieren, wurden cDNAs mit Hilfe von 5'-cap-bindenden Antikörpern,

ERGEBNISSE

die an magnetische *beads* gekoppelt sind, selektioniert (Abb. 2.1 III). Dies führte zu einer deutlichen Anreicherung von *full length* Transkripten, die das vollständige 5'-Ende der jeweiligen mRNA enthalten. Nach Elution der *full length* cDNAs fügte eine Ligation am 5'-Ende einen Adapter an, der sowohl eine *attB1* Rekombinationsstelle enthält als auch als Primerbindestelle des zweiten Stranges der cDNA-Synthese diente (Abb. 2.1 IV).

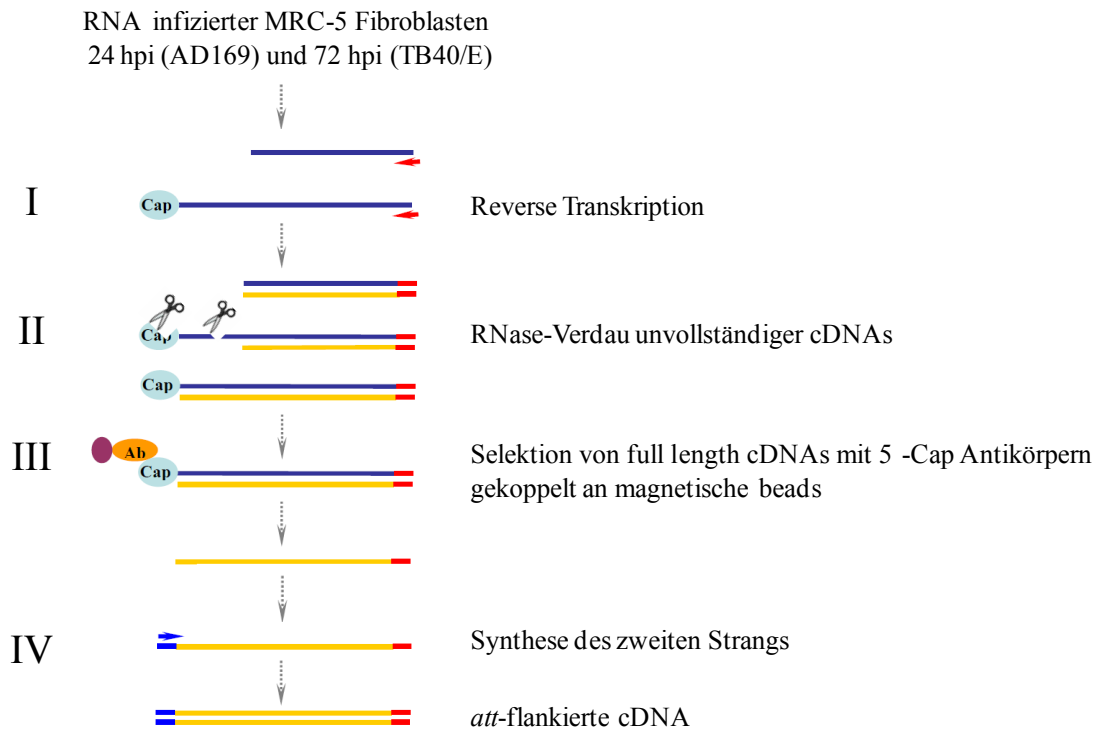


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese

5'-Cap bindende Antikörper ermöglichen eine Anreicherung von *full length* cDNAs. Detaillierte Erläuterungen finden sich im Text. Dargestellt sind RNA (blau), DNA (gelb), Poly(A)-Primer (rote Pfeile), 5'-Adapter (blaue Pfeile), *att* Rekombinationsstellen (rote/blau Balken), magnetische *beads* (violett) und 5'-Cap bindende Antikörper (Ab). Verändert nach Superscript Full Length cDNA Construction Kit II (Invitrogen).

Beide integrierten *att* Rekombinationsstellen am 5'- und 3'-Ende der cDNA erlauben im Folgenden eine Klonierung in den ebenfalls *att* Rekombinationsstellen enthaltenden Zielvektor. Es gibt vier verschiedene *att* Rekombinationsstellen (*attB*, *attP*, *attL* und *attR*), deren Sequenzen ähnlich, aber nicht exakt gleich sind. Außerdem sind diese *att* Rekombinationsstellen nicht palindromisch und geben somit die Orientierung der zu

ERGEBNISSE

klonierenden cDNA-Sequenz vor. Entsprechend reagiert beispielsweise *attB1* ausschließlich mit *attP1* und es entstehen *attL1* und *attR1* (Abb. 2.2). In einem ersten Rekombinationsschritt wurde eine *entry* cDNA-Bank (pENTR) generiert, indem die synthetisierte cDNA in den Zielvektor pDONR222 eingefügt wurde. Die cDNA ersetzte hierbei das für ein Toxin kodierende *ccdB* Gen. Dies erlaubte nach Rekombination und Transformation neben der Expression eines Kanamycin-Resistenzgens eine zusätzliche negative Selektion in *E. coli*. Das CcdB Protein interferiert mit der *E. coli* DNA-Gyrase und verhindert somit das Wachstum der meisten *E. coli* Stämme. Bakterien, die entweder nicht-rekombinierten pDONR222 oder das *ccdB* Gen enthaltende Beiprodukt aufnehmen, können nicht wachsen. Das Ausplattieren einer *E. coli* Verdünnungsreihe nach Transformation der cDNA-Bank ergab einen Titer von 10^4 unabhängigen Klonen mit jeweils individuellen cDNA-Konstrukten.

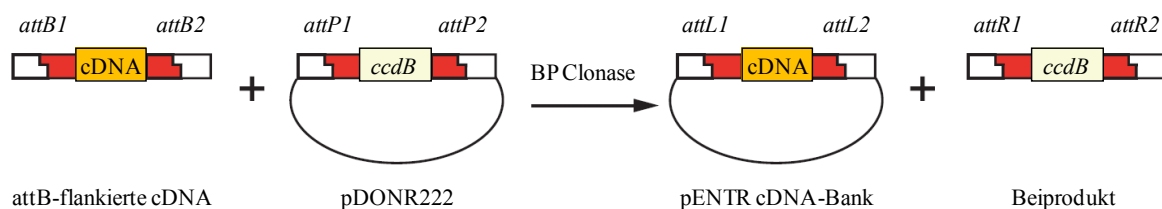


Abb. 2.2: Klonierung der cDNAs mittels homologer Rekombination

Die *attB*-Rekombinationsstellen der cDNAs ermöglichen eine Rekombination mit den pDONR222 *attP*-Rekombinationsstellen. Nach Rekombination ersetzen die cDNA Sequenzen der pENTR cDNA-Bank das Toxin kodierende Gen *ccdB*. Verändert nach Superscript Full Length cDNA Construction Kit II (Invitrogen).

2.1.2 5'-Cap-Selektion zur Anreicherung von *full length* Transkripten

Um die korrekte Integration der cDNAs in den Vektor zu kontrollieren, wurde Plasmid-DNA einzelner pENTR cDNA-Klone präpariert. Die beiden cDNA-flankierenden *att* Rekombinationsstellen enthalten jeweils eine *BsrGI* Restriktionsschnittstelle. Der pDONR-Vektor besitzt eine zusätzliche *BsrGI* Restriktionsschnittstelle im *ccdB* Gen, wodurch ein Bandenmuster von 2,5 kb, 1,4 kb und 790 bp entsteht. Nach Rekombination verbleiben lediglich zwei *BsrGI* Restriktionsschnittstellen im pENTR-Vektor, falls die integrierte cDNA keine enthält. Die Bande bei 2,5 kb im *BsrGI* Restriktionsverdau der pENTR cDNA-Klone entspricht somit dem pENTR-Rückgrat, alle weiteren Banden lassen sich den jeweils

ERGEBNISSE

integrierten cDNAs zuordnen (Abb. 2.3). Anhand der Bandengröße der cDNA-Inserts dieser zufällig gewählten Klone lässt sich bereits eine große Bandbreite von kurzen 600 bp cDNAs bis hin zu 4 kb cDNAs erahnen. Insgesamt lag die Insertgröße zellulärer cDNAs zwischen 200 bp und 6 kb. Der Nachweis langer cDNAs zeigt, dass die reverse Transkriptase auch das 5'-Ende dieser ausgedehnten Sequenzen erreicht. Nach Auswertung von 50 Einzelklonen weist eine durch 5'-Cap Selektion hergestellte cDNA-Bank eine durchschnittliche cDNA-Insertgröße von 1,9 kb auf. Damit ist dieser Wert verglichen mit konventionellen HCMV cDNA-Banken ohne 5'-Cap Selektion, deren durchschnittliche cDNA-Insertgrößen 1-1,2 kb betragen (Ma *et al.*, 2011; Bachelorarbeit M. Preuten, 2011), annähernd doppelt so hoch. Dies deutet bereits auf eine vollständige Klonierung der 5'-untranslatierten Regionen (5'-UTRs) und kodierenden Sequenzen nach 5'-Cap Selektion hin.

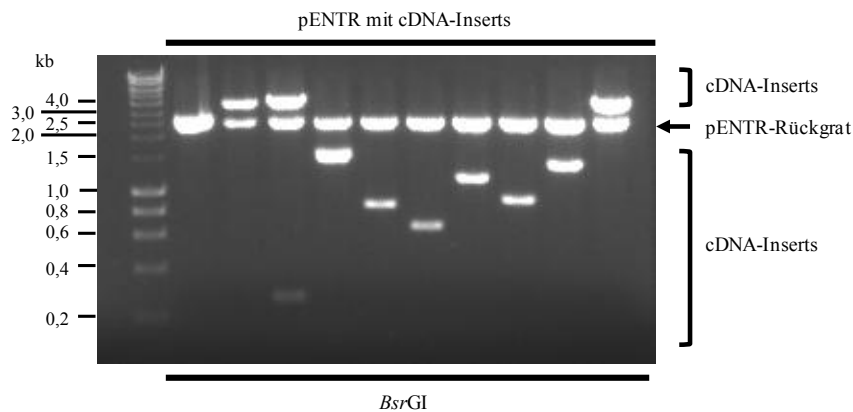


Abb. 2.3: 5'-Cap Selektion erhöht die cDNA-Insertgröße

Plasmid-DNA individueller cDNA-Klone wurde isoliert und nach *BsrGI*-Restriktionsverdau im Agarosegel aufgetrennt. Jede Spur entspricht einem Einzelklon. Die variierenden cDNA-Banden sind jeweils vom 2,5 kb Vektorrückgrat zu unterscheiden.

In der Tat ergab eine Sequenzierung von 50 zellulären Transkripten eine Anreicherung von *full length* cDNAs, da alle cDNAs im Gegensatz zur konventionellen cDNA-Bank vollständige kodierende Sequenzen enthielten. Im Vergleich mit den in der NCBI-BLAST-Datenbank hinterlegten mRNA-Sequenzanalysen zeigten vier cDNAs ein 5'-erweitertes (Abb. 2.4), drei weitere das exakt gleiche 5'-Ende der cDNA. Den restlichen cDNAs fehlen 3-573 bp am 5'-Ende im Vergleich mit der jeweils längsten publizierten cDNA (siehe Anhang Tab. S1). Multiple Transkriptvarianten mit alternativen und verkürzten 5'-UTRs werden jedoch in fast jeder Genregion exprimiert, sodass Rückschlüsse von der Länge der 5'-UTRs auf den *full*

ERGEBNISSE

length Gehalt der cDNA-Bank schwierig sind. Gleichwohl deuten die vollständigen kodierenden Sequenzen auch bei abweichenden 5'-UTRs auf einen hohen *full length* Gehalt der cDNA-Bank hin.

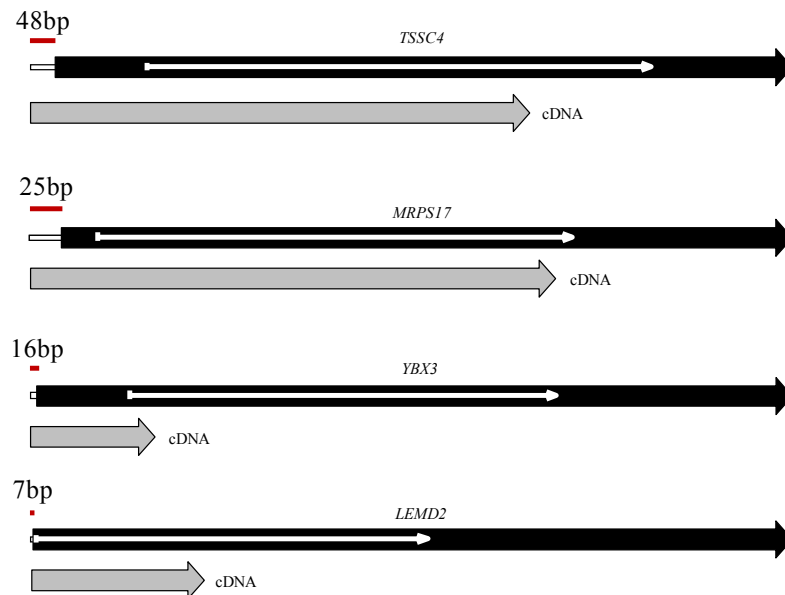


Abb. 2.4: 5'-Cap Selektion reichert *full length* cDNAs an

Plasmid-DNA zufällig gewählter cDNA-Einzelklone wurde am 5'-Ende sequenziert und mit mRNA-Sequenzanalysen der NCBI-BLAST-Datenbank abgeglichen. Alle untersuchten zellulären Transkripte enthielten vollständige kodierende Sequenzen (weiße Pfeile). Vier mRNAs (schraffiert) der zellulären Gene *TSSC4*, *MRPS17*, *YBX3* und *LEMD2* weisen ein erweitertes 5'-Ende (rote Balken) im Vergleich zu den Sequenzen der NCBI-BLAST-Datenbank (schwarze Pfeile) auf.

2.1.3 Detektion und Analyse von HCMV Transkripten

Um die Qualität der hergestellten cDNA-Bank zu überprüfen und eine vollständige Repräsentation des HCMV-Transkriptoms sicherzustellen, wurden im Folgenden die HCMV-Transkripte der cDNA-Bank näher untersucht. Zunächst sollten HCMV-Transkripte geringer Abundanz detektiert werden. Die HCMV-Gene *UL40* und *US2* weisen 24 hpi geringe Expressionsniveaus auf (Jones & Sun, 1997; Ulbrecht *et al.*, 2000) und eignen sich daher als Beispiele rarer HCMV-Transkripte innerhalb einer cDNA-Bank. Hierzu wurden die cDNA-Inserts wiederum durch einen *Bsr*GI-Restriktionsverdau vom pDONR-Rückgrat getrennt und *US2*- bzw. *UL40*-spezifische Banden konnten mit Hilfe von entsprechenden Sonden im

ERGEBNISSE

Southern Blot detektiert werden (Abb. 2.5). Im Gegensatz zu den zuvor publizierten cDNA-Banken (Ma *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007) konnten somit sowohl *UL40* als auch *US2* cDNAs innerhalb der cDNA-Bank nachgewiesen werden.

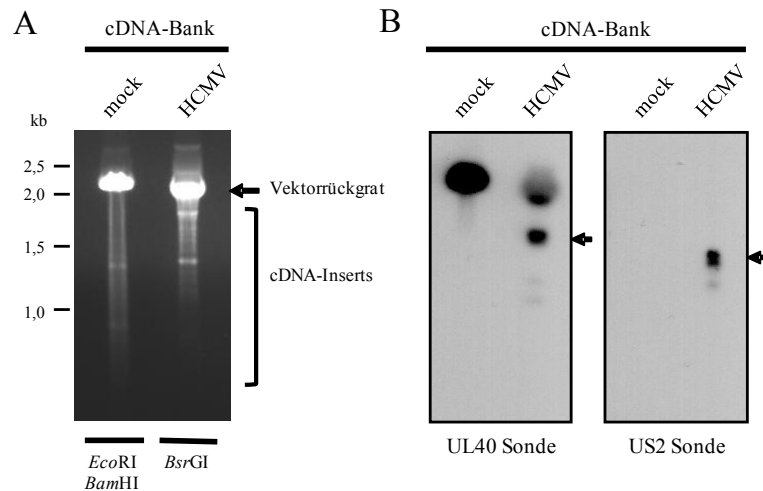


Abb. 2.5: cDNA-Bank enthält HCMV Transkripte geringer Abundanz

(A) cDNA-Inserts der mock cDNA-Bank (pSMART) und der HCMV cDNA-Bank (pENTR) wurden per Restriktionsverdau vom Vektorrückgrat getrennt. (B) cDNA-Inserts wurden aus dem Agarosegel per Southern Blot auf eine Nylonmembran übertragen und *UL40* und *US2* kodierende Transkripte wurden mit spezifischen Sonden detektiert. Pfeile markieren die korrekte Insertgröße.

Zur umfassenderen Analyse und zur Bestimmung des Anteils an HCMV kodierten Transkripten innerhalb der cDNA-Bank wurde aus isolierter Virus-DNA eine DIG-markierte Sonde hergestellt, die das gesamte HCMV Genom abdeckt. Eine Identifizierung von Klonen mit cDNA-Konstrukten viralen Ursprungs mittels Koloniehybridisierung erwies sich aufgrund unspezifischer Bindung der Sonde an bakterielle DNA als nicht zuverlässig (nicht gezeigte Daten). Um trotzdem HCMV kodierte Transkripte von zellulären Transkripten zu unterscheiden, wurde eine Slot Blot Selektion durchgeführt. Hierbei ließen sich HCMV kodierte cDNAs von einzelnen Klonen anhand der HCMV-spezifischen Sonde detektieren (Abb. 2.6). Pro Slot wurde Plasmid-DNA eines Klons aufgetragen, wodurch ein Slot jeweils einem cDNA-Konstrukt entspricht. Bestätigt wurde eine Hybridisierung mit der Sonde durch Sequenzierungen der HCMV kodierten cDNAs. Eine Überprüfung von 50 cDNA-Klonen, die keine Hybridisierung mit der Sonde zeigten, lieferte den Nachweis einer spezifischen und sensitiven Bindung der Sonde, da ausschließlich zelluläre Transkripte nachgewiesen wurden.

ERGEBNISSE

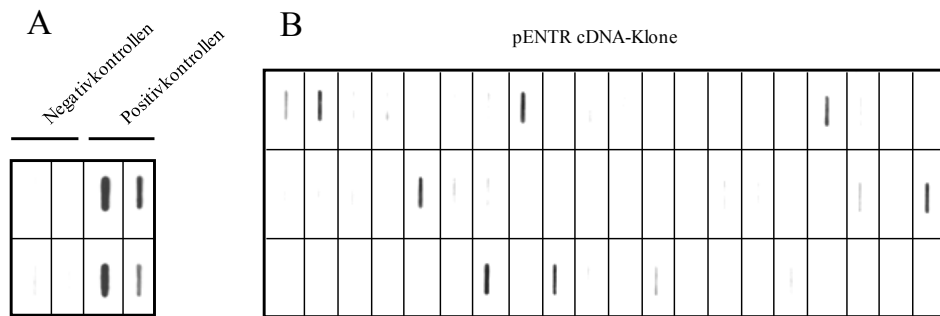


Abb. 2.6: Selektion HCMV-kodierender cDNAs

Plasmid-DNA individueller cDNA-Klone wurde in Slots auf eine Nylonmembran aufgetragen. Mit Hilfe einer DIG-markierten Sonde, die das gesamte HCMV Genom umfasst, wurden virusspezifische cDNAs identifiziert. (A) Als Kontrollen dienten sequenzierte cDNA-Konstrukte zellulären und viralen Ursprungs. (B) Jeder Slot enthält Plasmid-DNA eines Einzelklons der cDNA-Bank, der bei erfolgter Sonden-Hybridisierung sequenziert wurde.

Aus der Slot Blot Selektion ergibt sich der Anteil viraler cDNA-Klone, der 24 hpi bei 4,0% und 72 hpi bei 12,0% liegt (Tab. 2.1). Insgesamt wurden auf diese Weise 2037 Klone untersucht und es konnten 106 HCMV kodierte cDNAs identifiziert werden.

	cDNA-Klone	viral [%]
gesamt	2037	106 [5,2]
24hpi	1736	70 [4,0]
72hpi	301	36 [12,0]

Tab. 2.1: Anteile HCMV kodierter Transkripte der cDNA-Bank

Die im Slot Blot identifizierten Einzelklone der cDNA-Bank wurden per Sequenzierung hinsichtlich des viralen Ursprungs der integrierten cDNA überprüft. Daraus ergibt sich die prozentuale Verteilung viraler Konstrukte der cDNA-Bank aus RNA-Proben 24 hpi und 72 hpi.

2.1.4 Repräsentatives Abbild des HCMV Transkriptoms

Die durchschnittliche Größe der viralen cDNA-Inserts lag vergleichbar mit der gesamten cDNA-Bank bei 1,7 kb, wobei die häufigsten Insertgrößen entsprechend zwischen 1 kb und 2 kb liegen (Abb. 2.7). Hierbei verdeutlicht sich erneut der Vorteil, der sich aus einer Anreicherung von *full length* Transkripten nach 5'-Cap Selektion ergibt. Die kleinste HCMV

ERGEBNISSE

kodierte cDNA war hierbei 0,4 kb und die größte 4,9 kb lang. Erwartungsgemäß weisen alle sequenzierten viralen Transkripte der cDNA-Bank einen Poly(A)-Schwanz auf. Dieser wurde in den zuvor ermittelten Insertgrößen nicht mitgerechnet.

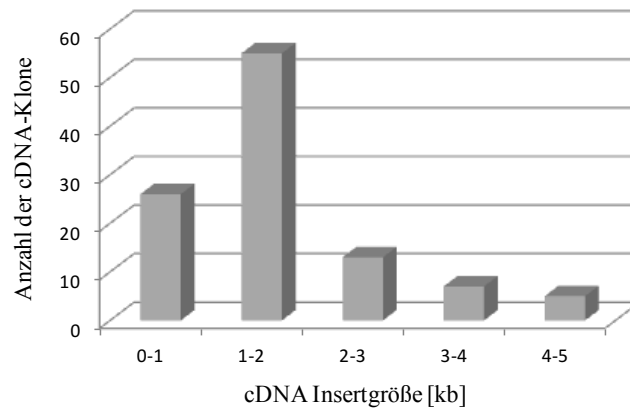
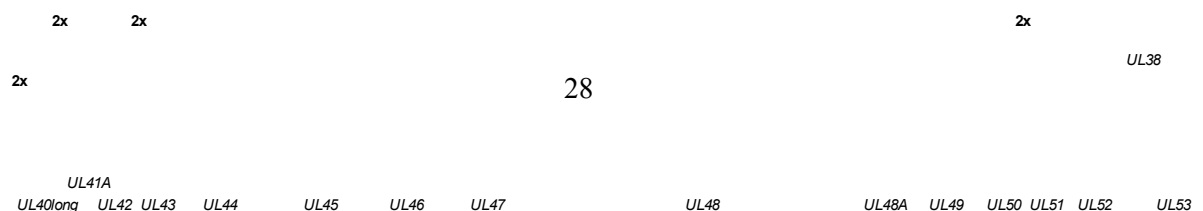
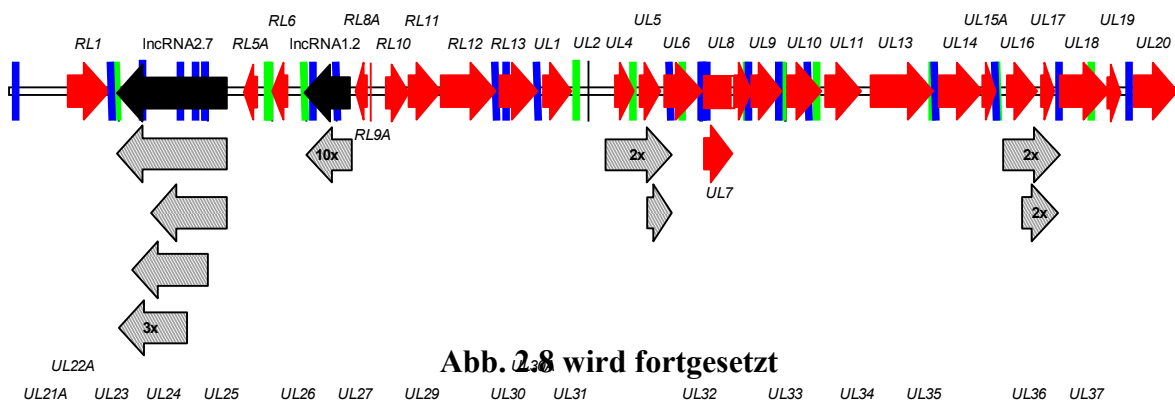


Abb. 2.7: Insertgrößen viraler Transkripte der cDNA-Bank

Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher Insertgrößen der viralen cDNA-Konstrukte. Hierbei wurde der Poly(A)-Schwanz nicht mitgerechnet.

Mit einem 5'-Cap und einem Poly(A)-Schwanz weisen die untersuchten cDNAs klassische Merkmale einer mRNA auf, die sie von möglichen Klonierungs-Artefakten abgrenzen. Die Transkripte stammen von gleichmäßig über das Genom verteilten Genregionen, sodass die cDNA-Bank ein repräsentatives Abbild des Transkriptoms wiedergibt (Abb. 2.8).



RL9A
10x

2x

2x

ERGEBNISSE

UL7

2x

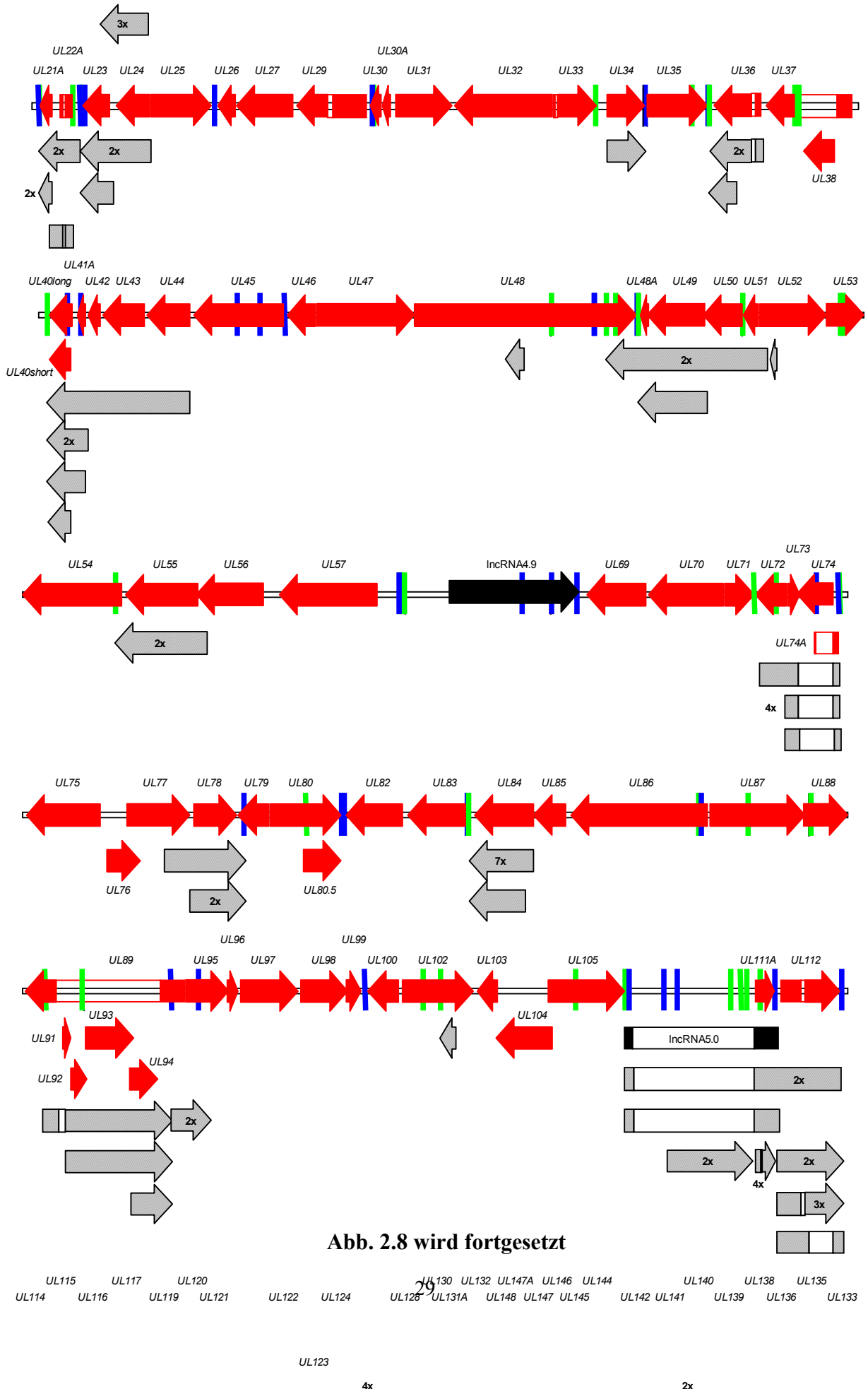


Abb. 2.8 wird fortgesetzt

ERGEBNISSE

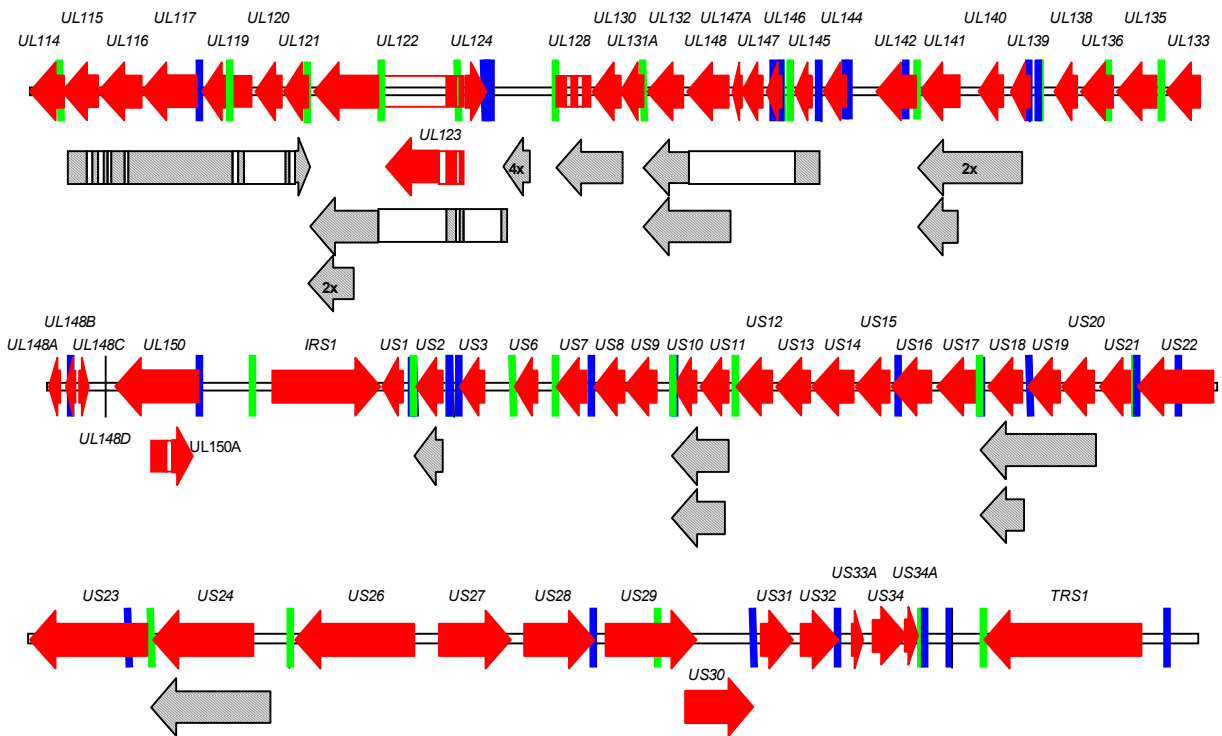


Abb. 2.8: Gleichmäßige Verteilung der cDNAs im HCMV Genom

Das HCMV Genom ist in neun Sektionen dargestellt. Markiert sind ORFs (rot), lncRNAs (schwarz) und im Slot Blot isolierte Transkripte (schraffiert). Introns sind ausgespart. Bei mehreren identischen Transkripten ist jeweils ein repräsentatives Transkript aufgeführt. Neu identifizierte ORFs (Stern-Ginossar *et al.*, 2012) fehlen aufgrund der Komplexität, finden sich aber in Tab. S2. Potentielle Poly(A)-Signale (5'-AATAAA-3') des (+)-Strangs (blaue Balken) und des (-)-Strangs (grüne Balken) sind eingefügt.

Um ergänzend zu den per Slot Bot identifizierten HCMV Transkripten einen Überblick zu erhalten, ob die cDNA-Bank das HCMV Transkriptom vollständig widerspiegelt, wurden weitere genomweite Analysen durchgeführt. Zur detaillierten Untersuchung der cDNA-Banken wurden Primerpaare individueller ORFs genutzt, um mittels PCR deren Repräsentation innerhalb der cDNA-Banken zu kontrollieren. Von 53 getesteten ORFs konnten 83% als Bestandteile der cDNA-Bank nachgewiesen werden (Abb. 2.9), wodurch sich eine angemessene Repräsentation des HCMV-Transkriptoms 24 hpi und 72 hpi andeutet. Dem HCMV Replikationszyklus entsprechend verändert sich das Transkriptom 72 hpi hin zu Transkripten, deren Expression die Virion-Formation ermöglicht. Beispiele hierfür sind am nukleären Egress beteiligte Genprodukte (UL50), die Glykoproteine gN (UL73) und gH (UL75) sowie Tegumentproteine (UL82). Hierbei ist zu beachten, dass die PCR-Detektion

ERGEBNISSE

eines ORFs angesichts von häufig vorkommenden polycistronischen Transkripten (siehe 2.2.1) keine Aussage über eine Translation des betreffenden ORFs zulässt, sondern lediglich Transkription in der jeweiligen Genregion nachweist. Lediglich neun ORFs konnten nicht detektiert werden (*RL10*, *UL1*, *RL13*, *UL18*, *UL37*, *UL120*, *US3*, *US6* und *US7*, Abb. 9). Aufgrund der zeitlich streng kontrollierten HCMV Genexpression und der RNA-Isolation zu den gewählten Zeitpunkten war das Fehlen einzelner ORFs, wie beispielsweise des IE Gens *US3*, zu erwarten. Obwohl andere IE Genprodukte, wie IE1 und IE2, Bestandteil der cDNA-Bank sind, unterliegen diese womöglich einem unterschiedlichen Turnover der mRNAs oder variieren in der Abundanz. Das tatsächliche Kodierungspotential der ORFs *UL1*, *UL18* und *UL120* wurde zudem aufgrund fehlender oder äußerst schwacher Assoziation mit Ribosomen in Frage gestellt (Stern-Ginossar *et al.*, 2012).

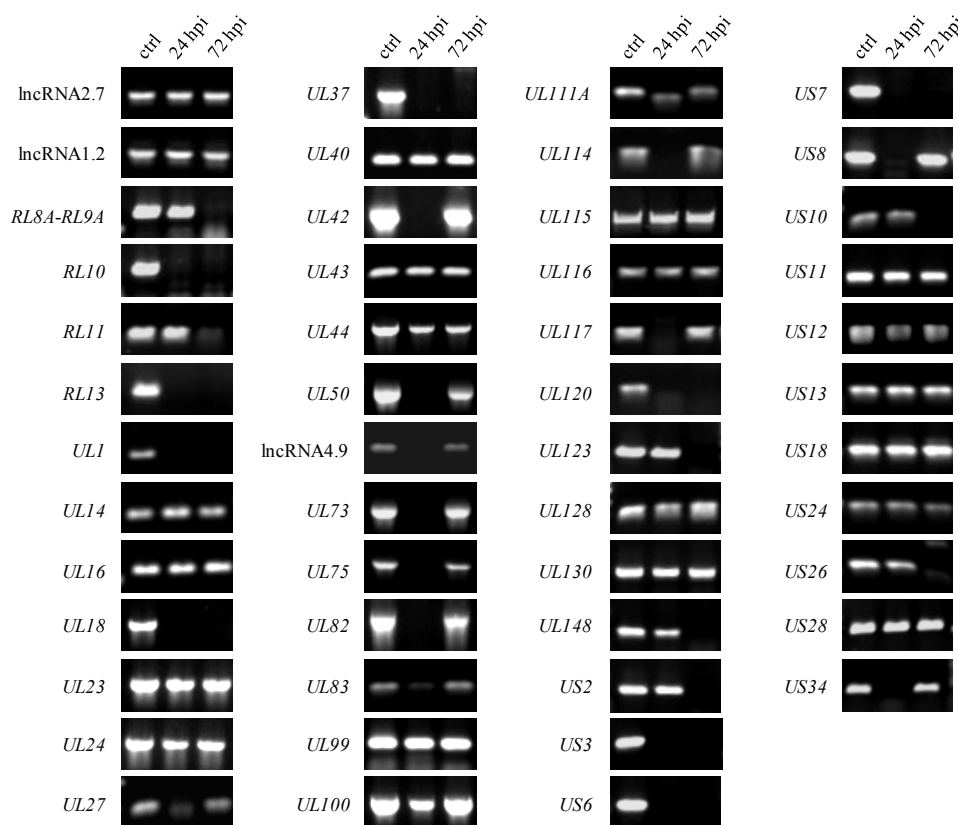


Abb. 2.9: HCMV cDNA-Bank deckt 83% des viralen Transkriptoms ab

Die Repräsentation individueller Transkripte über das Genom verteilter ORFs oder nicht kodierender Regionen in der cDNA-Bank wurde mit spezifischen Primern durch PCR nachgewiesen. Unterschieden wurden pENTR-cDNAs 24 hpi und 72 hpi. Als Positivkontrollen (ctrl) dienten Genom-Präparationen aus Virionen (*US2-US6*) oder BAC-DNA.

ERGEBNISSE

Insgesamt konnten somit durch PCR und Slot Blot Analyse bereits 63 klassische HCMV ORFs und die vier lncRNAs innerhalb der cDNA-Bank bestätigt werden. Obwohl derartige Analysen nur einen Bruchteil des tatsächlichen ORFs der cDNA-Bank wiedergeben, konnte ein repräsentativer Überblick über das HCMV Transkriptom gewonnen werden.

Zusammenfassung (1)

Eine *full length* HCMV cDNA-Bank wurde hergestellt. Durch 5'-Cap Selektion der cDNAs konnte der Anteil an *full length* Transkripten im Vergleich zu konventionellen cDNA-Banken erheblich erhöht werden. Nachweise wenig abundanter HCMV Transkripte, ein repräsentatives Profil der cDNA-Größenverteilung inklusive viraler ~5 kb cDNAs und eine gleichmäßige Verteilung der transkribierten Genregionen spiegeln das HCMV Transkriptom in der cDNA-Bank angemessen wider. Insgesamt werden 83% des HCMV Transkriptoms durch die cDNA-Bank abgedeckt.

2.2 Eigenschaften der HCMV cDNA-Bank

2.2.1 Polycistronische cDNAs werden begrenzt durch 3'-coterminale Enden

Verglichen mit herkömmlichen HCMV cDNA-Banken (Abb. 2.10 A) besitzt die cDNA-Bank nach 5'-Cap Selektion nicht nur einen höheren Anteil an *full length* Transkripten (Abb. 2.4), sondern auch eine größere Fraktion kodierender cDNAs. Deren Anteil steigt durch 5'-Cap Selektion von 55% auf 73,6% an (Abb. 2.10 B). Die entsprechende Reduzierung nicht kodierender Transkripte von 45% auf 26,4% und deren Zusammensetzung wird in Kapitel 2.2.2 behandelt.

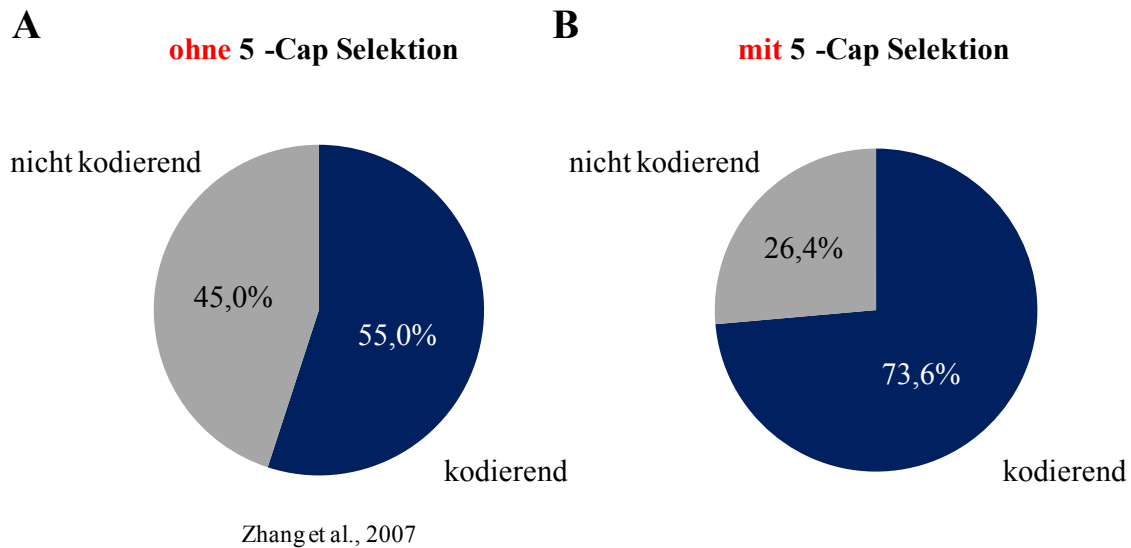


Abb. 2.10: Die meisten cDNAs besitzen Kodierungspotential

(A) Kodierungspotential einer herkömmlichen HCMV cDNA-Bank (Zhang *et al.*, 2007). (B) Die in 2.1 isolierten und sequenzierten Einzelklone der cDNA-Bank wurden hinsichtlich ihres Kodierungspotentials untersucht. Eine ausführliche Liste der genetischen Information der jeweiligen Klone findet sich in Tab. S2 (siehe unten).

Um das Kodierungspotential der isolierten cDNA-Konstrukte einzuschätzen, wurden diese mit den etablierten ORFs des HCMV Genoms abgeglichen (Davison *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003a). Eine ausführliche Liste aller Einzelklone mit deren cDNA-Längen und Kodierungspotential findet sich im Anhang (Tab. S2). In diese Analyse wurden auch die zahlreichen kürzlich neu identifizierten ORFs einbezogen, die das Kodierungspotential des HCMV Genoms erheblich erweitern (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund einer cDNA-Bank von Bedeutung, da dies aufzeigt, dass nur eine experimentelle Analyse und deren Verifizierung im Gegensatz zu sequenzvergleichenden Computerprognosen eine Auskunft über die tatsächliche Größe des HCMV-Transkriptoms geben kann. Um eine Unterscheidung der zuvor annotierten ORFs und den per *ribosome profiling* ermittelten zusätzlichen ORFs zu ermöglichen, wird im Folgenden von klassischen ORFs und neu identifizierten ORFs gesprochen, die teilweise vom kanonischen Startcodon ATG abweichen.

Die kodierenden Transkripte der cDNA-Bank lassen sich zwei Klassen zuordnen: monocistronische und polycistronische Transkripte (Abb. 2.11). Monocistronische

ERGEBNISSE

Transkripte kodieren lediglich für einen ORF. Beispiele hierfür sind *UL84*, *UL55* oder *US2* (Abb. 2.12). Polycistronische Transkripte sind ebenfalls auf die eukaryotische 5'-Cap abhängige Translation angewiesen. Ob diese Transkripte vergleichbar mit prokaryotischen mRNAs tatsächlich gleichzeitig für mehrere Proteine kodieren, ist unklar und Gegenstand aktueller Diskussion (Ma *et al.*, 2012; siehe auch 3.1). Dennoch enthalten sie die Sequenzen weiterer *downstream* ORFs. Um auch diese *downstream* ORFs effizient exprimieren zu können, existieren häufig 5'-verkürzte Versionen der polycistronischen mRNAs. Dadurch ergeben sich aus alternativen Transkriptionsstartpunkten resultierende Transkripte mit coterminalen 3'-Ende, die beispielsweise bei den Transkriptionseinheiten *US20-18* und *UL24-23* beobachtet wurden (Abb. 2.13 A-B). Dies bestätigt die in vorherigen Analysen ermittelten 5'- und 3'-mRNA-Enden der jeweiligen Genregionen (Guo & Huang, 1993; Stern-Ginossar *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2007).

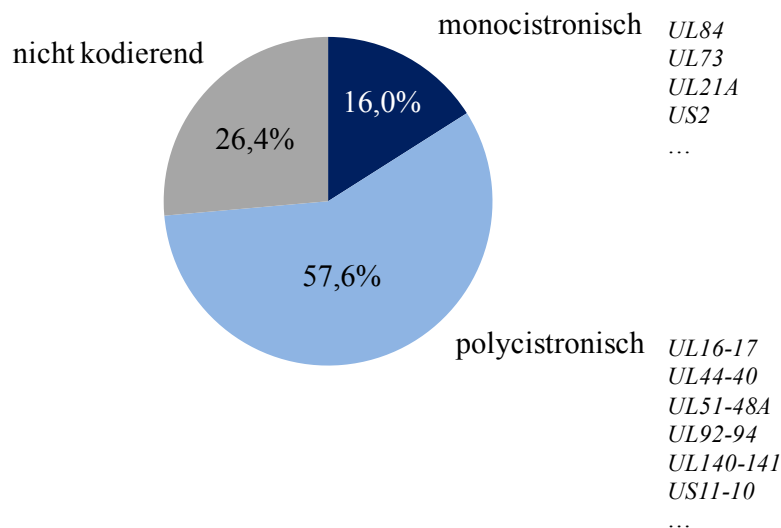


Abb. 2.11: Polycistronische mRNAs überwiegen im HCMV Transkriptom

Die kodierenden cDNAs der cDNA-Bank (Tab. S2) wurden ihrem Kodierungspotential entsprechend in monocistronische (ein ORF) und polycistronische (multiple ORFs) unterteilt. Die Prozentangaben beziehen sich auf alle Transkripte der cDNA-Bank.

Vergleichbare mRNA Strukturen finden sich in den Transkripten zahlreicher anderer Genregionen (Abb. 2.8; 2.11; 2.13 C; Tab. S2). Bedingt dadurch tragen einschließlich der

ERGEBNISSE

lncRNAs (siehe 2.2.4) 81% aller mRNAs die genetische Information für mehrere ORFs (Tab. S2).

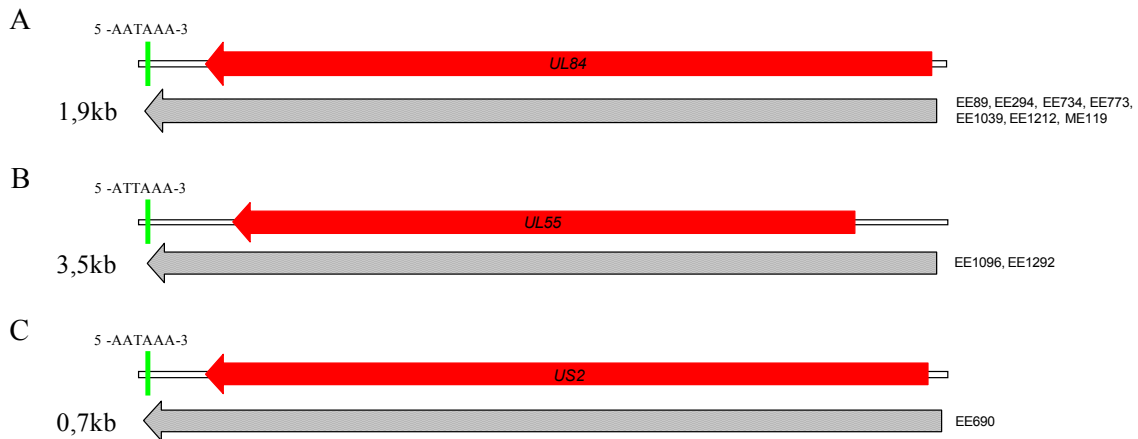


Abb. 2.12: Monocistronische HCMV mRNAs

Dargestellt sind Transkripte von Einzelklonen der cDNA-Bank (schraffiert) und die jeweils kodierte ORFs *UL84*, *UL55* und *US2* (rot). Die Länge der Transkripte ist in kb angegeben. Terminiert werden die mRNAs durch Poly(A)-Signale (grüne Balken). Die Beschriftung am rechten Rand entspricht der Klon-Nummer. Der jeweils erste und zweite Buchstabe der Klon-Nummer definieren den Vektor und den Zeitpunkt der RNA-Isolation: 1. E (pENTR) oder M (pMACE). 2. E (*early*, 24 hpi) oder L (*late*, 72 hpi).

Transkripte mit unterschiedlichen 5'-Enden werden als zeitlich reguliert beschrieben, deren Häufigkeit im Verlauf der HCMV Infektion variiert. Trotzdem gibt es zeitliche Überschneidungen beider Transkriptklassen, wodurch diese auch innerhalb der cDNA-Bank zu einem Zeitpunkt koexistieren können. Es ist nicht auszuschließen, dass die zuvor erwähnten monocistronischen Transkripte ebenfalls Teile größerer Transkriptionseinheiten darstellen, die nicht detektiert wurden oder zu anderen Konditionen und Zeitintervallen exprimiert werden. In der Tat ist *UL84* als Teil einer *UL86-84* Transkriptionseinheit 72 hpi beschrieben (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). 24 hpi überwiegt hingegen das monocistronische *UL84* Transkript.

ERGEBNISSE

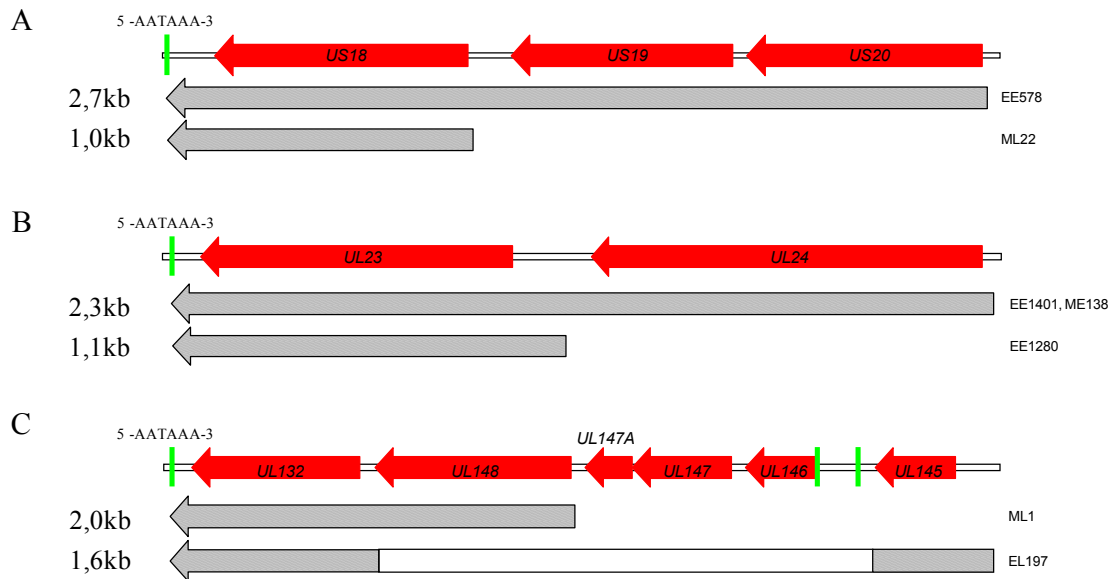


Abb. 2.13: Coterminale 3'-Enden sind verbreitet in HCMV Transkripten

Alternative Transkriptionsstartpunkte von mRNAs der cDNA-Bank (schraffiert) ermöglichen die Expression der jeweiligen ORFs (rot) einer Genregion bei Terminierung der Transkripte durch ein einheitliches Poly(A)-Signal (grüne Balken). Die *US20-18*, *UL24-23* und *UL145-132* Transkripte stellen charakteristische Beispiele eines üblichen Transkriptionsmusters dar (Abb. 2.11; Tab. S2)

2.2.2 Ein erweitertes Kodierungspotential des HCMV Genoms

Die bisher durchgeführten Untersuchungen einiger genomischer Loci haben unterschiedlichste virale Mechanismen zur Vergrößerung und Diversifizierung des Kodierungspotentials und der transkriptionellen Regulation dieser Genregionen ergeben. Hierzu gehören kurze uORFs (*upstream* ORFs), interne ORFs und sehr kurze rORFs (<20 Aminosäuren). Auch wenn einige Proteine dieser ORFs per Massenspektrometrie oder epitopmarkiert detektiert wurden, stützt sich der experimentelle Nachweis einer tatsächlichen Expression der meisten dieser ORFs ausschließlich auf das *ribosome profiling* (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Entsprechend dem 5'-Cap abhängigen Scanning-Mechanismus der Ribosomen in Eukaryoten, der zur Erkennung der Startcodons und Translation der ORFs führt, würde man auch neu identifizierte ORFs an der dem 5'-Ende am nächsten gelegenen Position der Transkripte erwarten. Tatsächlich weisen mit 27,4% erstaunlich viele cDNAs neu identifizierte ORFs an dieser Position auf (Abb. 2.14 A). Neu identifizierte ORFs an der 5'-Position von cDNAs lassen sich unterteilen in uORFs (~50-150 bp), die klassischen ORFs

ERGEBNISSE

vorgelagert sind (14,2%), ORFs, die den Leserahmen klassischer ORFs nutzen, diesen aber in 5'-Richtung erweitern (3,8%) und neu identifizierte ORFs, die den einzigen ORF des Transkripts darstellen (9,4%; Abb. 2.14 B).

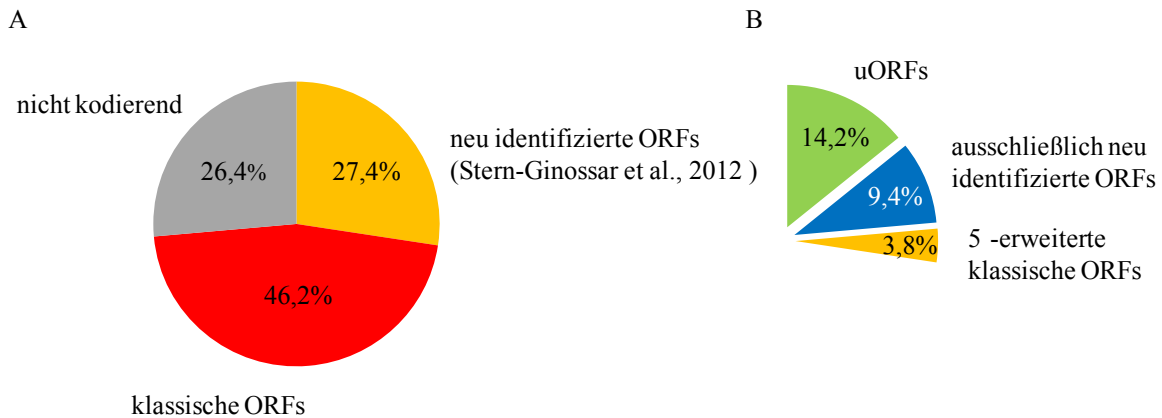


Abb. 2.14: Neu identifizierte ORFs an der 5'-nächstliegenden Position der cDNAs

Die kodierenden cDNAs wurden entsprechend dem ORF, der dem 5'-Ende am nächsten liegt, unterteilt (Tab. S2). (A) Klassische ORFs wurden von neu identifizierten ORFs unterschieden (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). (B) Transkripte mit neu identifizierten ORFs an der 5'-nächstliegenden Position enthalten uORFs *upstream* von klassischen ORFs (Abb. 2.15), ausschließlich neu identifizierte ORFs (Abb. 2.16) oder 5'-erweiterte klassische ORFs (Abb. 2.17 A). Die Prozentangaben beziehen sich auf alle Transkripte der cDNA-Bank.

Der am besten charakterisierte HCMV uORF befindet sich *upstream* von *UL4* (Abb. 2.15 A). Dieser 22 Aminosäuren kodierende uORF (*ORFL33W*, *uORF2*) bestimmt die Translation von *UL4* (Alderete *et al.*, 2001; Cao & Geballe, 1996; Degnin *et al.*, 1993). Nach Translation von *ORFL33W* arretieren die Ribosomen durch eine Blockade der Translationstermination und verhindern eine Translation der *downstream* ORFs der mRNA. Durch eine suboptimale Konsensussequenz im Umfeld des *ORFL33W* Startcodons ist durch *leaky scanning* ein Umgehen des ersten 5'-AUG und eine Expression der *downstream* ORFs möglich (Cao & Geballe, 1995). Ein oder mehrere vergleichbare uORFs befinden sich beispielsweise in Transkripten *upstream* der ORFs *UL41A-UL40*, *UL51-48A* und *UL73* (Abb. 2.15 B-D). Interessanterweise existieren in den genannten Genregionen ebenfalls alternative Transkriptionsstartpunkte, die den jeweiligen uORF ausschließen und eine Expression von *downstream* Genen kontrollieren. Neben dem bereits beschriebenen *UL4-5* Transkript (Abb.

ERGEBNISSE

2.15 A, Klon-Nummer EE1266 & ME106) wurde in der gleichen Genregion eine 3'-coterminale mRNA ermittelt, die eine uORF-unabhängige Transkription eines *downstream* ORFs erlaubt (Abb. 2.15 A, EE1043). Dabei handelt es sich um einen internen ORF von *UL5*, *ORFL35W.iORF1*.

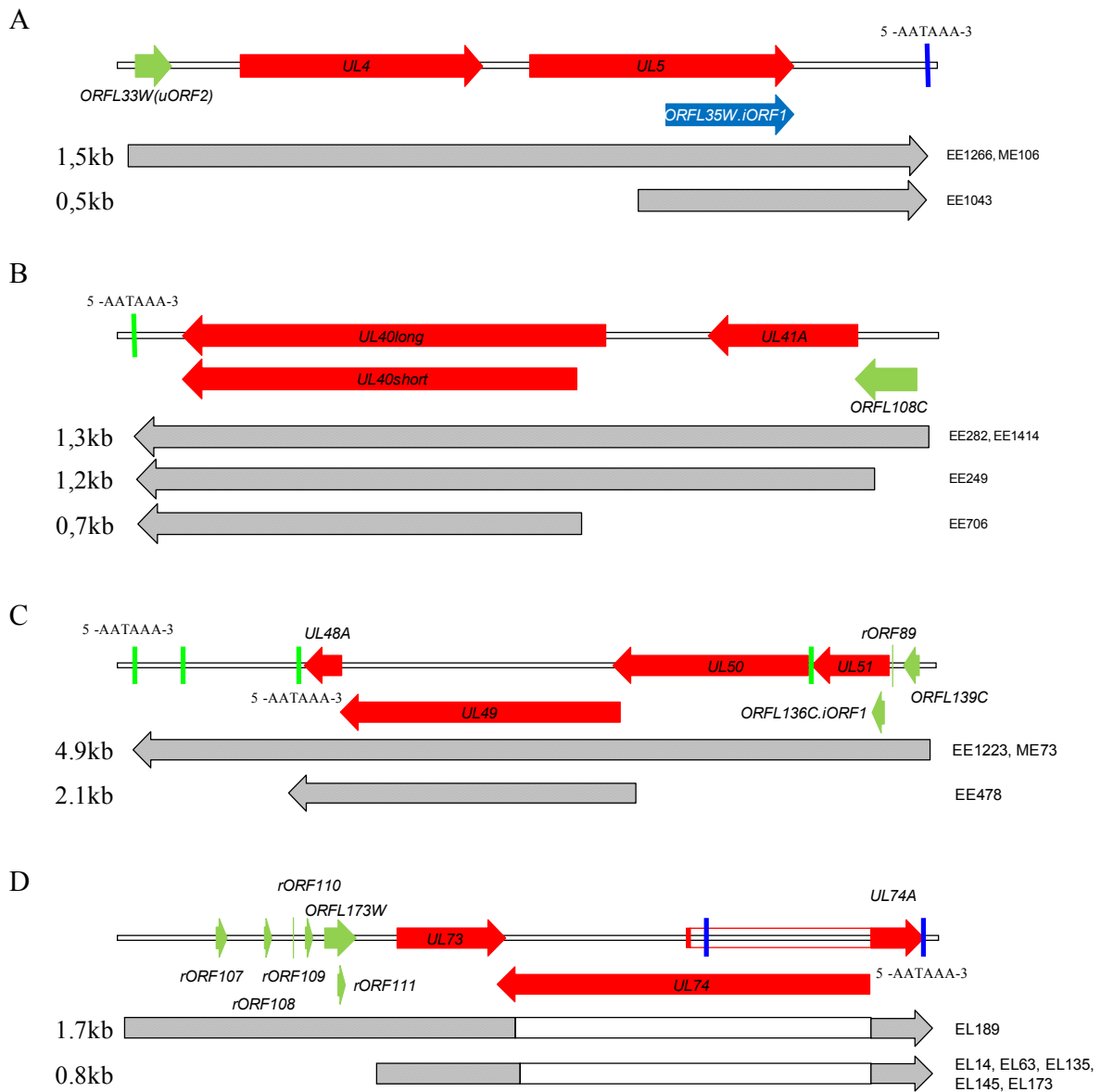


Abb. 2.15: uORFs upstream von klassischen HCMV ORFs

uORFs (grün) befinden sich in Transkripten der cDNA-Bank (schraffiert) *upstream* der klassischen ORFs *UL4-5*, *UL41A-40*, *UL51-48A* und *UL73* (rot). Dargestellte uORFs sind charakteristische Beispiele für die in vielen Transkripten enthaltenen uORFs (Abb. 2.14; Tab. S2). Die *UL4-5* Genregion exprimiert ein Transkript, das ausschließlich für einen neu identifizierten ORF kodiert (blau; Abb. 2.14 B). Introns sind als Aussparungen dargestellt.

ERGEBNISSE

Interne ORFs befinden sich innerhalb der klassischen ORFs. Diese liegen entweder im Leserahmen, sodass daraus ein N-terminal-verkürztes Genprodukt entsteht, oder außerhalb des Leserahmens. Beispiele für ersteren Fall sind der bereits erwähnte interne ORF von *UL5* (Abb. 2.15 A) und die *UL40* Genregion (Abb. 2.15 B). Durch alternative Startcodons, die lediglich 42 Basenpaare entfernt voneinander liegen, entstehen zwei funktionell unterschiedliche Genprodukte (*UL40long* & *UL40short*), die eine HCMV vermittelte NK-Zell Evasion ermöglichen (Prod'homme *et al.*, 2012; Tomasec *et al.*, 2000; Ulbrecht *et al.*, 2000). Ein Transkript, das für das kürzere dieser Proteine kodiert, konnte in der cDNA-Bank nachgewiesen werden (Abb. 2.15 B, EE706). Weitere interne ORFs, deren Expression durch eine entsprechende mRNA naheliegt, befinden sich in der Genregion von *UL94*. Die internen ORFs von *UL94*, *ORFL221W.iORF2* und *ORFL222W.iORF1* (Tab. S2), befinden sich im Gegensatz zu den zuvor erwähnten internen ORFs nicht im Leserahmen von *UL94*, woraus vollkommen neue Genprodukte resultieren würden.

Bemerkenswerterweise enthält die cDNA-Bank Transkripte, die ausschließlich für neu identifizierte ORFs kodieren (Abb. 2.14 B). Dazu gehören nicht nur die bereits behandelten cDNAs, die für die internen ORFs von *UL5* und *UL94* kodieren, sondern auch Transkripte aus intergenetischen Regionen (Abb. 2.16 A) oder *antisense* zu anderen kodierenden ORFs lokalisierte Transkripte (Abb. 2.16 B; siehe auch 2.2.3).

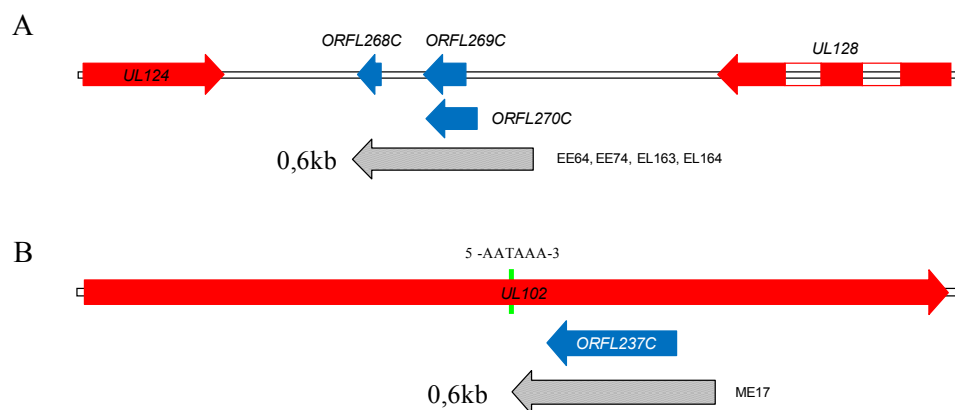


Abb. 2.16: cDNAs mit ausschließlichem Kodierungspotential für neu identifizierte ORFs

Einige Transkripte der cDNA-Bank (schraffiert) kodieren nicht für klassische ORFs (rot), sondern ausschließlich für neu identifizierte ORFs (blau; Abb. 2.14 B). Diese sind beispielsweise zwischen *UL124* und *UL128* oder *antisense* zu *UL102* lokalisiert. Introns sind als Aussparungen dargestellt.

ERGEBNISSE

Die intergenetische Region zwischen *UL124* und *UL128* wurde zwar lange als kodierend angesehen, entsprechende ORFs wurden aber aufgrund mangelnder Konservierung in CMVs anderer Spezies verworfen (Murphy *et al.*, 2003a). Das *ribosome profiling* definiert kürzere ORFs in dieser Genregion, die durch Transkripte der cDNA-Bank abgedeckt werden (Abb. 2.16 A, EE64, EE74, EE163 & EL164).

Neben den bisher publizierten ORFs konnten in einigen Genregionen Transkripte detektiert werden, die sich weder mit den klassischen noch mit den neu identifizierten ORFs decken. Ein Beispiel hierfür ist die *UL36* Genregion, die für das anti-apoptotische *vICA* (*viral inhibitor of caspase-8-induced apoptosis*) kodiert (Skaletskaya *et al.*, 2001). Der Leserahmen von sowohl *vICA* als auch ein 5'-erweiterter Leserahmen (Abb. 2.14 B) mit nicht kanonischem GTG Startcodon (*ORFL10C*) wird von den cDNAs abgedeckt (Abb. 2.17 A, EE247 & EE857). Ein 5'-verkürztes *UL36* Transkript hingegen stimmt mit keinem bisher definierten ORF überein (Abb. 2.17 A, EE51). Potentielle kanonische ORFs liegen entweder im Leserahmen (621 bp) oder außerhalb des Leserahmens von *UL36* (237 bp).

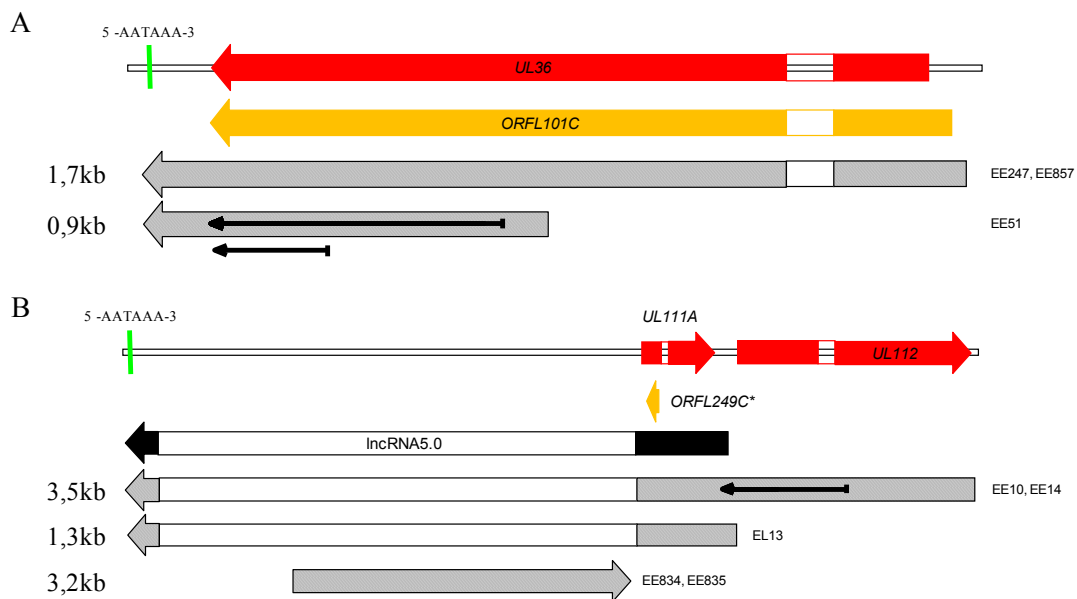


Abb. 2.17: Potentielle neue HCMV ORFs

Neben Transkripten (schraffiert), die für klassische (rot) und neu identifizierte ORFs (orange) kodieren enthält die cDNA-Bank auch 5'-verkürzte (A) und 5'-erweiterte (B) Transkripte, die für potentielle neue ORFs kodieren könnten (dünne schwarze Pfeile). *ORFL249C**: *ORFL249C* wurde im *ribosome profiling* nach Infektion mit dem HCMV-Stamm Merlin identifiziert, ist jedoch in AD169 nicht konserviert und könnte höchstens als verkürzte Version exprimiert werden. Introns sind als Aussparungen dargestellt.

ERGEBNISSE

Die *UL111A-112* Genregion weist Transkription von beiden DNA-Strängen auf. Neben *UL111A* Transkripten und den Spleißvarianten von *UL112* (Tab. S2; Wang *et al.*, 2009a) konnten in der Genregion nicht kodierende RNAs, wie das Spleißprodukt der lncRNA5.0 (Abb. 2.17 B, EE13; siehe 2.2.4) detektiert werden. Ein weiteres Transkript enthält neben weiteren kleinen potentiellen ORFs (Tab. S2) mit 1173 bp einen relativ großen potentiellen ORF, der in den HCMV-Stämmen konserviert ist und *antisense* zu *UL112* lokalisiert wäre (Abb. 2.17 B, EE10, EE14).

2.2.3 *Antisense* Transkription von kodierenden Genregionen

Antisense Transkripte sind eine allgegenwärtige Beobachtung in Analysen von HCMV cDNA-Banken (Ma *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007). Erwartungsgemäß treten auch *antisense* Transkripte in dieser cDNA-Bank auf. 9,4 % aller Klone und 6,6% der nicht kodierenden cDNAs enthalten weitreichende *antisense* Anteile zu kodierenden ORFs des Gegenstrangs (Abb. 2.18). Dies entspricht *deep sequencing* Daten, die einen Anteil von 8,7% *antisense* Transkription über das gesamte Genom verteilt zeigen (Gatherer *et al.*, 2011). Nach neuer ORF-Definition stellt sich allerdings die Frage, ob auch *antisense* Transkripte Kodierungspotential besitzen und nicht nur als Gegenstück der *sense* mRNA zu betrachten sind. Tatsächlich kodiert ein *antisense* Transkript aus der *UL102* Genregion, in der sowohl *sense* als auch *antisense* Transkripte auftreten (Zhang *et al.*, 2007), für *ORFL237C* (Abb. 2.16 B, ME17). Das *ORFL237C* Genprodukt konnte per Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Weiteren bisher unbekanntem *antisense* Transkripten konnte laut *ribosome profiling* jedoch kein kodierendes Potential zugeordnet werden (Abb. 2.19). Das *antisense* Transkript der *UL48* Genregion besitzt keinen potentiellen kanonischen ORF (Abb. 2.19 A, EE704). Neu identifizierte ORFs in dieser Genregion liegen außerhalb des Transkripts. Die Spleißvariante eines *UL115-121 antisense* Transkripts (Abb. 2.19 B; siehe auch 2.2.5; Gatherer *et al.*, 2011) enthält zumindest theoretisch kleine ORFs (Tab. S2), die denen der lncRNAs ähneln (siehe 2.2.4).

ERGEBNISSE

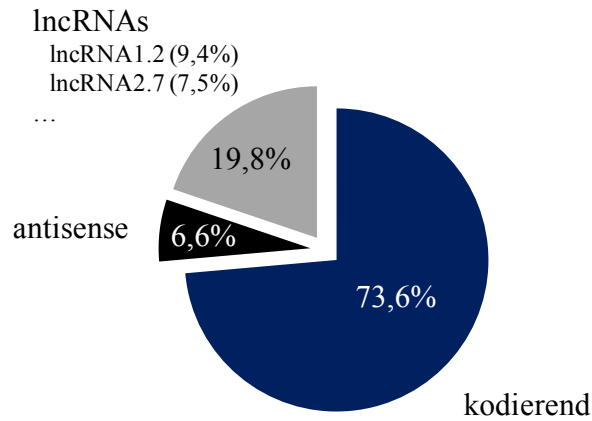


Abb. 2.18: Nicht kodierende cDNAs – lncRNAs und *antisense* Transkripte

Nicht kodierende cDNAs (Abb. 2.10 B) lassen sich in lncRNAs und *antisense* Transkripte unterteilen.

Überraschenderweise werden beide *antisense* Transkripte durch nicht kanonische Poly(A)-Signale, die von der kanonischen Sequenz 5'-AATAAA-3' abweichen, terminiert (Abb. 2.19). Insgesamt trifft dies auf 5,7% aller cDNAs zu. Nicht kanonische Poly(A)-Signale sind jedoch nicht auf *antisense* Transkripte beschränkt, da beispielsweise das *UL55* Transkript, welches für das Glykoprotein gB kodiert, ebenfalls durch ein ungewöhnliches Poly(A)-Signal beendet wird (Abb. 2.12 B).

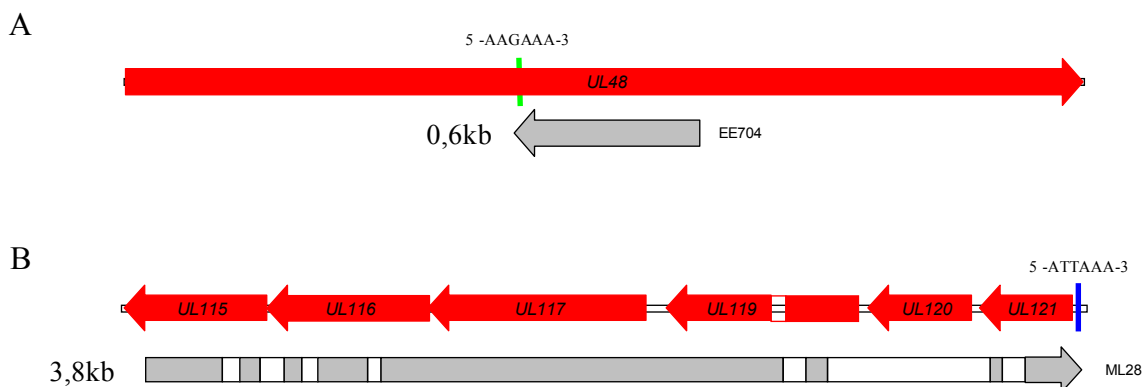


Abb. 2.19: HCMV *antisense* Transkripte

Antisense Orientierung von Transkripten der cDNA-Bank (schraffiert) zu klassischen ORFs (rot). Introns sind als Aussparungen dargestellt. Nicht kanonische Poly(A)-Signale terminieren die cDNAs (grüne und blaue Balken).

2.2.4 Nicht kodierende virale Transkripte der cDNA-Bank

Rein quantitativ stellen nicht kodierende Transkripte mit 45-65% einen Großteil des polyadenylierten HCMV Transkriptoms dar (Gatherer *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007). Zu den vier Hauptklassen langer nicht kodierender (*long non-coding*, lnc) RNAs zählen lncRNA2.7 (beta2.7, McDonough *et al.*, 1985), lncRNA1.2 (Hutchinson & Tocci, 1986), lncRNA4.9 und lncRNA5.0. Allein mehr als 20% der viralen Transkription betrifft lncRNA2.7 (Greenaway & Wilkinson, 1987; Spector, 1996). Ähnlich abundant finden sich lncRNA2.7 (7,5%, 8 cDNAs) und lncRNA1.2 (9,4%, 10 cDNAs) in der cDNA-Bank wieder (Abb. 2.18). Nur *UL84* (7,5%, 8 cDNAs) kommt vergleichbar abundant vor (Tab. S2). Die lncRNA4.9 konnte zwar nicht durch einen Einzelklon isoliert werden, cDNAs aus dieser Region konnten aber durch PCR detektiert werden (Abb. 2.9). Die lncRNA5.0 gilt als stabiles Intron, das durch Spleißen eines größeren Primärtranskripts entsteht (Kulesza & Shenk, 2004; Rawlinson & Barrell, 1993). Demzufolge ist lncRNA5.0 aufgrund fehlender Polyadenylierung nicht Bestandteil der cDNA-Bank. Das gespleißte 1,3 kb große Produkt konnte hingegen identifiziert werden (Abb. 2.17 B, ML13). Weitere bisher nicht bekannte nicht kodierende Transkripte werden vom Gegenstrang transkribiert (Abb. 2.17 B, EE834 & EE835). Vergleichbar mit der Frage nach dem Kodierungspotential von *antisense* Transkripten wirft das *ribosome profiling* neues Licht auf die Funktion dieser abundanten Transkriptklassen. Zahlreiche potentielle größtenteils nicht kanonische ORFs befinden sich auf diesen RNAs (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Im Folgenden wird der Begriff nicht kodierend zur besseren Unterscheidung von klassischen mRNAs weiterhin verwendet.

Überraschenderweise variiert der Anteil nicht kodierender Transkripte innerhalb von cDNA-Banken mit oder ohne 5'-Cap Selektion der cDNAs. Wie bereits erwähnt, liegt der Anteil nicht kodierender cDNAs in der von Zhang *et al.* (2007) produzierten cDNA-Bank bei 45% (Abb. 2.10 A). In der konventionellen pSMART cDNA-Bank resultieren sogar 84,3% der cDNAs aus nicht kodierenden Regionen, hauptsächlich lncRNA2.7 und lncRNA1.2 (Bachelorarbeit M. Preuten, 2011). Auch wenn dies das HCMV Transkriptom widerspiegelt, ist eine einzige derart abundante Transkriptklasse für ein funktionelles Screening der cDNA-Bank nicht von Nutzen. Es stellt sich außerdem die Frage, ob die geringe cDNA-Diversität das gesamte Transkriptom abdecken kann. Hinzu kommt der geringe Anteil an *full length* cDNAs. Beide Nachteile lassen die pSMART cDNA-Bank im Gegensatz zur pENTR cDNA-Bank für ein funktionelles Screening ungeeignet erscheinen. Nach 5'-Cap Selektion ist der

ERGEBNISSE

Anteil nicht kodierender Transkripte zwar deutlich reduziert, stellt aber immer noch einen wesentlichen Bestandteil der cDNA-Bank dar (26,4%, Abb. 2.10 B).

Insbesondere der Anteil an Transkripten der lncRNA2.7 Region sinkt von 57,1% (40 cDNAs) auf 7,5% (8 cDNAs), der Anteil von lncRNA1.2 vergleichsweise nur von 18,6% (13 cDNAs) auf 9,4%, (10 cDNAs). Mit spezifischen Primern ließ sich lncRNA2.7 im Überstand der 5'-Cap Aufreinigung nachweisen (Abb. 2.12 A). RNAs mit 5'-Cap binden den *bead*-gekoppelten Antikörper und befinden sich im Verlauf der Aufreinigung im Pellet. Inwiefern die lncRNA2.7 im Überstand tatsächlich RNAs ohne 5'-Cap darstellen und ob diese eine Funktion haben, bedarf weiterer Untersuchungen. Im Gegensatz zu lncRNA2.7 ließ sich lncRNA1.2 in keiner Fraktion des Überstands detektieren (Abb. 2.12 B), wodurch sich die variierenden Anteile nicht kodierender Transkripte der cDNA-Bank erklären.

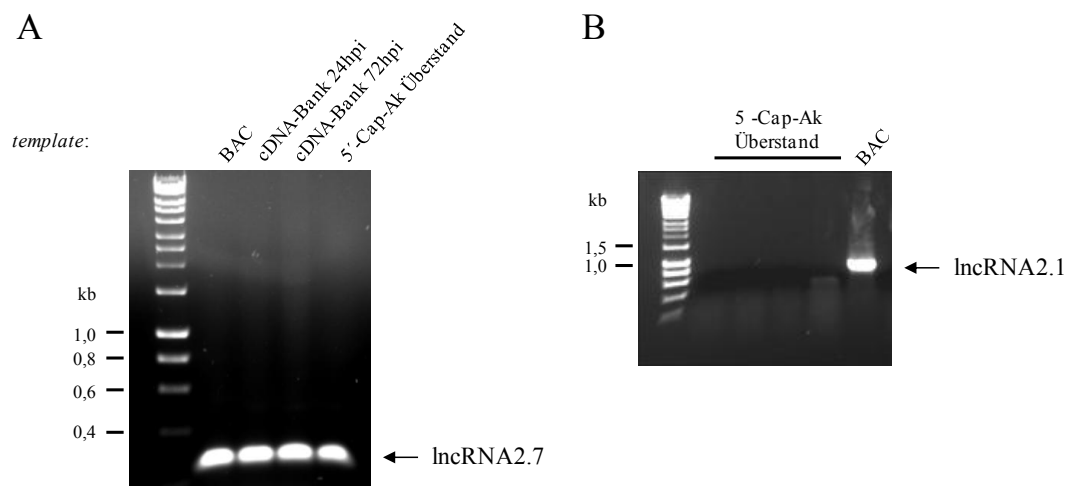


Abb. 2.20: lncRNA2.7 im Überstand der 5'-Cap Aufreinigung

Überstände der 5'-Cap Aufreinigung wurden mit spezifischen PCR-Primern auf die Anwesenheit von lncRNA2.7 (A) und lncRNA1.2 (B) untersucht. BAC-DNA und Plasmid-DNA der cDNA-Bank (24 hpi oder 72 hpi) dienen als Kontrolle.

2.2.5 Gespleißte virale Transkripte der cDNA-Bank

Spleißen von Primärtranskripten ist nicht nur im humanen Transkriptom, sondern auch bei HCMV Transkripten zur Steigerung des Kodierungspotentials üblich. Das HCMV Genom enthält 229 Spleißdonoren und 132 Spleißakzeptoren, die 58 (Gatherer *et al.*, 2011) bis 48 (Stern-Ginossar *et al.*, 2012) der kodierenden RNAs betreffen. Aufgrund dessen wurden auch

ERGEBNISSE

gespleißte Transkripte der cDNA-Bank untersucht. Die Mehrzahl der identifizierten Spleißstellen bestätigt genomweite Analysen (Gatherer *et al.*, 2011) und spezifische Untersuchungen der Genregionen *UL36* (Kouzarides *et al.*, 1988), *UL111A* (Kotenko *et al.*, 2000), *UL112* (Wang *et al.*, 2009a; Wright & Spector, 1989) und *UL122* (Stenberg *et al.*, 1985). Zusätzlich konnten fünf Spleißdonoren (*UL52as*, *UL73*, *UL112*, *UL115-117as*, *UL145-132*) und zwei Spleißakzeptoren (*UL112* und *UL115-121as*), die bisher unerkannt blieben, ermittelt werden (Tab. 2.2). Der Spleißakzeptor *upstream* von *UL92* ist als sogenannter Superakzeptor beschrieben, den 22 unterschiedliche *upstream* Exons nutzen (Gatherer *et al.*, 2011). Die Tatsache, dass *UL92* und vergleichbare Gene (*RL8A*, *UL124*, *UL150A*) *downstream* von Superakzeptoren ATG Startcodons besitzen, legt die Vermutung untranslationierter *leader* Sequenzen nahe. Gleichwohl entsteht im Fall von *UL52as/UL92-94* ein potentieller neuer 5'-ORF (228 bp).

Genregion	Spleißdonor	Spleißakzeptor
<i>UL22A</i>	ca gGTaa acgg	cggtatcgtgttttgcAGcgt
<i>UL36</i>	aa gGTaa gccc	tttttcta tctctaccAGgtg
<i>UL52as/UL92-94</i>	acgGTaacggt	acttttcttcttttccAGgcc
<i>UL73</i> alternativer 5'-Donor	gggGTaa gatt cggGTaattgg	ttcttttctccca tga cAGa gg
<i>UL92-94</i>	ca gGTga gccg	acttttcttcttttccAGgcc
<i>UL111A</i>	ttgGTa ggtca	acgta gtttctcttgtAGcaa
RNA1.1	ca gGTa ggtgg	cgggttctttcttctgtAGata
<i>UL112</i>	acgGTga gtcc gcgGTggcctt	atgtgtcgtcccgtctgtAGgct aggaggcggcggtggggCGgtg
<i>UL112-111Aas</i>	ca gGTa ggtgg	ccgggttcttcttctgcAGgta
<i>UL115-121as</i>	acgGTaacgga ca gGTga gaa a aa gGTaa ctga gtgGTaa gta t aa gGTa cgtg ga gGTttgac ca gGTgcggat	tgaaacacctcaccacAGGca acgttata tattgatccAGcag tattgtagcgtgtaattAGgtt ccttgtgttcttgttccAGaaa ttttgggata tta tcaacAGgat tcgta atctacctccacAGggc ta a cca aagaatcacatAGgga
<i>UL122</i>	gacGTaa gtac acgGTa cgtg tcgGTaa gtct	tcatgggtcttttctgcAGtea tctatctcatgtgttAGgcc tgtcttcttaccatcAGgtg
<i>UL145-132</i>	cagGTaggtta	tctctcgtcttcttgcAGgtt

Tab. 2.2: Spleißstellen der viralen Transkripte

Dargestellt sind jeweils die Exon/Intron Übergänge. Beginn (GT) und Ende der Introns (AG) sind hervorgehoben. Bisher unerkannte Spleißstellen sind fett markiert.

ERGEBNISSE

Die große Mehrheit (99%) der eukaryotischen Spleißstellen entspricht GT/AG Spleißdonor/Spleißakzeptor-Paaren (Sheth *et al.*, 2006). Dies gilt auch für HCMV Transkripte. Bisher konnte nur zwei Transkripte identifiziert werden, die von dieser Regel abweichen (Gatherer *et al.*, 2011; Rawlinson & Barrell, 1993). Im ersten Fall ist das GT Dinukleotid durch GC, den häufigsten nicht kanonischen Spleißdonor (Sheth *et al.*, 2006), ersetzt. Im zweiten Fall variiert der Spleißakzeptor von AG zu CG. Ein vergleichbarer nicht kanonischer Spleißakzeptor wird in einem *UL112* Transkript der cDNA-Bank genutzt (Tab. 2.2). Zwei weitere Klone der cDNA-Bank (EE510, EL97) aus nicht kodierenden Regionen weisen vermutlich artifizielle spleißähnliche Verknüpfungen auf und weichen an beiden potentiellen Spleißstellen komplett von der GT/AG Regel ab. Während der reversen Transkription kann insbesondere bei abundanten Transkripten ein *template switch* stattfinden, wobei die entstehende cDNA aufgrund von repetitiven Elementen von einem RNA-*template* zum nächsten springt (Houseley & Tollervey, 2010; Temin, 1993).

Zusammenfassung (2)

Die Analyse von cDNA Einzelklonen untermauert die kürzlich publizierte Definition eines erweiterten Kodierungspotentials des HCMV Genoms. Neue identifizierte ORFs finden sich häufig nächstliegend zum 5'-Ende der cDNA oder in Transkripten, die ausschließlich für diese kodieren, wieder. Bisher unbeschriebene potentielle ORFs und antisense Transkripte deuten eine noch größere genetische Komplexität an als bisher bekannt. Coterninale 3'-Enden begrenzt durch ein gemeinsames Poly(A)-Signal sind in HCMV Transkripten weit verbreitet. Dadurch tragen 81% aller mRNAs die genetische Information für mehrere ORFs.

2.3 Expression der HCMV cDNAs

2.3.1 Der lentivirale Vektor pMACE als Expressionsvektor der cDNA-Bank

Zur funktionellen Analyse der cDNA-Bank in einem Screening war eine Subklonierung in einen Expressionsvektor erforderlich. Hierfür wurde ein retroviraler Vektor pMACE (benannt nach den zentralen funktionellen Elementen MIEP, *attR*, *ccdB* und *EGFP*) generiert. Dieser erlaubt die Verpackung der HCMV cDNA-Bank in pseudotypisierte, retrovirale Partikel, die das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) in ihrer Hülle aufweisen und damit eine effiziente Transduktion in zahlreiche eukaryotische Zellen ermöglichen. Ausgehend vom lentiviralen Vektor Tet-pLKO-puro, ursprünglich abgeleitet von HIV-1, erfolgte die Herstellung von pMACE. Tet-pLKO-puro enthält bereits die *cis*-aktiven Elemente, die für eine Verpackung, reverse Transkription und Integration in das Genom der transduzierten Zelle notwendig sind. In die retroviralen Sequenzen von Tet-pLKO-puro mussten somit noch die für eine cDNA-Subklonierung erforderlichen *att* Rekombinationsstellen sowie eine EGFP-kodierende Sequenz zur Messung der Transduktionseffizienz eingefügt werden. Die erfolgreiche Klonierung wurde per Restriktionsverdau und Sequenzierung kontrolliert (Abb. 2.21).

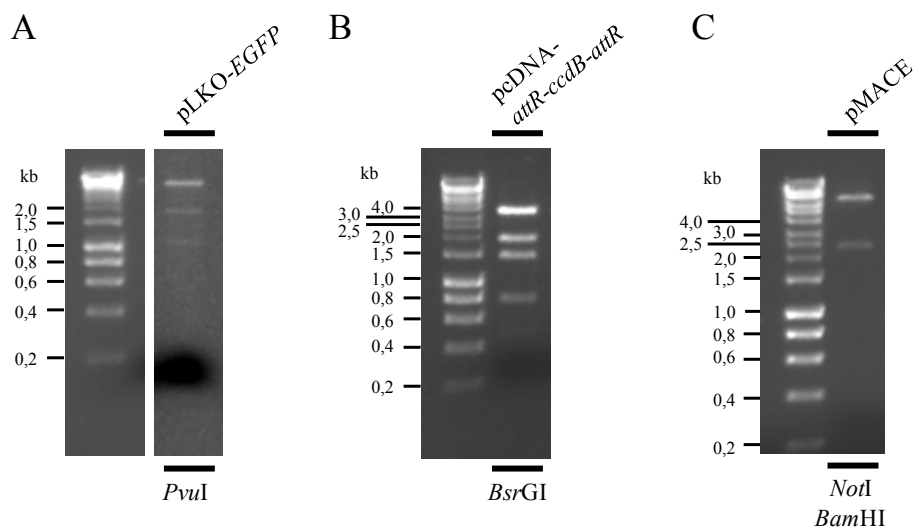


Abb. 2.21: Klonierung des lentiviralen Expressionsvektors pMACE

Schrittweise wurde der lentivirale Vektor Tet-pLKO-puro angepasst, um die Voraussetzungen der cDNA Gateway-Klonierung zu erfüllen. Detaillierte Angaben finden sich im Text. Die erfolgte Klonierung wurde durch den jeweiligen Restriktionsverdau kontrolliert. (A): 5929 bp, 1788 bp, 1045 bp (B): 3692 bp, 1920 bp, 1457 bp, 790 bp (C): 7649 bp, 2337 bp.

ERGEBNISSE

Zuerst wurde die *EGFP*-Sequenz unter Kontrolle des SV40-Promotors in den lentiviralen Vektor eingefügt (Abb. 2.21 A). Die *attR* Rekombinationsstellen wurden zunächst hinter den MIEP-Promotor in den pcDNA3.1-Vektor kloniert (Abb. 2.21 B) und danach in umgekehrter Orientierung in den lentiviralen Vektor eingefügt (Abb. 2.21 C & Abb. 2.22). Die umgekehrte Orientierung ist erforderlich, da ansonsten der Poly(A)-Schwanz der einzufügenden cDNA-Sequenzen zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription des modifizierten lentiviralen Genoms, die am 5'-LTR beginnt und erst mit einem Poly(A)-Signal am 3'-LTR endet, führen würde.

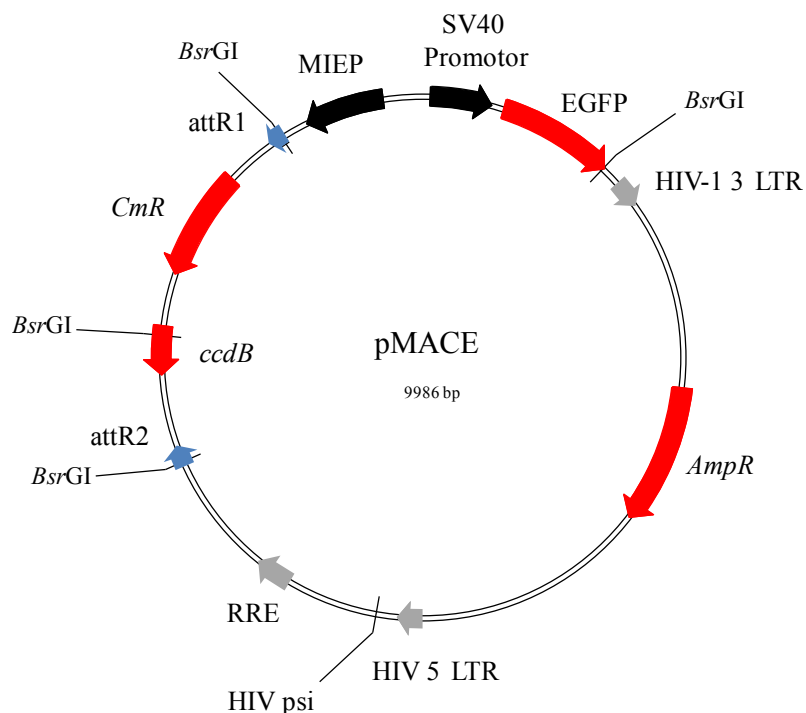


Abb. 2.22: Funktionelle Elemente von pMACE

Zu den lentiviralen Elementen von pMACE gehören der 5'-LTR, das Verpackungssignal psi, das *rev responsive element* (RRE) und der 3'-LTR. Die Gateway-Rekombinationsstellen (*attR1* und *attR2*) flankieren das Toxin kodierende Gen *ccdB*. Zwei Promotoren, der SV40 Promotor und der *major immediate early promoter* (MIEP), kontrollieren jeweils die Expression von EGFP und der noch zwischen die *att* Rekombinationsstellen einzufügenden cDNA. Resistenzen sind gegen Ampicillin (AmpR) und Chloramphenicol (CmR) vorhanden.

Zwischen den *att* Rekombinationsstellen befindet sich wie bereits im pDONR-Vektor ein *ccdB* Gen, das erst nach Rekombination und zeitgleicher Entfernung des *ccdB* Gens ein

ERGEBNISSE

Bakterienwachstum ermöglicht. Die Funktionalität des *ccdB* Gens wurde im Vergleich von sensitiven (TOP10) und resistenten (*ccdB* Survival 2 T1^R) *E. coli* Stämmen überprüft (Tab. 2.3). Während nach Transformation des Kontrollplasmids pUC19 beide Stämme Kolonien bilden, ist ein Bakterienwachstum nach Aufnahme von pMACE nur dem resistenten Stamm möglich, da das *ccdB* Genprodukt ansonsten mit der *E. coli* DNA-Gyrase interferiert.

Vektor	<i>E. coli</i> Stamm	Transformationeffizienz
pUC19	TOP10	8,4x10 ⁷
pUC19	<i>ccdB</i> Survival 2 T1 ^R	1x10 ⁹
pMACE	TOP10	-
pMACE	<i>ccdB</i> Survival 2 T1 ^R	1x10 ⁷

Tab. 2.3: Expression von *ccdB* verhindert Wachstum nicht-rekombinierter Klone

Die Plasmide pUC19 und pMACE wurden entweder in den *E. coli* Stamm TOP10 oder *ccdB* Survival 2 T1^R transformiert. Die Transformationseffizienz wurde anhand der Zahl der Bakterienkolonien einer Verdünnungsreihe ermittelt.

Die Überführung der cDNAs aus der pENTR cDNA-Bank in den Expressionsvektor erfolgte wiederum durch homologe Rekombination. In diesem Fall reagieren die *attL* Rekombinationsstellen der pENTR cDNA-Bank mit den *attR* Rekombinationsstellen von pMACE (Abb. 2.23). Es entstehen *attB* Rekombinationsstellen, die im lentiviralen Vektor die cDNAs einrahmen und ein *ccdB* Gen enthaltendes Beiprodukt.

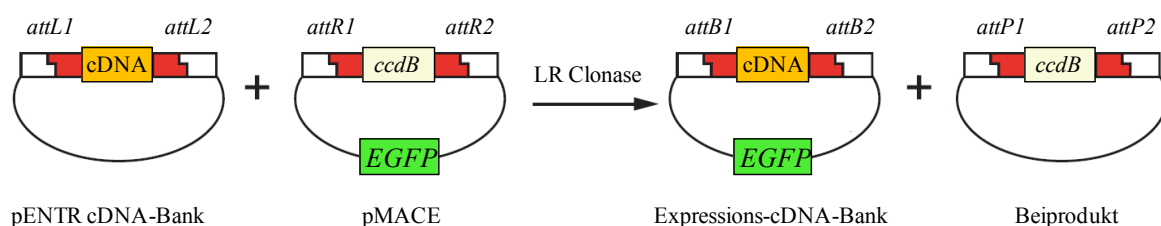


Abb. 2.23: Überführung der cDNA-Bank in den Expressionsvektor pMACE

Vergleichbar mit dem ersten Rekombinationsschritt (Abb. 2.2) erfolgt eine zweite *att* abhängige Rekombination. Die *attL*-Rekombinationsstellen der pENTR cDNA-Bank ermöglichen eine Rekombination mit den pMACE *attR*-Rekombinationsstellen. Nach Rekombination ersetzen die cDNA Sequenzen erneut das Toxin kodierende Gen *ccdB*. Verändert nach Superscript Full Length cDNA Construction Kit II (Invitrogen).

ERGEBNISSE

Nach dem Transfer der cDNA-Bank in pMACE wurden die subklonierten cDNAs erneut mit den zuvor angewendeten Methoden analysiert. Hierbei zeigten sich vergleichbare Eigenschaften der lentiviralen pMACE cDNA-Bank und pENTR cDNA-Bank hinsichtlich cDNA-Insertgrößen sowie des Anteils an *full length* Klonen und HCMV kodierten Transkripten (Abb. 2.24 & Tab. S2). Der Titer der pMACE cDNA-Bank entspricht mit $6,9 \times 10^4$ Klonen einem Vielfachen der ursprünglichen pENTR cDNA-Bank. Damit ist eine vollständige Übertragung der ursprünglichen cDNA-Konstrukte in pMACE sichergestellt.

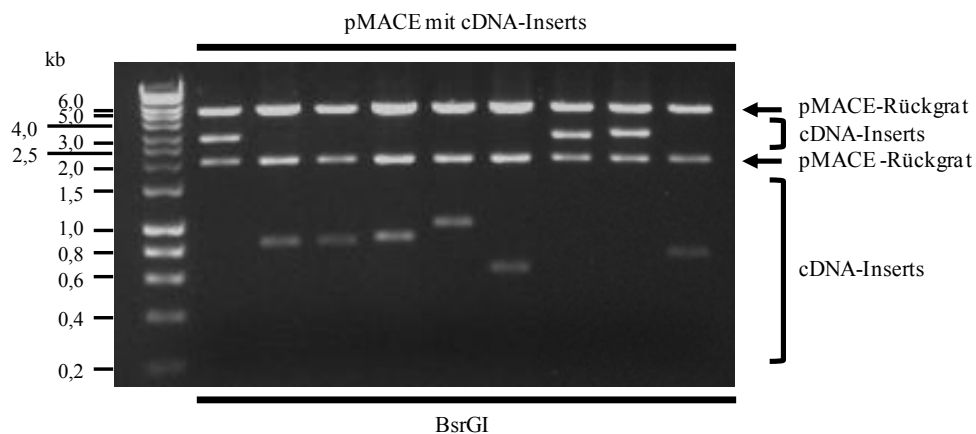


Abb. 2.24: Inserts der cDNA-Bank nach Rekombination in pMACE

Plasmid-DNA individueller cDNA-Klone wurde isoliert und nach *BsrGI*-Restriktionsverdau im Agarosegel aufgetrennt. Jede Spur entspricht einem Einzelklon. Die variierenden cDNA-Banden sind jeweils vom Vektorrückgrat (5,6 kb & 2,1 kb) zu unterscheiden.

Üblicherweise besteht das lentivirale Genom aus den Genen *gag*, *pol* und *env*, die für die Strukturproteine, Polymerase/Integrase/Protease und Oberflächen-Glykoproteine kodieren. Diese für Verpackung in virale Partikel, reverse Transkription und Integration notwendigen Proteine fehlen in lentiviralen Vektoren und können durch Ko-Transfektion von Helferplasmiden bereitgestellt werden. Da Lentiviren einen eingeschränkten Zelltropismus aufweisen, erfolgt in der Regel eine Pseudotypisierung des *env* Gens durch Glykoproteine, in diesem Fall VSV-G, die den Zelltropismus erweitern. Nach Ko-Transfektion der pMACE cDNA-Bank mit Helferplasmiden können retrovirale Partikel aus dem Mediumüberstand gewonnen und zur Infektion von Zielzellen genutzt werden. Eine erfolgte Transduktion lässt

ERGEBNISSE

sich anhand der EGFP-Expression ablesen. Der nach Transduktion bestimmte Virustiter betrug demnach mindestens $1,2 \times 10^5$ IU/ml (Abb. 2.25).

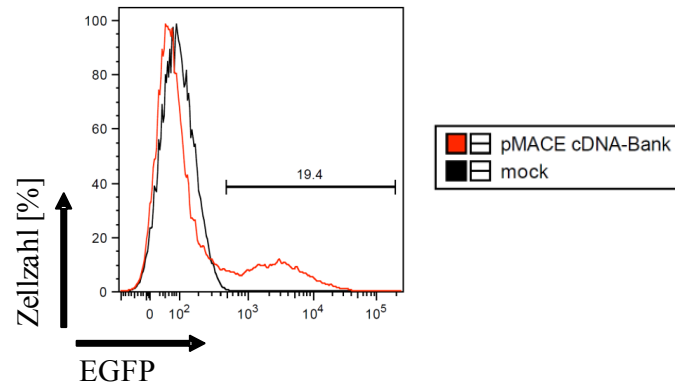


Abb. 2.25: Titerbestimmung der lentiviralen Partikel

EGFP wurde als Transduktionsmarker eingesetzt und im FACS detektiert. Aus der Zahl $EGFP^+$ Zielzellen ergibt sich die Zahl lentiviraler Partikel. HEK293T Zellen wurden mit der pMACE-cDNA-Bank und Helferplasmiden transfiziert. $1,2 \times 10^6$ RPE Zielzellen wurden mit den lentiviralen Partikeln aus dem Zellkulturüberstand (2 ml) der transfizierten Zellen transduziert. Dargestellt ist ein repräsentatives Resultat aus drei Experimenten.

Essentiell für eine funktionelle Analyse der transduzierten cDNA-Bank ist eine Expression der cDNAs in den Zielzellen, die möglichst lang anhält, sodass Effekte auf die IFN Signaltransduktion analysiert werden können. Im Gegensatz zur transienten Transfektion von Plasmiden werden lentivirale Vektoren stabil in das Genom der Zielzellen integriert. Dadurch wird zumindest theoretisch eine cDNA-Expression auf unbegrenzte Zeit ermöglicht. Ein weiterer Vorteil liegt in der hohen Transduktionseffizienz lentiviraler Vektoren. Durch eine Sortierung der $EGFP^+$ Zellen im FACS lässt sich eine nahezu reine Population transduzierter Zielzellen anreichern (Abb. 2.26).

ERGEBNISSE

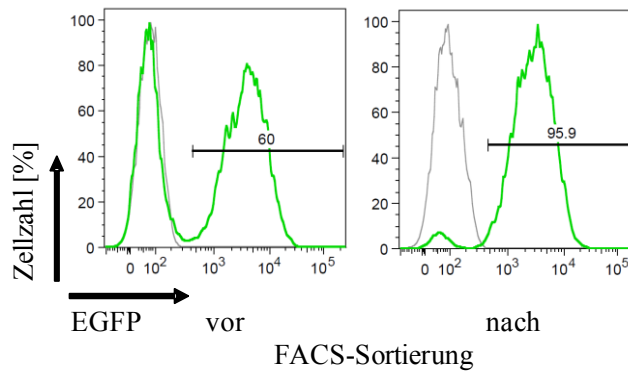


Abb. 2.26: Anreicherung transduzierter Zellen im FACS-Sorter

Lentiviral transduzierte RPE Zellen wurden im FACS-Sorter angereichert. Die Zunahme der EGFP⁺ Zellen wurde nach Rekultivierung der sortierten Zellen kontrolliert.

Der Begriff FACS (*fluorescence activated cell sorting*) wird im Folgenden synonym für Durchfluscytometrie verwendet. Obwohl in den folgenden Experimenten häufig Sortierungsschritte vorausgehen, entsprechen die dargestellten Abbildungen, falls nicht anders angegeben, Messungen am Durchfluscytometer. Abgelesen anhand der EGFP Expression in Zellkultur ist die Transduktion der cDNA-Bank über mindestens drei Monate stabil. Somit sind die zuvor angesprochenen funktionellen Analysen der cDNA-Bank über diesen Zeitraum möglich. Eine längere stabile Integration ist wahrscheinlich, wurde aber nicht getestet.

Als Expressionsnachweis der integrierten cDNAs wurde die zuvor per Slot Blot innerhalb der pENTR-cDNA-Bank identifizierte *US11*-kodierende cDNA (Tab. S2, EE76) verwendet. Nach Subklonierung in pMACE und Transduktion wurden die MHC-I Moleküle auf der Zelloberfläche durch eine Immunfärbung mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 per FACS detektiert (Abb. 2.27). Mit leerem pMACE transduzierte Zellen zeigen eine vergleichbare MHC-I Oberflächenexpression wie unbehandelte Zellen. Im Gegensatz dazu ist nach Transduktion von *US11* die MHC-I Expression in 82% der Zellen aufgrund proteasomaler Degradation deutlich reduziert. Dies zeigt, dass die antagonistische Wirkung einzelner transduzierter cDNAs der cDNA-Bank mit dem entwickelten Expressionssystem nachgewiesen und funktionell charakterisiert werden kann.

ERGEBNISSE

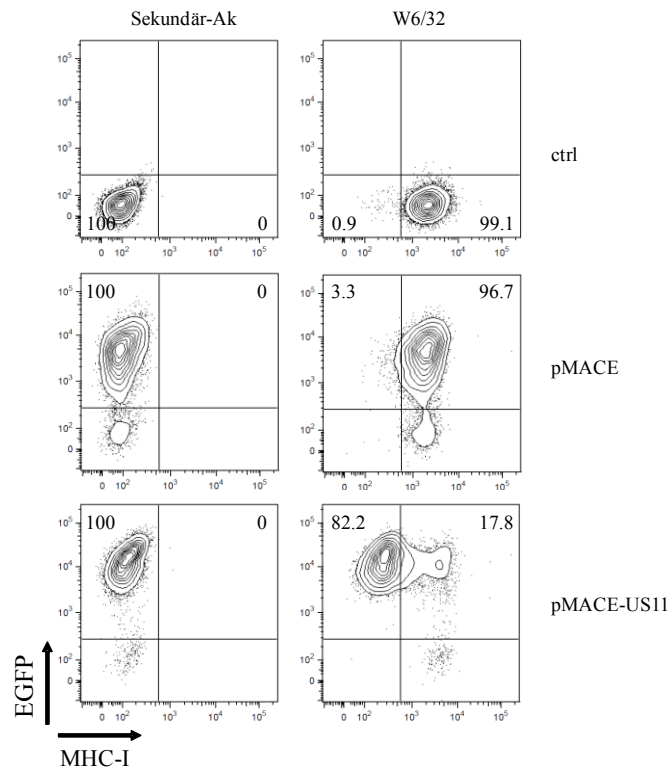


Abb. 2.27: Expressionsnachweis einer transduzierten viralen cDNA

Die MHC-I Oberflächenexpression von RPE Zellen wurde im FACS detektiert. Nicht transduzierte Zellen (ctrl) und transduzierte Zellen wurden entweder mit dem Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper oder mit Primär-(W6/32) und Sekundärantikörper inkubiert. Transduziert wurde zuvor entweder mit dem pMACE-Leervektor oder mit einer für US11 kodierenden cDNA (Tab. S2, EE76). Prozentpunkte geben jeweils die Mengenverhältnisse der beiden betroffenen Quadranten wieder.

Zusammenfassung (3)

Die HCMV cDNA-Bank wurde in einen lentiviralen Expressionsvektor kloniert. Nach Transduktion der cDNA-Bank erlaubt die stabile Integration der cDNAs in das Genom der Zielzellen eine funktionelle Charakterisierung der kodierten Genprodukte und ihrer biologischen Effekte.

2.4 Funktionelles FACS-Screening der cDNA-Bank nach IFN-Antagonisten

Die zuvor erzeugte und in lentivirale Partikel verpackte cDNA-Bank sollte in Zielzellen transduziert und im FACS auf ihre Fähigkeit, die IFN Signaltransduktion zu hemmen, überprüft werden. Grundlage der FACS-Analyse ist die Verwendung von HLA-DR als Marker für einen intakten IFN- γ Signalweg in den verwendeten Zellen und die durch den Vektor bereitgestellte Expression von EGFP als Marker für die erfolgte Transduktion. Das IFN- γ -induzierbare MHC-II Molekül HLA-DR hat sich bereits in einem zuvor etablierten Screening-System als geeigneter Marker erwiesen (Diplomarbeit M. Maywald, 2009). Nach IFN- γ Behandlung lässt sich die HLA-DR Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen um das 20-fache induzieren. Auf dieser Basis lassen sich Zellpopulationen mit einem unterbrochenen oder intakten IFN- γ Signalweg im FACS eindeutig unterscheiden. Mit Hilfe dieses Markers lässt sich ebenfalls zeigen, dass eine vorausgehende HCMV Infektion eine IFN- γ induzierte Expression von HLA-DR vollständig inhibiert (Abb. 2.28 A). Gleiches gilt für die IFN- γ induzierbareIDO Expression (Abb. 2.28 B). In infizierten Zellen, die EGFP als Marker exprimieren, ist demnach die IFN- γ Signaltransduktion im Gegensatz zu nicht infizierten Zellen unterbrochen. Eine vergleichbare Inhibition wird in transduzierten Zellen, die IFN-antagonistische cDNAs exprimieren, erwartet.

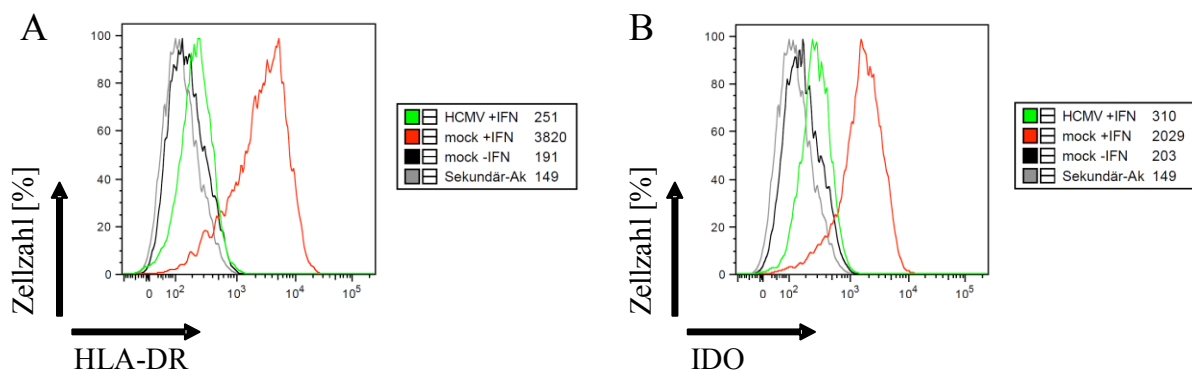


Abb. 2.28: Inhibition der IFN- γ Signaltransduktion durch HCMV

MRC-5 Zellen wurden mock infiziert oder HCMV-GFP (AD169-GFP Δ US2-11) infiziert (MOI 0,5). HCMV-GFP exprimiert GFP als Marker der Infektion. Dargestellt sind EGFP⁺ infizierte Zellen. Die Behandlung mit IFN- γ erfolgte ab 24 hpi mit 500 U/ml. 72 hpi wurde die Expression von HLA-DR (A) und IDO (B) im FACS bestimmt. Die MFI der jeweiligen Histogramme ist in der Legende angegeben.

2.4.1 Zelllinien-Screening zur Etablierung einer IFN-induzierbaren Reporterzelllinie

Zur Identifizierung potentiell IFN-antagonistischer cDNAs ist eine FACS-Sortierung und die damit verbundene Anreicherung der transduzierten EGFP⁺, aber nicht IFN-responsiblen Zellpopulationen erforderlich (Abb. 2.29). Im FACS-Sorter lassen sich die Zellpopulationen nach IFN- γ Stimulus anhand der Marker HLA-DR und EGFP trennen. EGFP-negative nicht transduzierte Zellen und HLA-DR⁺ Zellen, die einen intakten IFN- γ Signalweg aufweisen werden verworfen. EGFP⁺ Zellen hingegen mit erniedrigter HLA-DR Expression deuten auf eine mögliche IFN-antagonistische Wirkung der transduzierten cDNA hin. Diese lassen sich nach erfolgter Sortierung rekultivieren und im Hinblick auf eine IFN- γ Inhibition analysieren. Da die über den lentiviralen Vektor eingebrachte cDNA ins Genom integriert wird, ergeben sich stabile Zellpopulationen, die eventuell notwendige zusätzliche Sortierungen im FACS-Sorter erlauben. Die Identifizierung des in den Vektor aufgenommenen Transgens der Zellpopulationen wird durch im Vektor enthaltene Primer-Bindungsstellen ermöglicht.

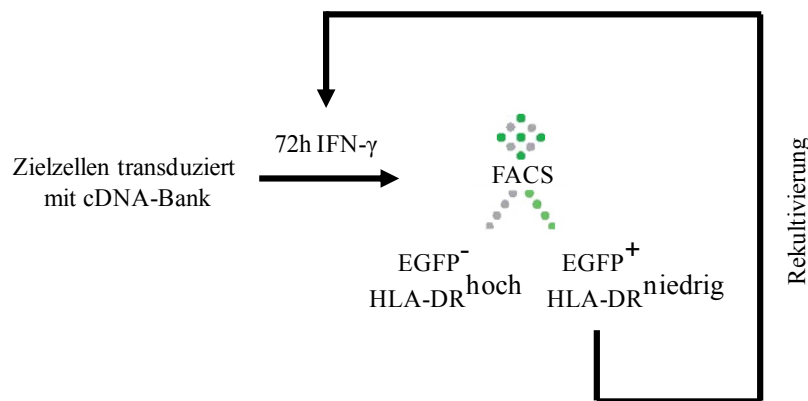


Abb. 2.29: Prinzip des FACS-Screenings

Nach Transduktion der cDNA-Bank werden die Zellen mit IFN- γ stimuliert und anhand der Marker EGFP und HLA-DR in repetitiven Sortierungsrunden im FACS aufgereinigt. Detaillierte Erläuterungen finden sich im Text.

Um aufeinanderfolgende FACS-Sortierungen durchzuführen, war zunächst die Etablierung einer IFN-induzierbaren Reporterzelllinie nötig. Diese sollte eine vergleichbar starke Induktion der HLA-DR Expression wie die zuvor verwendeten Lungenfibroblasten MRC-5 aufweisen (Abb. 2.28), da sich diese als primäre Zellen nicht für eine zeitlich ausgedehnte Screening-Prozedur eignen. Zu diesem Zweck wurde die IFN- γ abhängige HLA-DR

ERGEBNISSE

Expression diverser Zelllinien getestet (Abb. 2.30). Hierbei zeigten einige Zelllinien auch nach Behandlung mit IFN- γ keine Expression von HLA-DR. Dazu gehörten die Zelllinien Jurkat (T-Zell-Lymphom), Daudi (Burkitt Lymphom), SKOV-3 (Adenokarzinom) und HuH-7 (Hepatom). Jurkat-Zellen sowie weitere hämatopoetische Tumorzelllinien exprimieren den Transaktivator CIITA aufgrund einer epigenetischen Inaktivierung nicht (Kraiba *et al.*, 1989; Morimoto *et al.*, 2004; Wetzler *et al.*, 2003). Die B-Zelllinien 8866, 722.221 und BL-2 wiesen bereits im unbehandelten Zustand eine hohe konstitutive HLA-DR Expression auf, aber diese ließ sich nicht durch einen IFN- γ Stimulus erhöhen. In der Zelllinie 2fTGH (Sarkom) sowie den Monozyten-Zelllinien THP-1 und U937 ist eine deutlich erhöhte IFN- γ induzierte HLA-DR Expression zu erkennen. Allerdings wurde diese als nicht ausreichend betrachtet, um als Grundlage für ein FACS-basierendes Screening zu dienen. Essentiell hierbei ist die eindeutige Trennung von IFN-responsiblen und nicht responsiblen Zellen, die nicht gegeben ist, wenn die jeweiligen HLA-DR-Verteilungen teilweise stark überlappen. Als mögliche Kandidaten, die sich als Reporterzelllinie eignen, gelten demnach die Zelllinien ILN7 (Hautfibroblasten), U373 (Astrocytom) und HeLa (Zervixkarzinom), die eine ausgeprägte IFN- γ Antwort zeigen (Abb. 2.30). RPE (*retinal pigment epithelium*) Zellen weisen im Vergleich eine noch eindeutigere 60-fach erhöhte IFN- γ induzierte HLA-DR Expression mit lediglich minimalen Überschneidungen der IFN-responsiblen und nicht responsiblen Zellpopulationen auf (Abb. 2.30), wodurch im FACS-Screening eine klare Trennung der Zellpopulationen möglich ist. Zusätzlich lassen sich transduzierte RPE Zellen im FACS effizient sortieren und anschließend rekultivieren (Abb. 2.26). Dies gilt beispielweise nicht für ILN7 Zellen, die sich nach erfolgter Sortierung im FACS nicht rekultivieren ließen (nicht gezeigte Daten). Praktischerweise gehören RPE Zellen zu den wenigen produktiv mit HCMV-Laborstämmen infizierbaren Zelllinien, obwohl die Replikationskinetik im Vergleich zu MRC-5 Zellen leicht verzögert ist (Miceli *et al.*, 1989; Zimmermann *et al.*, 2014). Infolgedessen tritt auch die Inhibition der IFN- γ induzierten HLA-DR und IDO Expression leicht verspätet auf, ist jedoch ebenso stark ausgeprägt wie in MRC-5 Zellen (Zimmermann *et al.*, 2014). IDO, das zuvor als hauptverantwortliches Effektormolekül einer restringierten HCMV Infektion in RPE Zellen beschrieben wurde (Bodaghi *et al.*, 1999), ist somit auch in RPE Zellen den zu identifizierenden Antagonisten der IFN- γ Signaltransduktion unterworfen. Der zelluläre Kontext in dem eine cDNA-Expression stattfindet entspricht somit am ehesten dem einer viralen Infektion. Somit vereinen RPE Zellen die entscheidenden Kriterien einer geeigneten

ERGEBNISSE

Reporterzelllinie für das folgende FACS-Screening nach HCMV kodierten IFN- γ Antagonisten.

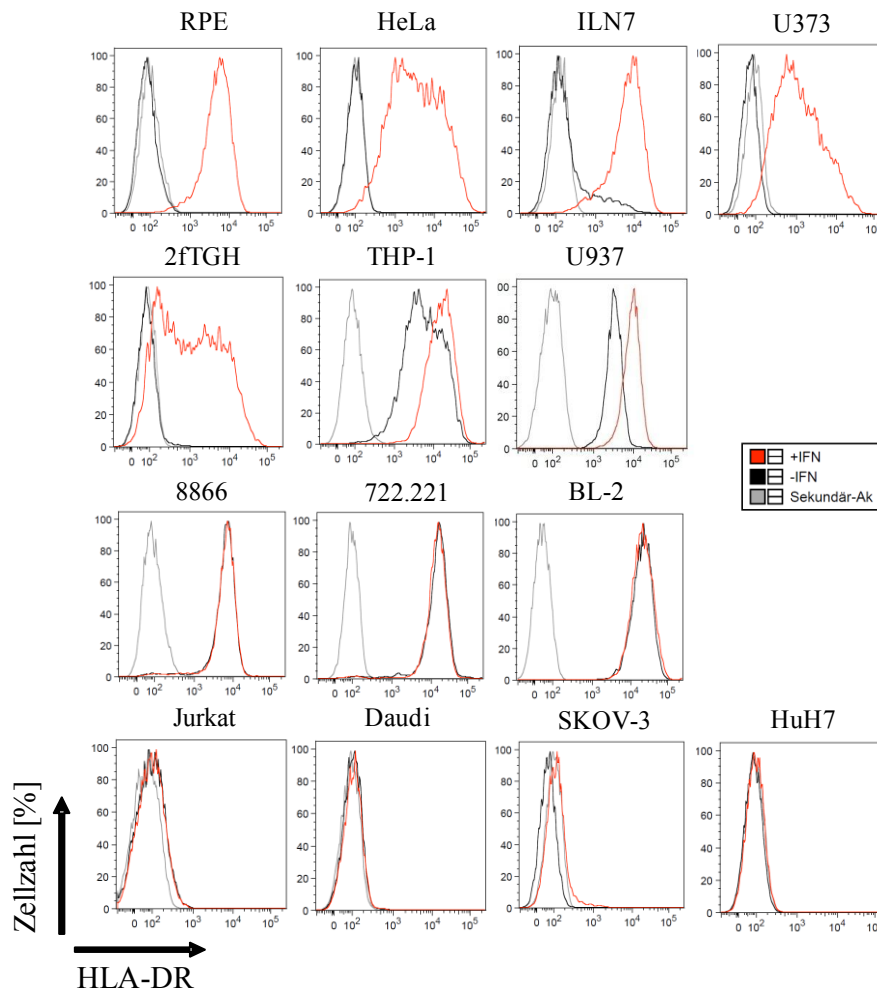


Abb. 2.30: HLA-DR als eindeutiger FACS-Marker IFN- γ -sensitiver RPE Zellen

Die genannten Zelllinien wurden entweder unbehandelt oder 72 h nach Zugabe von 500 U/ml IFN- γ hinsichtlich der HLA-DR Expression im FACS untersucht.

2.4.2 Anreicherung eines Modell-IFN-Antagonisten im FACS

Das FACS-basierende Screening IFN-induzierter und transduzierter Zellen wurde durch die Klonierung des Sendaivirus C-Proteins (SeV C) in einen lentiviralen Expressionsvektor und die nachfolgende Analyse validiert. SeV C dient in diesem Fall als Modell-IFN-Antagonist, der STAT1 bindet und dessen Degradation induziert (Garcin *et al.*, 2000; Garcin *et al.*, 2002). Infolgedessen bleibt eine IFN- γ induzierte Signaltransduktion nach Expression des C-Proteins aus. Dies ist übertragen auf HCMV vergleichbar mit einer Expression der zu identifizierenden

ERGEBNISSE

IFN- γ Antagonisten. Entsprechend der zuvor etablierten FACS-Messung in RPE Zellen wurden HLA-DR als Marker der IFN- γ Signaltransduktion und EGFP als Transduktionsmarker verwendet. Mit einem leeren lentiviralen Vektor transduzierte RPE Zellen weisen eine vergleichbare HLA-DR Oberflächenexpression wie nicht transduzierte Zellen auf (Abb. 2.31). Demnach interferieren eine Infektion mit lentiviralen Partikeln und eine Integration des Vektors in das Genom nicht mit der IFN- γ Signaltransduktion. Nach Transduktion eines lentiviralen Vektors, der für das SeV C-Protein kodiert, ist die HLA-DR Expression hingegen trotz IFN- γ Behandlung in 90% der transduzierten Zellen deutlich reduziert (Abb. 2.31). Auch hier wurde eine klare Trennung zwischen IFN-responsiblen und nicht responsiblen Zellen erreicht. Demnach eignet sich das SeV C-Protein als Modell-IFN-Antagonist, der eingesetzt werden kann, die Möglichkeiten eines FACS-basierenden Screenings nach IFN- γ Antagonisten festzulegen. Aufbauend auf der Analyse des SeV C Modells sollten im Folgenden die FACS-Sortierungen der transduzierten cDNA-Bank durchgeführt werden, um virale cDNAs als potentielle IFN- γ Antagonisten zu identifizieren.

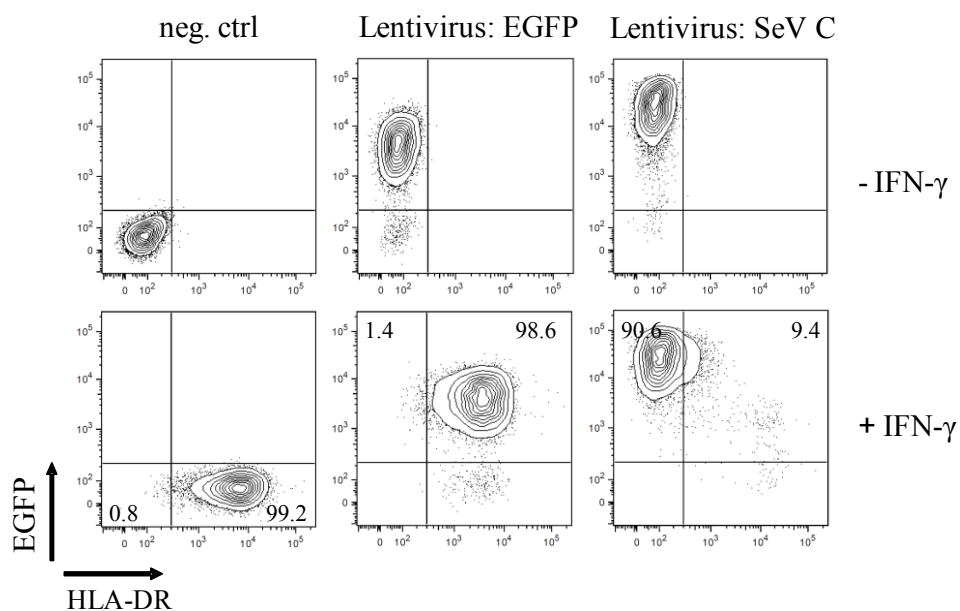


Abb. 2.31: SeV C-Protein als Modell-IFN-Antagonist

Nicht transduzierte und transduzierte RPE Zellen wurden ohne und mit Zugabe von 500 U/ml IFN- γ analysiert. Lentivirale Vektorstrukturen kodieren entweder nur für EGFP oder für SeV C und EGFP. 72 h nach IFN- γ Stimulation wurde die HLA-DR Expression im FACS bestimmt.

ERGEBNISSE

Nach Transduktion der cDNA-Bank wurde lediglich eine kleine Subpopulation erwartet, die potentielle IFN- γ Antagonisten kodieren. Die Mehrheit der transduzierten Zellen würde zelluläre, aber auch virale cDNAs exprimieren, die keinerlei Einfluss auf die IFN- γ Signaltransduktion nehmen. Entsprechend wurde auch im Modellsystem eine Startpopulation von 0,1% SeV C exprimierenden Zellen eingesetzt. Dabei lässt sich der Anteil von SeV C exprimierenden Zellen im Verlauf der FACS-Sortierungen anhand der EGFP Expression messen (Abb. 2.32 A). Die verbleibenden 99,9% der Zellen wurden ebenfalls lentiviral transduziert, exprimieren aber kein EGFP. Ausgehend von dieser Startpopulation erhöhte sich der Anteil von SeV C exprimierenden Zellen mit jeder FACS-Sortierung der jeweiligen Zellpopulationen mit geringer HLA-DR Expression schrittweise (Abb. 2.32 A). Innerhalb von nur drei Sortierungsrunden wurde dabei eine 90%ige IFN- γ insensitive Zellpopulation angereichert. Aus genomischer DNA dieser Zellpopulation ließ sich per PCR die integrierte SeV C Sequenz nachweisen (Abb. 2.26 B). Somit steht eine FACS-basierende Methode zur Verfügung, die es erlaubt, transduzierte Zellen, die IFN-antagonistische Proteine exprimieren, zu isolieren und zu charakterisieren.

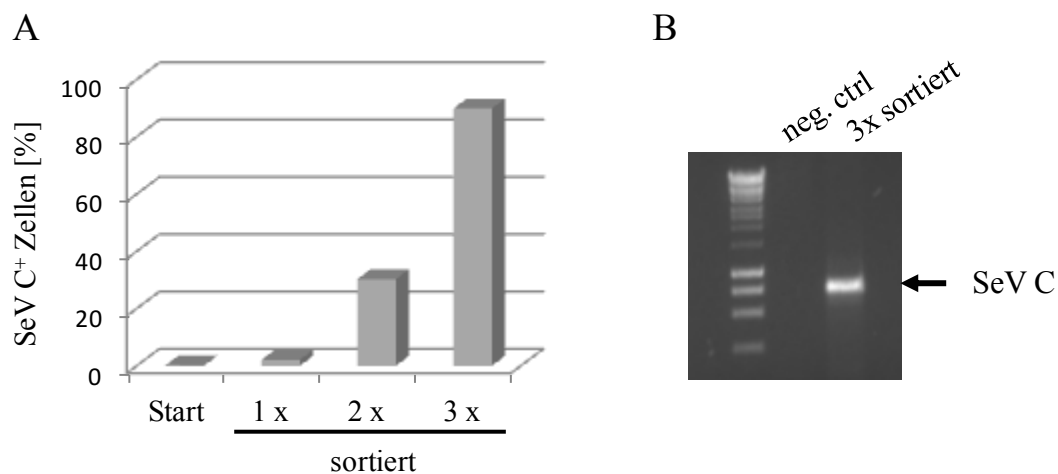


Abb. 2.32: Anreicherung SeV C transduzierter Zellen durch FACS Sortierung

(A) Eine heterogene Zellpopulation mit 0,1% SeV C exprimierenden Zellen (Start) wurde im FACS-Sorter in drei aufeinanderfolgenden Sortierungsrunden angereichert. Sortiert wurden jeweils Zellen mit niedriger HLA-DR Expression nach vorangegangenen 72 h Behandlung mit 250 U/ml IFN- γ . Der Anteil der SeV C⁺ Zellen wurde nach Reaktivierung der sortierten Zellen anhand der Expression von EGFP im FACS ermittelt. (B) In transduzierten Zellen lässt sich die SeV C Sequenz mittels PCR nachgewiesen. Die Primerbindestellen liegen im lentiviralen Vektor und amplifizieren das klonierte Gen.

ERGEBNISSE

2.4.3 Anreicherung einer IFN-insensitiven Subpopulation im FACS-Screening

Mit dem zuvor etablierten FACS-basierenden Screening sollte im Folgenden die HCMV cDNA-Bank nach Transfektion in die Reporterzelllinie im Hinblick auf eine veränderte IFN- γ induzierte HLA-DR Expression analysiert und entsprechende Zellpopulationen sortiert werden. Da erwartet wurde, dass dies nur auf einen Bruchteil der transduzierten Zellen zutrifft, war die Zahl der sortierten Zellen zu Beginn des Screenings relativ klein und im FACS-Plot nicht unbedingt als eigenständige Zellpopulation zu definieren, sondern eher als einzelne Zellen zu erkennen (Abb. 2.33).

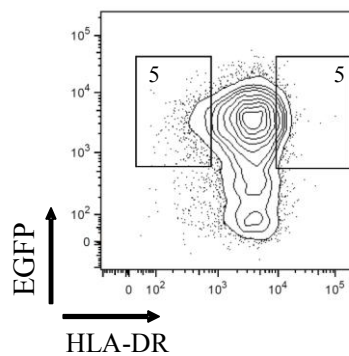


Abb. 2.33: Sortierungsschema in Abhängigkeit von der HLA-DR Expression

Dargestellt ist ein beispielhafter FACS-Plot während der Auftrennung transduzierter (EGFP⁺) und IFN- γ behandelter Zellen im FACS-Sorter. Neben EGFP erfolgt die Sortierung entweder aufgrund einer niedrigen oder hohen HLA-DR Expression 72h nach Stimulation mit 250 U/ml IFN- γ . Die gesetzten Markierungen geben den Anteil der sortierten Zellen wieder, die rekultiviert und in anschließenden Sortierungsrunden weiter angereichert wurden.

Zusätzlich zu Zellpopulationen mit niedriger HLA-DR Expression wurden als Kontrolle auch Zellpopulationen mit hoher HLA-DR Expression isoliert. Beispielsweise könnten transduzierte cDNAs vergleichbar mit CIITA HLA-DR hochregulieren. Außerdem sollte dies sicherstellen, dass die Zellen durch die Screening-Prozedur nicht automatisch die Fähigkeit einer intakten IFN- γ Antwort verlieren. Die Anreicherung der sortierten Populationen wurde jeweils nach Rekultivierung und Heranwachsen der Zellen im FACS überprüft. Da dies eine gewisse Zeit ohne IFN- γ im Zellkulturmedium in Anspruch nimmt, hatte die HLA-DR Expression der Zellen wieder das Niveau nicht stimulierter Zellen erreicht. Deshalb war vor jeder FACS-Analyse aber auch vor jeder weiteren Sortierung ein erneuter IFN- γ Stimulus nötig. Eine Subpopulation, die eine über das IFN- γ induzierte Niveau hinaus erhöhte HLA-

ERGEBNISSE

DR Expression aufweist, konnte auch nach zehn Sortierungsrunden nicht isoliert werden. Jedoch ist bei Selektion von Zellen mit hoher HLA-DR Expression auch in Abwesenheit von IFN- γ HLA-DR detektierbar (Abb. 2.34). Die HLA-DR Expression war zwar schwächer als nach IFN- γ Behandlung, aber im Vergleich zu nicht behandelten Zellen deutlich erhöht. Dies deutet auf eine konstitutiv erhöhte HLA-DR Oberflächenexpression oder einen verlangsamten Turnover der HLA-DR Moleküle aus der vorausgegangenen Stimulation hin. Nach Stimulation mit IFN- γ erreichte die HLA-DR Expression wieder das Niveau nicht transduzierter Zellen.

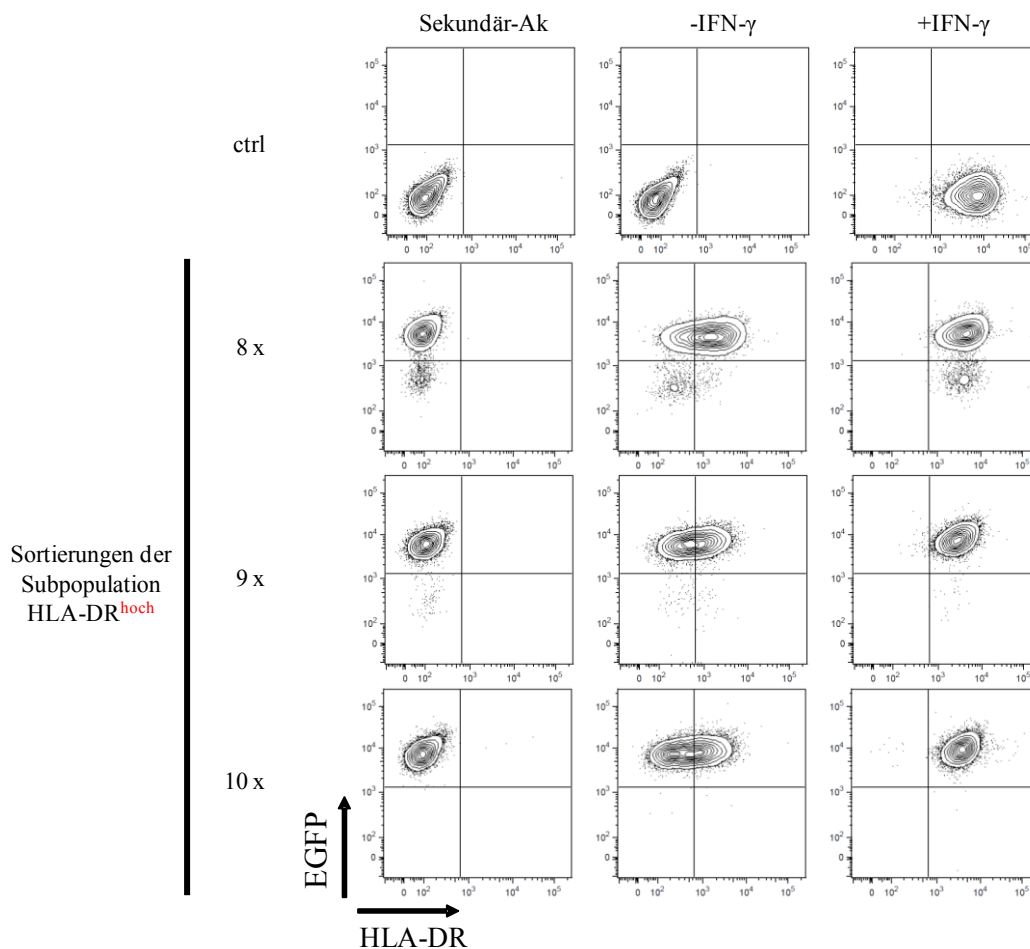


Abb. 2.34: Erhöhte HLA-DR Expression in HLA-DR^{hoch} Subpopulation

RPE Zellen (ctrl) und sortierte HLA-DR^{hoch} Subpopulationen nach der Reaktivierung wurden hinsichtlich ihrer IFN- γ induzierbaren HLA-DR Expression im FACS untersucht. Unbehandelte und IFN- γ stimulierte (72 h, 500 U/ml) Zellen wurden mit Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper oder mit anti-HLA-DR Primär- und Sekundärantikörper gefärbt.

ERGEBNISSE

Bei der Selektion auf Zellen mit niedriger HLA-DR Expression hingegen war nach acht FACS-Sortierungen eine Subpopulation detektierbar, die keine vollständig intakte IFN- γ Signaltransduktion aufwies (Abb. 2.35). Im Gegensatz zur Sortierung des SeV C Modell-IFN-Antagonisten waren zwar zusätzliche Sortierungsrunden notwendig, bis eine Subpopulation mit erniedrigter HLA-DR Expression erkennbar war; aber diese Subpopulation konnte im weiteren Verlauf des Screenings angereichert und nach 14 Sortierungsrunden nahezu aufgereinigt werden.

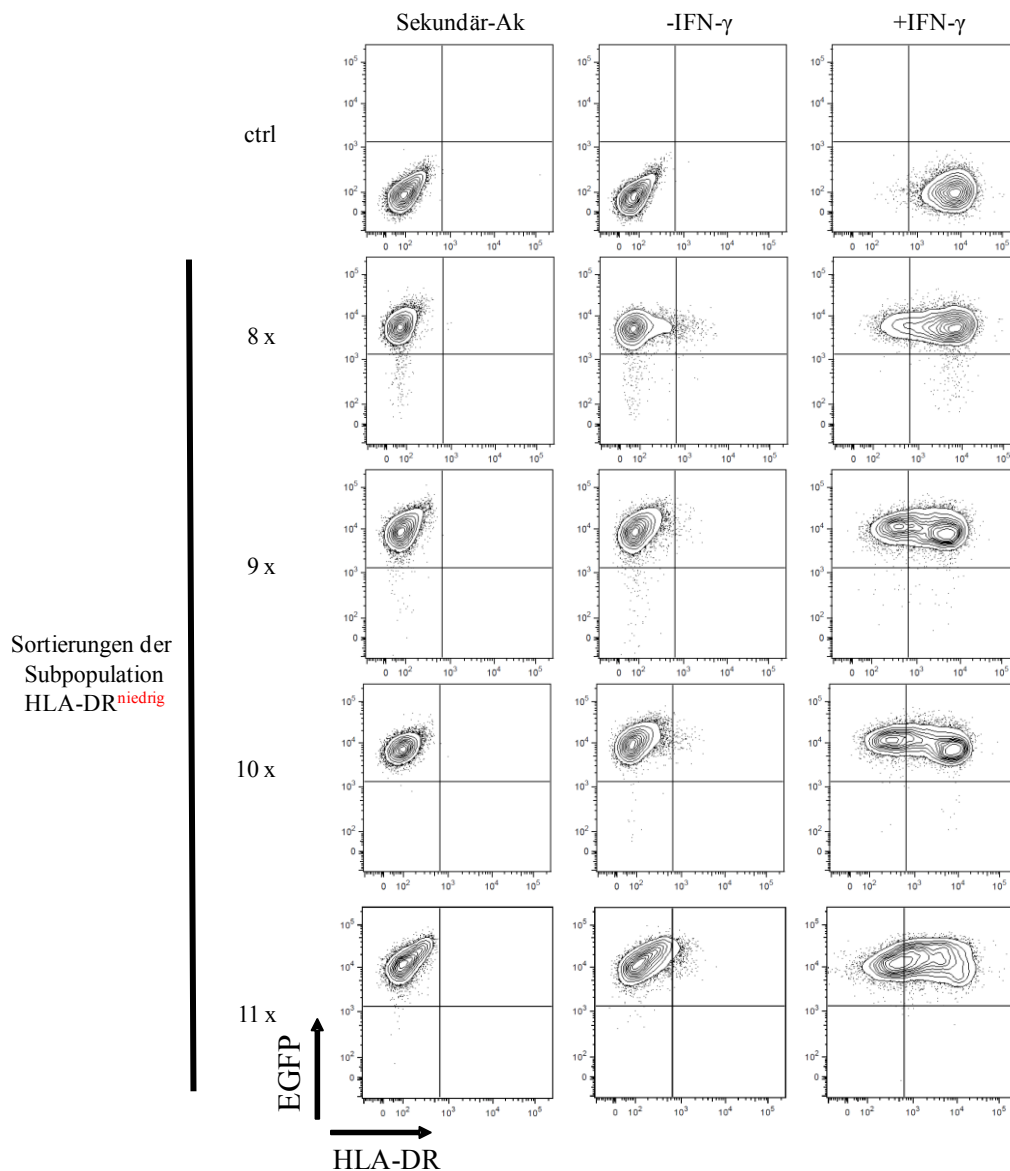


Abb. 2.35 wird fortgesetzt

ERGEBNISSE

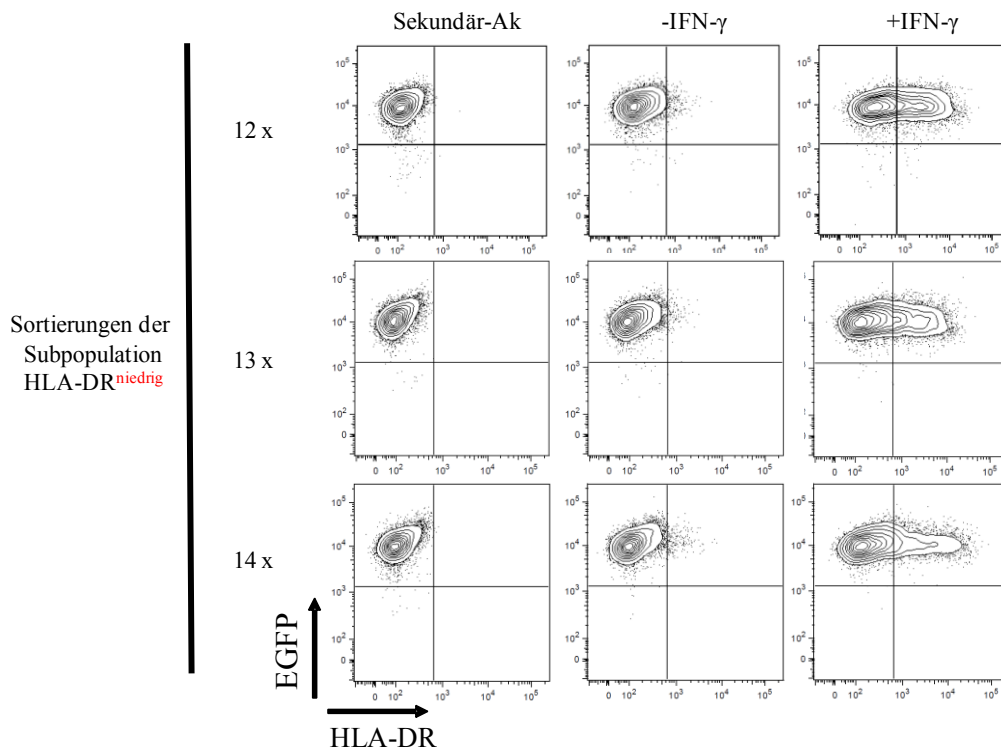


Abb. 2.35: Anreicherung einer HLA-DR^{niedrig} Subpopulation

Die HLA-DR Expression von RPE Zellen (ctrl) und sortierte HLA-DR^{niedrig} Subpopulationen nach Reaktivierung wurde im FACS bestimmt. 72 h nach Behandlung mit 500 U/ml IFN- γ erfolgte die Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper oder mit anti-HLA-DR Primär- und Sekundärantikörpern.

Trotz der Aufreinigung einer Subpopulation mit niedriger HLA-DR Expression blieb dies ein heterogenes Gemisch transduzierter Zellen. Ob diese Zellen unterschiedliche cDNAs integriert haben und in welchem Ausmaß sie sich bezüglich des Transgens unterscheiden, war nicht klar. Außerdem verunreinigte nach wie vor ein kleiner Anteil IFN- γ responsibler Zellen die Population. Um Subpopulationen herzustellen, die sich einer einzigen cDNA zuordnen lassen, wurden FACS-Einzelzellsortierungen durchgeführt. Die Einzelklone ließen sich wie zuvor die gesamte Zellpopulation nach FACS-Sortierung reaktivieren und analysieren. Im diesem Fall war es jedoch notwendig, durch letale γ -Strahlung inaktivierte RPE Zellen vorzulegen, die als *bystander*-Zellen das Überleben des sortierten Einzelklons erleichtern, sich aber nicht mehr selbst vervielfältigen können. Somit wurden die *bystander*-Zellen nach Expansion der Einzelklone automatisch entfernt und waren auch in der folgenden FACS-Analyse nicht mehr als EGFP-negative Zellen detektierbar (Abb. 2.36). Alle Einzelklone zeigten eine eingeschränkte IFN- γ induzierte HLA-DR Expression, die von Klon zu Klon

ERGEBNISSE

unterschiedlich stark inhibiert wird (Abb. 2.36). Aus dem Pool der cDNA-Bank könnte somit zehn cDNA-Klone isoliert werden, die potentielle IFN-Antagonisten exprimieren.

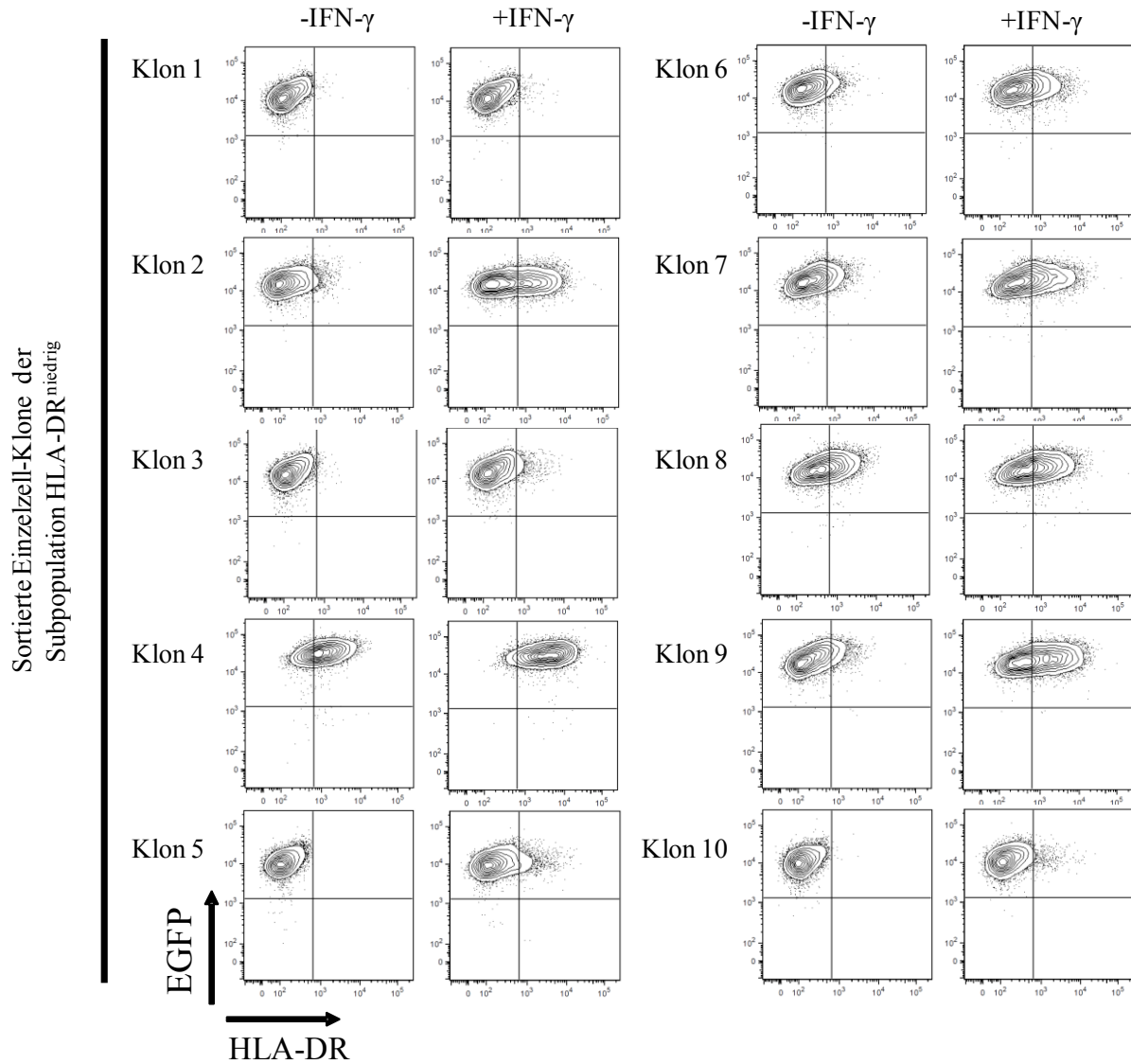


Abb. 2.36: Einzelzellsortierungen der HLA-DR^{niedrig} Subpopulation

Zellen der 14 x sortierten HLA-DR^{niedrig} Subpopulation wurden im FACS vereinzelt. Die HLA-DR Expression der rekultivierten Einzelzell-Klone wurde 72 h nach Stimulation mit 500 U/ml IFN- γ im FACS bestimmt.

2.4.4 Stathmin-1 als potentieller Regulator des Jak/STAT Signalwegs

Nach Aufreinigung der IFN-insensitiven Subpopulation stellte sich die Frage, ob die Genprodukte der integrierten cDNAs tatsächlich mit der Signaltransduktion interferieren oder direkt auf den Marker HLA-DR wirken. Da auch HCMV Antagonisten der MHC-Klasse II in der cDNA-Bank nachgewiesen wurden, wäre auch eine verminderte HLA-DR Expression beispielsweise durch die US2 vermittelte Degradation denkbar. Aufgrund dessen wurdeIDO als zusätzlicher Marker der IFN- γ Signaltransduktion verwendet. Unabhängig von einer Regulation der MHC Klasse II Moleküle induzierte IFN- γ in RPE Zellen einen 9-fachen Anstieg der intrazellulären IDO Proteinmenge (Abb. 2.37 A). Dies war in der aufgereinigten Subpopulation nicht der Fall. Dementsprechend lässt sich die verminderte HLA-DR Expression nicht auf einen direkten MHC-Klasse II Antagonisten oder eine Inhibition des CIITA Promotors zurückführen, sondern auf eine Inhibition der IFN- γ Signaltransduktion. Um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt der Signaltransduktion sich diese Inhibition manifestiert und welche Signalmoleküle betroffen sind, wurden Proteinlysate angefertigt. RPE Zellen zeigten bereits zehn Minuten nach IFN- γ Behandlung eine starke Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1, die reguliert durch die negative Rückkopplung 24 Stunden nach Stimulation zwar schwach, aber immer noch nachweisbar war (Abb. 2.37 B). Induziert durch IFN- γ war nach 24 Stunden auch ein Anstieg der IDO Proteinmenge erkennbar. Auch die STAT1 Proteinmenge selbst war 24 Stunden nach IFN- γ Behandlung erhöht, da STAT1 zwar konstitutiv exprimiert wird, aber zudem IFN- γ induzierbar ist. In Lysaten der aufgereinigten Subpopulation war hingegen trotz IFN- γ Zugabe zu keinem Zeitpunkt Tyrosin-phosphoryliertes STAT1 detektierbar und infolgedessen ist auch keine IDO Expression oder ein Anstieg der STAT1 Expression möglich (Abb. 2.37 B). Die Jak1 (130 kDa) Proteinmengen waren in den Ausgangszellen und den sortierten Zellen vergleichbar. Somit liegt keine Degradation der Signalmoleküle vor. Demnach erfolgt die Inhibition vor oder bei Phosphorylierung der STAT1 Moleküle. Allerdings ist anzumerken, dass in der sortierten Subpopulation zusätzliche kleinere Banden (100 kDa und insbesondere 75 kDa) stärker erscheinen. Inwiefern diese Banden mögliche Degradationsprodukte von Jak1 darstellen oder ob eine unspezifische Bindung des Antikörpers vorliegt, ist jedoch nicht klar.

ERGEBNISSE

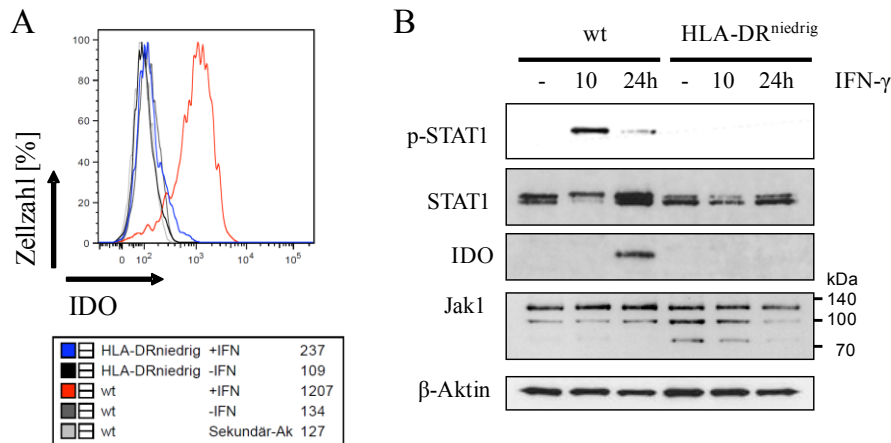


Abb. 2.37: Inhibition des IFN- γ Signalwegs in der HLA-DR^{niedrig} Subpopulation

(A) RPE Zellen und Zellen der 14 x sortierten HLA-DR^{niedrig} Subpopulation wurden 48h nach Stimulation mit 500 U/ml IFN- γ fixiert und permeabilisiert. Nach intrazellulärer Färbung mit anti-IDO Antikörpern erfolgte die Detektion im FACS. Die MFI der jeweiligen Histogramme ist in der Legende angegeben. (B) Die Proteilmengen der Komponenten der IFN- γ Signaltransduktion wurden im Western Blot bestimmt. RPE Zellen und Zellen der 14 x sortierten HLA-DR^{niedrig} Subpopulation wurden unbehandelt oder nach Inkubation mit 500 U/ml IFN- γ lysiert. Die Dauer der IFN- γ Behandlung betrug entweder 10 Minuten oder 24 h. Der Nachweis von Tyrosin-phosphoryliertem STAT1, STAT1, IDO, Jak1 und β -Aktin erfolgte mit spezifischen Antikörpern.

Um die cDNAs zu identifizieren, deren Genprodukte die IFN- γ Signaltransduktion offenbar beeinflussen, wurde genomische DNA der sortierten Subpopulationen und der Einzelklone isoliert. Die integrierten cDNAs wurden per PCR amplifiziert und sequenziert. Zu Beginn des Screenings ließen sich aus dem Gesamtpool der transduzierten cDNAs aufgrund der Diversität der cDNAs keine spezifischen Banden amplifizieren (Abb. 2.38). Dies änderte sich im Verlauf der Sortierungsrunden und der damit verbundenen Anreicherung von Subpopulationen, die spezifische cDNAs integriert haben. Nach Sortierung der transduzierten Zellen mit erhöhter HLA-DR Expression ließ sich eine distinkte Bande bei 1,7 kb detektieren (Abb. 2.38). In den sortierten Subpopulationen mit inhibiertem IFN- γ Signalweg trat eine distinkte Bande bei 1,2 kb auf. Auch alle Einzelklone haben eine cDNA der gleichen Größe integriert. Daher ist davon auszugehen, dass das Genprodukt dieser cDNA den IFN- γ antagonistischen Effekt vermittelt. Überraschenderweise stellte sich nach Sequenzierung heraus, dass beide cDNAs nicht viraler, sondern zellulärer Herkunft sind. Die 1,7 kb große Bande entspricht PQLC2 (*PQ loop repeat containing 2*), einem lysosomalen Transporter

ERGEBNISSE

kationischer Aminosäuren (Jezegou *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Alle 1,2 kb großen Banden kodieren laut Sequenzierung für Stathmin-1, dem Produkt des *STMN1* Gens. Stathmin-1 ist am besten charakterisiert als Regulator der Mikrotubuli-Polymerisation (Belmont & Mitchison, 1996), scheint aber in diesem Fall auch eine IFN- γ vermittelte Signaltransduktion negativ zu beeinflussen.

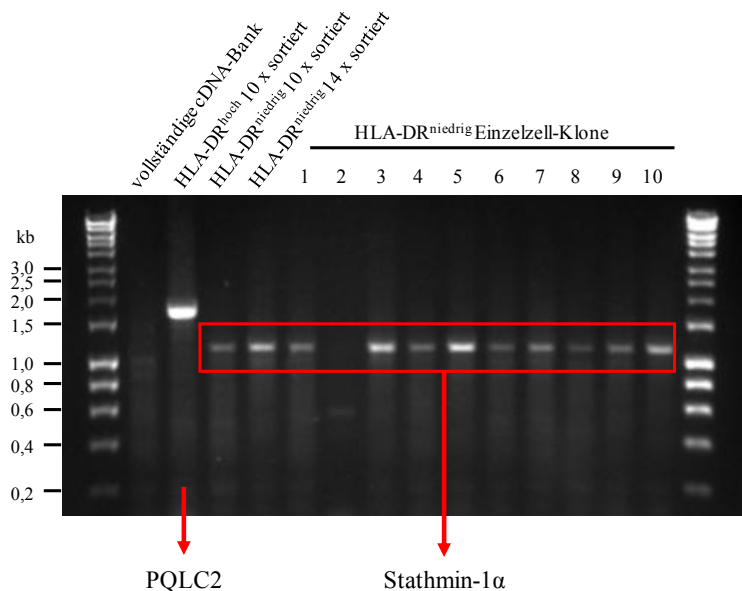


Abb. 2.38: Stathmin-1 cDNA integriert in HLA-DR^{niedrig} Subpopulation

Präparationen der genomischen DNA transduzierter RPE Zellen vor oder nach FACS Sortierungen wurden als PCR-*template* zur Bestimmung der integrierten cDNA eingesetzt. Neben dem heterogenen cDNA-Gemisch der vollständigen transduzierten cDNA-Bank als Kontrolle wurden die aufgereinigten HLA-DR^{hoch} und HLA-DR^{niedrig} Subpopulationen sowie Einzellsortierungen untersucht. Die verwendeten PCR-Primer binden im lentiviralen Vektor und amplifizieren die dazwischen liegende cDNA. Die PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel isoliert und sequenziert. Die Pfeile ordnen den Banden die jeweiligen Genprodukte der cDNA Sequenzen zu.

Das *STMN1* Gen exprimiert vier Transkriptvarianten, die für zwei Proteine, α und β , kodieren. Die Transkriptvarianten 1, 2 und 3 variieren im 5'-UTR und nutzen im Vergleich zur Transkriptvariante 4 ein alternatives fünftes Exon (Abb. 2.39). Die Transkriptvarianten 1, 2 und 3 kodieren für das gleiche Protein, Stathmin-1 α . Die Transkriptvariante 4 kodiert für das größere Stathmin-1 β . Die isolierte cDNA (die Sequenz findet sich in Abb. S1) stellt eine bisher nicht identifizierte Transkriptvariante dar, die im Wesentlichen der Transkriptvariante 3 entspricht, sich aber durch kürzere 5' und 3'-UTRs unterscheidet (Abb. 2.39). Trotzdem enthält die isolierte cDNA die vollständigen kodierenden Sequenzen für Stathmin-1 α .

ERGEBNISSE

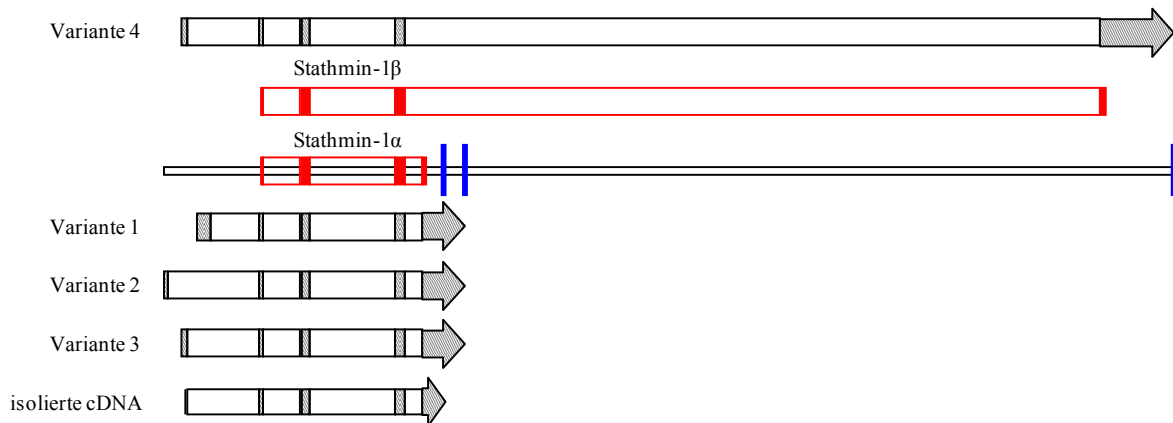


Abb. 2.39: Stathmin-1 Transkriptvarianten

Die bisherigen vier Transkriptvarianten (NCBI Datenbank) und die isolierte cDNA sind relativ zu ihrer Lage auf dem Chromosom 1 dargestellt (schraffiert). In Abhängigkeit vom Gebrauch der jeweiligen Exons enthalten die Transkripte die kodierenden Sequenzen für Stathmin-1 α oder Stathmin-1 β (rot). Poly(A)-Signale begrenzen die jeweiligen mRNAs (blaue Balken). Introns sind als Aussparungen dargestellt.

Zur Validierung der IFN- γ antagonistischen Wirkung von Stathmin-1 wurde die isolierte cDNA in pIRES kloniert. In HeLa Zellen ließ sich Stathmin-1 als 17-18 kDa großes Protein nachweisen (Abb. 2.40). Nicht transfizierte oder mit pIRES transfizierte Zellen wiesen eine Basisexpression von Stathmin-1 auf, das ubiquitär exprimiert wurde. Mit pIRES-*STMN1* transfizierte Zellen überexprimierten Stathmin-1 im Vergleich dazu. Bei Überexpression von Stathmin-1 war eine weitere 20 kDa große Bande detektierbar, die eine posttranslationale Modifikation und Regulation von Stathmin-1 andeuten. Regulatorische Stathmin-1 Serin-Hyperphosphorylierungen sind beschrieben (Cassimeris, 2002).

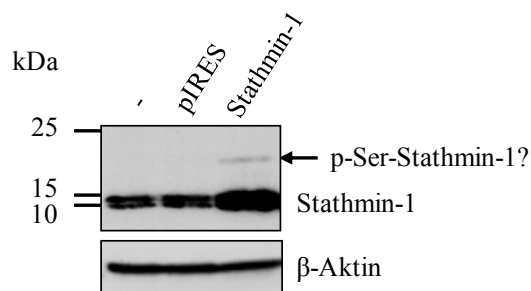


Abb. 2.40: Stathmin-1 Überexpression nach Transfektion

Die isolierte cDNA-Sequenz von Stathmin-1 wurde in pIRES kloniert. HeLa Zellen wurden unbehandelt und 24 h nach Transfektion mit pIRES oder pIRES- *STMN1* lysiert. Im Western Blot wurde die Stathmin-1 Proteinmengen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers bestimmt. Als Ladekontrolle dient β -Aktin.

ERGEBNISSE

Im FACS ließ sich eine Inhibition der IFN- γ Signaltransduktion nach Transfektion erneut an der HLA-DR Expression ablesen. EGFP diente als Transfektionsmarker. Erwartungsgemäß zeigten nicht transfizierte und mit pIRES transfizierte Zellen eine vergleichbare IFN- γ vermittelte HLA-DR Induktion (Abb. 2.41). Bei Expression des Modell-IFN-Antagonisten SeV C waren 91,5% der transfizierten Zellen nicht in der Lage, auf den IFN- γ Stimulus zu reagieren. Nach Überexpression von Stathmin-1 waren dies immerhin 42,9% der transfizierten Zellen. Eine Inhibition der IFN- γ Signaltransduktion durch Stathmin-1 war somit nachweisbar, aber im Vergleich zum SeV C-Protein schwächer ausgeprägt. Die ursprüngliche Identifizierung von Stathmin-1 als Antagonist der IFN- γ Signaltransduktion im FACS-Screening konnte somit in einem unabhängigen System bestätigt und validiert werden.

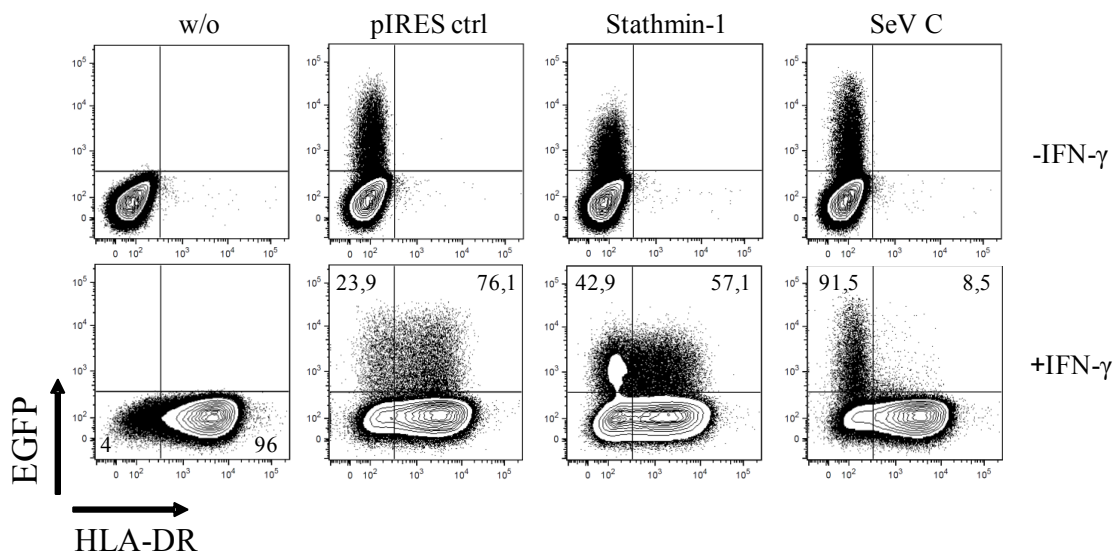


Abb. 2.41: Stathmin-1 reduziert IFN- γ induzierte HLA-DR Expression

HeLa Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit pIRES, pIRES-*STMN1* oder pIRES-SeV C mit für 48 h mit 500 U/ml IFN- γ behandelt. Die Detektion von EGFP und HLA-DR erfolgte im FACS.

Zusammenfassung (4)

Die lentivirale Transduktion der cDNA-Bank erlaubt ein funktionelles Screening nach viralen und zellulären IFN- γ Antagonisten in aufeinanderfolgenden Sortierungerunden im FACS. Die Oberflächenexpression von HLA-DR dient hierbei als stark induzierbarer Marker des IFN- γ Signalwegs. Als *proof of principle* konnte ein Modell-Antagonist der IFN- γ Signaltransduktion im FACS-Screening aufgereingt werden. Das Screening der transduzierten cDNA-Bank führte zur Identifikation von Stathmin-1 als einen neuen potentiellen Regulator der STAT1 Aktivierung bzw. nachgeschalteter Prozesse.

3 DISKUSSION

3.1 Einsicht in das komplexe HCMV Transkriptom

Die Festlegung von ORFs innerhalb des HCMV Genoms war stets ein fortlaufender Prozess, der durch Sequenzvergleiche mit klinischen Isolaten und verwandten CMVs anderer Spezies wie Schimpansen (CCMV), Rhesus-Makaken (RhCMV) und Maus CMV (MCMV) neue ORFs etablierte und alte verwarf (Davison *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003a). Durch den erheblichen Anstieg der potentiellen ORFs auf über 700 erscheint die Herausforderung, HCMV ORFs zu definieren und deren Funktion zu untersuchen, umso komplexer (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Die Analyse einer viralen cDNA-Bank kann hierbei neue Einsichten in das HCMV Transkriptom eröffnen. Obwohl die Kenntnis der gesamten Bandbreite der viralen RNAs und den daraus resultierenden Proteinen essentiell für das molekulare Verständnis von HCMV ist, sind genomweite Analysen bislang nur sehr begrenzt verfügbar. Auffälligste Merkmale der untersuchten Transkripte waren alternative 5'-Startpunkte und 3'-coterminale Enden der Transkription innerhalb einer Genregion. Die häufigste und wahrscheinlichste Erklärung liegt in der Nutzung verschiedener Promotoren, die abhängig von den zum jeweiligen Replikationszeitpunkt zur Verfügung stehenden Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Daraus ergibt sich ein sich dynamisch wandelndes Transkriptionsprofil, das sich auch in *early* und *late* Transkripten der cDNA-Bank zeigt (Abb. 2.13 A; Guo & Huang, 1993; Stern-Ginossar *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2007). Viele weitere 5'-variierende und 3'-coterminale Transkripte eines ORFs, aber auch ganzer Genregionen lassen auf eine universelle Eigenschaft des HCMV Transkriptoms schließen, die durch die cDNA-Bank bestätigt wird (Abb. 13 B-C; Tab. S2). Entsprechend verteilen sich 3'-coterminale Transkripte, die denen der Genregionen *UL32-30* (Ma *et al.*, 2013), *UL33-34* (Welch *et al.*, 1991), *UL37-36* (Tenney & Colberg-Poley, 1991), *UL57-54* (Smuda *et al.*, 1997), *UL83-82* (Ruger *et al.*, 1987), *UL93-99* (Wing & Huang, 1995), *UL119-115* (Leatham *et al.*, 1991), *UL131A-128* (Sun *et al.*, 2010), *UL139-141*, *UL142-145* (Qi *et al.*, 2011), *UL146-132* (Lurain *et al.*, 2006) und *US27-28* (Welch *et al.*, 1991) gleichen, über das gesamte Genom (Abb. 2.8). Durch alternative Transkriptionsstartpunkte ergeben sich auch für interne ORFs kodierende 3'-coterminale Transkripte, die größtenteils durch das *ribosome profiling* bestätigt wurden. Beispiele hierfür sind *UL26* (Stamminger *et al.*, 2002), *UL34* (Biegalka *et al.*, 2004), *UL35*

DISKUSSION

(Liu & Biegalka, 2002), *UL44* (Leach & Mocarski, 1989), *UL117* (Qian *et al.*, 2008) und *IRSI* (Romanowski & Shenk, 1997). Diese genetische Organisation erlaubt die Expression von Proteinvarianten, deren Funktion durch coterminale 3'-Enden ähnlich ist, aber durch spezifische N-terminale Enden eine Interaktion mit unterschiedlichen anderen Proteinen zulässt (Abb. 2.15 A-B; Prod'homme *et al.*, 2012). Die Nutzung verschiedener Transkriptionsstartpunkte und vermutlich alternativer Promotoren kann zum einen das Kodierungspotential erhöhen, aber auch die kontinuierliche Expression eines essentiellen Gens im Replikationszyklus sicherstellen, die sich an eine sich verändernde transkriptionelle Maschinerie angepasst hat. Die Komplexität 3'-coterminaler Transkripte erklärt sich demnach aus der Kompaktheit des viralen Genom. Ein weiterer möglicher Nutzen 3'-coterminaler mRNA-Strukturen ergibt sich aus Transkriptom-Analysen des Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV, HHV-8). Dieses ist in vielerlei Hinsicht vergleichbar mit dem HCMV Transkriptom, obwohl es sich um ein γ -Herpesvirus handelt. Das komplexe KSHV Genom zeichnet sich durch ein erweitertes Kodierungspotential aus, das sich aus uORFs (siehe unten), internen ORFs und ORFs mit nicht kanonischen Startcodons zusammensetzt. Ebenso treten lncRNAs, *antisense* Transkripte und insbesondere weit verbreitete 3'-coterminale kodierende Transkriptklassen diverser Genregionen auf (Arias *et al.*, 2014). Durch die 3'-coterminale Enden ergeben sich gemeinsame Bindestellen für miRNAs viralen Ursprungs in intergenetischen Regionen und in 3'-ORFs verschiedener Transkriptklassen einer Genregion (Bai *et al.*, 2014). Dies ermöglicht eine umfassende posttranskriptionelle Feinjustierung der KSHV Genexpression.

Die Komplexität des HCMV Transkriptoms äußert sich auch in der großen Anzahl möglicher kodierender ORFs, die sich auf den isolierten cDNAs wiederfinden (Abb. 2.11; Tab. S2). Inwiefern diese ORFs tatsächlich exprimiert werden, müssen weiterführende Experimente individueller Genregionen auf Proteinebene beispielsweise durch C-terminale Epitop-Markierungen oder Nachweise per Massenspektrometrie zeigen. Im Gegensatz zu dem hohen Kodierungspotential ist die Zahl der möglichen Poly(A)-Signale limitiert (Abb. 2.8). Dem erweiterten Kodierungspotential mit mehr als 700 ORFs stehen lediglich 164 Poly(A)-Signale (AATAAA) gegenüber. Alternative nicht kanonische Poly(A)-Signale, wie sie auch in humanen (Beaudoing *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2005) und KSHV Transkripten (Majerciak *et al.*, 2013) vorkommen, betreffen nur einen geringen Teil der HCMV Transkripte. Infolgedessen ist die Nutzung des gleichen Poly(A)-Signals üblich in vielen transkriptionellen

DISKUSSION

Klassen und 77% (einschließlich der lncRNAs sogar 81%) aller mRNAs tragen die genetische Information für mehr als nur einen ORF (Abb. 2.11; Tab. S2). Daraus ergibt sich die Frage, ob die Häufung von polycistronischen Transkripten lediglich aus der Knappheit von Poly(A)-Signalen entsteht oder ob sich diese auch zur Translation mehrerer ORFs von einer mRNA eignen. In Abhängigkeit von der zellulären Translationsmaschinerie ergibt sich grundsätzlich eine 5'-abhängige Initiation der Translation. Abweichend davon, ergeben sich aber mögliche Varianten dies zu umgehen und aus einem Transkript mehr als nur ein Genprodukt zu generieren. Die alternative Nutzung von Startcodons zur Erhöhung der Proteindiversität ist für diverse zelluläre und auch virale Gene, wie dem Gen der HSV Thymidinkinase, beschrieben (Haarr *et al.*, 1985; Liu *et al.*, 2000; O'Donovan & Baraban, 1999). Betrachtet man HCMV, deuten Translationsanalysen von Reportergenen und ausgewählten Genregionen darauf hin, dass von einem Transkript ausgehend bei nicht kanonischem Startcodon oder nicht optimaler Kozak-Sequenz durch *leaky scanning* auch mehrere Proteine exprimiert werden können (Stern-Ginossar *et al.*, 2012; Tenney & Colberg-Poley, 1991). Die Nutzung nicht kanonischer Startcodons ist hierbei häufig eine Eigenschaft der neu definierten ORFs. Gleichwohl ist *leaky scanning* auch in einem optimalen Startcodon-Kontext eingeschränkt möglich (Wang & Rothnagel, 2004).

Kurze uORFs können die Translation des *downstream* ORFs positiv oder negativ beeinflussen (Wang & Rothnagel, 2004; Yaman *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass fast 40% der humanen mRNAs mindestens einen uORF oder ein *upstream* Startcodon enthalten, zeigt die Bedeutung in der post-transkriptionellen Genregulation auf (Rogozin *et al.*, 2001). Inklusiv dem *UL4* Transkript (Abb.2.15 A) weisen 14,2% der HCMV Transkripte solche 66 bp bis 156 bp großen uORFs auf, deren mechanistische Bedeutung für die Expression des *downstream* Gens mit Ausnahme von *UL4* ungenügend untersucht ist. Vergleichbare uORFs *upstream* von *UL54* (*ORFL145C.iORF2*, *ORFL145C.iORF1*, *ORF144C*) und *UL32* (*rORF64*) sowie ein kurzer ORF der lncRNA2.7 (*rORF5*), die laut *ribosome profiling* exprimiert werden, können entweder einen neutralen (Biegalka & Geballe, 1990) oder einen negativen Effekt (Geballe & Mocarski, 1988) auf die Expression eines *downstream* Reportergens haben. Weiterführende Translationsanalysen von Reportergenen haben gezeigt, dass uORFs mit nicht kanonischen Startcodons *upstream* von *US9* und *UL119* die *downstream* Expressioneffizienz modulieren (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Nach Translation eines kurzen ORFs und einer relativ kurzen intercistronischen Sequenz kann die 40S Untereinheit auch mit der mRNA assoziiert bleiben

DISKUSSION

und die Translation an einem *downstream* AUG reinitiiieren (Jackson *et al.*, 2012). Dies ist sogar in bis zu vier aufeinanderfolgenden uORFs zu einem gewissen Anteil möglich (Wang & Rothnagel, 2004). Kurze uORFs sind auch in KSHV Transkripten weit verbreitet (Arias *et al.*, 2014). Ein bicistronisches KSHV Transkript, das für *ORF35* und *ORF36* kodiert, enthält zwei uORFs, *uORF1* und *uORF2*. Während die Translation von *uORF1* die Expression beider *downstream* ORFs inhibiert, ermöglicht die Translation von *uORF2* erst eine Expression von *ORF36* durch Reinitiation der Ribosomen bemerkenswerterweise nach 332 Basenpaaren, die zwischen beiden ORFs liegen (Kronstad *et al.*, 2013; 2014). Die exakte Sequenz der uORFs ist dabei nebensächlich. Demnach sind die resultierenden Genprodukte der uORFs im Gegensatz zum Mechanismus des *UL4* uORF zumindest für die Regulation der *downstream* ORFs nicht von Bedeutung. Die regulatorische Wirkung ergibt sich schon aus der Translation der uORFs und definiert den 5'-Cap-abhängigen bicistronischen Charakter des Transkripts. Durch einen ähnlichen Mechanismus regulieren zwei uORFs die Zellstress-abhängige Expression des zellulären Gens *ATF4* (Vattem & Wek, 2004). Bemerkenswerterweise finden sich mehrere aufeinanderfolgende uORFs ebenfalls in HCMV Transkripten (Abb. 2.15 C-D).

Translation von IRES Elementen der RNA-Viren findet unabhängig vom 5'-Cap statt. Allerdings sind IRES Strukturen auch in einigen zellulären Transkripten mit entsprechendem 5'-Cap enthalten, wobei dem 5'-Cap eine RNA-stabilisierende Funktion zukommt (Fitzgerald & Semler, 2009). In DNA-Viren sind identifizierte IRES Elemente eher unüblich. Die Expression von KSHV vFLIP (*viral FLICE inhibitory protein*) wird über ein IRES Element bestimmt (Bieleski & Talbot, 2001; Grundhoff & Ganem, 2001; Low *et al.*, 2001). Bemerkenswerterweise ist diese IRES innerhalb der kodierenden Region des *upstream* Gens v-Cyclin und nicht in einer 5'-UTR lokalisiert. Vergleichbar befindet sich eine potentielle HCMV IRES, die eine Expression von *UL138* kontrolliert, *upstream* innerhalb von *UL136* und weist eine hohe Sekundärstruktur auf (Grainger *et al.*, 2010). Die *UL138* IRES ist eIF4G-abhängig wie die KSHV IRES (Othman *et al.*, 2014) und ähnelt somit eher zellulären IRESs im Gegensatz zu den eIF4G-unabhängigen IRES Elementen der RNA Viren. Außerdem ist die Translation des Epstein-Barr-Virus (EBV) EBNA1 (*EBV nuclear antigen 1*) Proteins (Isaksson *et al.*, 2003), des γ -Herpesvirus 68 Proteins MK3 (Coleman *et al.*, 2003) sowie der beiden *Marek's disease virus* (MDV) Proteine RLORF9 (Tahiri-Alaoui *et al.*, 2009b) und pp14 (Tahiri-Alaoui *et al.*, 2009a) reguliert durch eine IRES.

DISKUSSION

Weitere grundsätzliche virale Strategien umfassen das *ribosome shunting* und das *frameshifting* (Firth & Brierley, 2012). Diesbezüglich liegen jedoch keine CMV- oder Herpesviren-spezifischen experimentellen Analysen vor. *Shunting* ist im Gegensatz zur IRES ein 5'-Cap abhängiger Prozess, in dem die 40S Untereinheit größere häufig sekundärstruktureiche Bereiche der mRNA überspringt und erst dann mit der Translation einsetzt. Bei überlappenden ORFs ist ein *frameshifting* zur Expression des *downstream* ORFs möglich, wie es bei Expression des HIV Gag-Pol Polyproteins auftritt.

Insgesamt unterstützt das Auftreten von mRNAs, die spezifisch für neu definierte ORFs kodieren, die Ergebnisse von Stern-Ginossar *et al.* (2012) und die postulierte erweiterte Kodierungskapazität des HCMV Genoms. Auch wenn der Nachweis auf mRNA Ebene keine Aussage über deren tatsächliche Translation zulässt, setzen die häufige Positionierung dieser ORFs am 5'-Ende der mRNA (27,4%; Abb. 2.14 A) und exklusiv für neu identifizierte ORFs kodierende Transkripte (9,4%, Abb. 2.14 B) zumindest die Voraussetzungen einer Expression. Die daraus resultierende Proteinvielfalt wird zusätzlich erweitert durch alternatives Spleißen der Primärtranskripte. Insgesamt 23,6% der untersuchten Transkripte enthielten Spleißstellen. Die Identifikation zusätzlicher Spleißstellen zeigt, dass Spleißen noch häufiger vorkommt als bisher angenommen (Tab. 2.2).

Einen erwarteten hohen Anteil der cDNA-Bank nehmen nicht kodierende Transkripte ein. Es ist zwar möglich, dass nicht kodierenden Transkripten keine Funktion zukommt und diese dem Scannen der Ribosomen nach Startcodons entsprechend nur ein Hintergrundrauschen der allgemeinen Transkription darstellen, es erscheint aber aus evolutionärer Sicht unwahrscheinlich. Vergleichsweise werden nur 2% des humanen Genoms zur Proteinexpression genutzt, während dem überwiegenden Anteil an RNAs kein Kodierungspotential zugeschrieben wird (Birney *et al.*, 2007). Dazu zählen nicht nur kleine *housekeeping* RNAs wie tRNAs, rRNAs, snRNAs oder snoRNAs, sondern auch lncRNAs. Diese lncRNAs besitzen ein 5'-Cap, können gespleißt sein, sind polyadenyliert und ähneln somit stark mRNAs. Ungefähr 6700 lncRNAs sind zurzeit im humanen Genom identifiziert (Jia *et al.*, 2010), deren phylogenetische Konservierung für eine funktionelle Bedeutung spricht (Ponjavic *et al.*, 2007). Bekannte lncRNA Funktionen umfassen die Regulation von Transkriptionsfaktoren (Martianov *et al.*, 2007) und epigenetische Modifikationen (Rinn *et al.*, 2007). Nicht kodierende RNAs fungieren auch als *scaffold* in verschiedenen nukleären Strukturen, die die Akkumulation spezifischer Proteine kontrollieren (Mao *et al.*, 2011;

DISKUSSION

Shevtsov & Dundr, 2011). In 40% der zellulären lncRNAs wurden Veränderungen im Expressionsniveau nach Infektionen von Maus-adaptierten SARS-Coronaviren und Inflenzaviren beobachtet, die dem Expressionsprofil nach IFN- β Behandlung ähneln (Peng *et al.*, 2010). Dies deutet auf eine mögliche Rolle bei der Immunantwort hin. Insofern wäre eine Kompetition der HCMV lncRNAs mit den zellulären lncRNAs insbesondere in Anbetracht ihrer Abundanz vorstellbar.

Am Beispiel der lncRNA2.7 soll die Schwierigkeit erläutert werden, die Funktion von lncRNAs aufzuklären. Einem hohen Selektionsdruck entsprechend ist die lncRNA2.7 Sequenz nicht nur in HCMV Laborstämmen, sondern auch in klinischen Isolaten hoch konserviert (>99%; McSharry *et al.*, 2003). Eine Publikation beschreibt die lncRNA2.7 als einen Inhibitor der Mitochondrien-vermittelten Apoptose (Reeves *et al.*, 2007). Aufgrund ihrer Abundanz könnten solche RNAs einen hohen Sättigungsgrad der Mitochondrien erreichen. Außerdem wäre eine schnelle Wirkung ohne vorausgehende Translation sichergestellt. Im Gegensatz zu einer Funktion auf RNA-Ebene, aber in Übereinstimmung mit der Assoziation von lncRNA2.7 mit Polysomen (Lord *et al.*, 1989), werden viele kurze ORFs postuliert, von denen zwei per Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnten (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Widersprechende Daten stellen eine Ribosomen Belegung von lncRNAs fest, die denen von klassischen nicht kodierenden RNAs, wie snRNAs, snoRNAs, miRNA Vorläufern und 5'-UTRs, entspricht (Guttman *et al.*, 2013). Jedoch zeigen die Ribosomen *footprints* von lncRNAs auch weitere Markenzeichen der Translation, wie eine Kopräzipitation mit 80S Ribosomen und eine Reaktion auf Inhibitoren der Translationselongation, die sich von nicht-ribosomalen RNA-Protein Komplexen auf klassischen nicht kodierenden RNAs unterscheidet (Ingolia *et al.*, 2014). In dem Fall könnte die Expression jedoch nur von dem mit einem 5'-Cap ausgestatteten Anteils der lncRNA2.7 erfolgen (Abb.2.20). Derartige sehr kleine Proteine sind zwar ungewöhnlich, aber auch von den *Drosophila pri* und *scl* RNAs, die zuvor als nicht kodierend angesehen wurden, werden lediglich 11 bis 32 Aminosäuren große Genprodukte exprimiert, denen eine entscheidende Bedeutung in der Embryogenese und der Muskelkontraktion zukommt (Galindo *et al.*, 2007; Kondo *et al.*, 2007; Magny *et al.*, 2013). Bezeichnenderweise sind die Zahl kleiner Peptide und deren charakterisierte Funktionen ständig ansteigend (Andrews & Rothnagel, 2014; Ladoukakis *et al.*, 2011). Auch KSHV Transkripte, die zuvor als nicht kodierend bezeichnet wurden, zeigen im *ribosome profiling* vergleichbar mit den HCMV lncRNAs eine Translation

DISKUSSION

von Peptiden kleiner als 100 Aminosäuren (Arias *et al.*, 2014). Die Frage, ob diese sehr kleinen Proteine eine Funktion haben oder eine rasche Degradation eintritt, ist gegenwärtig offen. Gleichwohl würde dies das immunologische Repertoire der infizierten Zellen verändern, da MHC-I gebundene Peptide mit größerer Effizienz aus schnell degradierten Polypeptiden generiert werden (Yewdell, 2011). In der Tat ließ sich die Aktivierung von T-Zellen HCMV-positiver Donoren nach Stimulation mit Peptiden der lncRNA2.7 nachweisen (Ingolia *et al.*, 2014). Dies zeigt die natürliche Exposition mit diesen Translationsprodukten nach HCMV Infektion. Außerdem kann über eine Rolle dieser Polypeptide in der Regulation der mRNA Stabilität durch *nonsense mediated decay* (Schoenberg & Maquat, 2012) oder als Proto-Proteine in der Evolution neuer Proteine spekuliert werden (Carvunis *et al.*, 2012).

Falls tatsächlich keine Proteine kodiert werden, bedeutet dies nicht, dass diesen RNAs keine Funktion zukommt. Einige Viren haben RNA-basierende Immunevasionsstrategien entwickelt, die PKR und den IFN-Signalweg inhibieren. Adenovirus VA RNAs und EBV EBER RNAs sind kleine nicht kodierende, allerdings auch nicht polyadenylierte RNAs, die eine PKR Aktivierung verhindern (Burgert *et al.*, 2002; Clemens *et al.*, 1994). Eine regulatorische Funktion der überwiegenden nicht kodierenden RNAs von HCMV hinsichtlich einer Aktivierung des IFN- α oder IFN- γ Signalwegs konnte jedoch nicht festgestellt werden (Masterarbeit M. Preuten, 2013; unpublizierte Beobachtungen A. Zimmermann, HHU Düsseldorf). Weitere virale RNAs, deren Funktion auf Transkript-Ebene liegt, sind HSV-1 LAT (Perng *et al.*, 2000) und KSHV PAN (Rossetto & Pari, 2014). Drei oriLyt assoziierte nicht kodierende HCMV RNAs, SRT (*smallest replicator transcript*), vRNA-1 und vRNA-2, sind aufgrund fehlender Polyadenylierung nicht Bestandteil der cDNA-Bank (Huang *et al.*, 1996; Prichard *et al.*, 1998). Die lncRNA4.9 zeigt eine Interaktion mit den Chromatin remodellierenden Komponenten des PRC2 (*polycomb repression complex 2*) Systems und der MIEP Region in CD14⁺ Monozyten (Rossetto *et al.*, 2013). Auf diese Weise könnte lncRNA4.9 vermutlich die Genexpression während der Latenz steuern.

Eine Sonderstellung nimmt das *UL144-145* Transkript ein, da es kodierende und nicht kodierende Eigenschaften vereint. Zwischen den funktionellen ORFs *UL144* und *UL145* (Poole *et al.*, 2006; Stern-Ginossar *et al.*, 2012) enthält das Transkript ein *miRNA decay element* (miRDE), das sequenzspezifisch die Degradation der zellulären miRNAs miR-17 und miR-20a einleitet (Lee *et al.*, 2013). Die Degradation dieser miRNAs beschleunigt die Virus Produktion. Vergleichbare miR-27 degradierende miRDEs bestehen in der HSUR1 RNA von

DISKUSSION

Herpesvirus saimiri (Cazalla *et al.*, 2010) und im MCMV m169 Transkript (Libri *et al.*, 2012; Marcinowski *et al.*, 2012).

Eine zweite Klasse nicht kodierender Transkripte, die *antisense* Transkripte, sind weit verbreitet im humanen Transkriptom, aber auch in viralen Transkriptomen, wie dem von HSV (Chen *et al.*, 2004; Kozak & Roizman, 1975; Zhang *et al.*, 2006). Auch im HCMV Genom ist die Transkription in *antisense* Orientierung in den meisten Genregionen üblich (Gatherer *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007). Über eine Funktion der HCMV *antisense* Transkripten kann nur gemutmaßt werden. Die offensichtlichste Funktion liegt in der Regulation der *sense* Gegenstücke. Dies kann auf transkriptioneller Ebene durch transkriptionelle Interferenz oder *remodeling* des Chromatins und posttranskriptionell durch eine veränderte RNA Prozessierung oder eine eingeschränkte Translation erfolgen (Wight & Werner, 2013). Interessanterweise kann die Bindung von *antisense* RNA auch zur Stabilität von mRNA beitragen, indem die transiente RNA-Duplex eine Degradation durch RNasen verhindert (Faghihi *et al.*, 2008) oder Bindestellen für miRNAs maskiert werden (Faghihi *et al.*, 2010). Letzteres ist beispielweise bei IFN- α 1 mRNA der Fall und erhöht die IFN- α 1 Protein Produktion (Kimura *et al.*, 2013). Einige *antisense* Transkripte könnten auch als Vorläufer von miRNAs dienen. HCMV exprimiert 13 im Genom verteilte pre-miRNAs, die in 24 maturen miRNAs resultieren und regulierend auf zelluläre und virale Ziel-mRNAs wirken (Hook *et al.*, 2014). Keines der *antisense* Transkripte der cDNA-Bank entspricht jedoch den bisher identifizierten miRNAs.

Eine extensive Überlappung von kodierenden RNAs wird als unüblich betrachtet. Die Identifizierung des proteinkodierenden *UL150A*, der komplett *antisense* zu *UL150* lokalisiert ist (Gatherer *et al.*, 2011) und die *ribosome profiling* Daten (Stern-Ginossar *et al.*, 2012) hinterfragen dies. LUNA (*latency unique natural antigen*), dem Genprodukt eines Latenz-assoziierten *UL81-82 antisense* Transkripts des *UL82* Gens, das für das Tegumentprotein pp71 kodiert, wird eine Rolle in der Etablierung der Latenz und der Reaktivierung zugeordnet (Bego *et al.*, 2005; Keyes *et al.*, 2012). Betrachtet man die *antisense* Transkripte der cDNA-Bank, erscheint abhängig vom Transkript sowohl die Regulation der *sense* RNA (Tab. S2, EE704, ML28) oder eine unabhängige Expression neuer ORFs (Tab. S2, ME17, EE10, EE14) möglich. Vergleichbar mit HCMV besteht das KSHV Transkriptom aus vielen überlappenden *sense-antisense* RNA-Paaren. Zwei *antisense* KSHV Transkripte des RTA Gens regulieren

DISKUSSION

nicht die RTA Genexpression, sondern kodieren kleine Oligopeptide mit 17-48 Aminosäuren (Xu & Ganem, 2010).

Auffälligstes Merkmal der cDNA-Bank von Zhang *et al.* (2007) ist der mit 55% sehr hohe Anteil von Transkripten in *antisense* Orientierung zu kodierenden Regionen im Vergleich zu lediglich 6,6% in der 5'-Cap selektionierten cDNA-Bank. Generell weisen *antisense* Transkripte ein 5'-Cap und eine Polyadenylierung auf (Wight & Werner, 2013), jedoch gibt es Poly(A)-negative Ausnahmen (Kiyosawa *et al.*, 2005). Tatsächlich ist in einigen *antisense* Transkripten von Zhang *et al.* (2007), die an einem genomischen Poly(A)-Trakt enden, das 3'-Ende der Transkripte ungewiss. Zudem resultieren die hohen Werte von *antisense* Transkripten aus veralteten ORF Definitionen. Beispielsweise werden *UL3* und *UL12* nicht mehr als funktionelle ORFs angesehen. Dementsprechend würden *UL3as-UL4-6*, *UL12as-UL13* und weitere Transkripte nicht mehr in diese Kategorie fallen. Auch *lncRNA2.7* und *lncRNA1.2* Transkripte wurden aufgrund ihrer Orientierung zu den veralteten ORF Definitionen von *RL2-3* und *RL8* als *antisense* gekennzeichnet. Dementsprechend sind 48% der von Zhang *et al.* (2007) als *antisense* beschriebenen Transkripte nicht gegenüber einem kodierenden ORF lokalisiert. Von vielen dieser *antisense* Transkripte (24%) konnte auch keine *sense* RNA ermittelt werden, sodass die *antisense* Orientierung als bevorzugte Transkriptionsrichtung angesehen werden muss. Außerdem ist bei einem kompakten Genom, wie dem von HCMV, eine Überlappung an 5' oder 3'-UTRs der Transkripte unausweichlich, aber nicht zwangsläufig *antisense* im Sinne der zuvor beschriebenen regulatorischen Funktionen hinsichtlich des *sense* Gens. Beispielsweise ist in dem *UL72as-UL73* Transkript der cDNA-Bank der *UL72as* Anteil des Transkripts eher als 5'-UTR oder als regulatorisches Element des *downstream* ORFs *UL73* zu sehen (Abb. 2.15 D; EL189). Bei Berücksichtigung solcher kodierender *antisense* Transkripte entspricht der *antisense* Anteil der cDNA-Bank mit 27% tatsächlich ziemlich genau dem oben beschriebenen korrigierten Wert von Zhang *et al.* (2007).

3.2 Die cDNA-Bank als Instrument zur Entschlüsselung von HCMV Genfunktionen

Als Resultat der HCMV Transkript-Komplexität ist die Gen-Funktionszuordnung durch die Analyse von Deletionsmutanten erschwert. Häufig ist bei Deletionen des HCMV Genoms

DISKUSSION

nicht nur ein ORF betroffen und es ist eine größere Aufmerksamkeit bei der gezielten Konstruktion dieser Deletionen vonnöten. Deshalb erscheint für genomweite Studien ein *gain of function* Ansatz sinnvoller. Die relativ große Anzahl von *knockout* oder *knockdown* Studien im Vergleich zu *gain of function* Ansätzen zur Identifikation der Funktion von HCMV Genen spiegelt sich auch in der Schwierigkeit wider, verlässlich *full length* Transkripte zu klonieren. Die 5'-Selektion der cDNAs und die Klonierung mit Hilfe der Gateway Technologie umgeht dieses Problem. Im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden der cDNA-Bank Produktion werden ausschließlich *full length* Klone hergestellt (Abb. 2.4). Neben den untersuchten zellulären Transkripten der cDNA-Bank bestätigen Northern Blot Analysen isolierter RNA aus infizierten MRC-5 Zellen die korrekte Größe der cDNAs (Bachelorarbeit Nadine Müller, 2015). Untersucht wurden mRNAs aus den Genregionen *UL33-34*, *UL36*, *UL40-44*, *UL91-95* und *US18-20* mit Sonden, die vor dem jeweiligen Poly(A)-Signal binden. Dabei konnten mRNAs in den entsprechenden Größen der cDNA Konstrukte mit Ausnahme der 0,9 kb *UL36* cDNA identifiziert werden. Zusätzliche mRNAs, die in der Länge von den isolierten Einzelklonen abweichen, deuten eine noch größere Komplexität an. Die variierenden Transkriptlängen in einzelnen Genregionen sind somit nicht als Artefakte der cDNA-Synthese zu werten, sondern entspringen alternativen Startpunkten der Transkription oder dem Spleißen. Die Gateway Rekombination erlaubt eine effiziente und schnelle Überführung der cDNA-Bank in andere Vektoren (Abb. 2.24; Hartley *et al.*, 2000), die alternative Screening oder Analysemethoden erlauben. Beispielsweise existiert eine Reihe von Gateway-kompatiblen Vektoren, die den Austausch von Promotoren und Selektionsmarkern ermöglichen (Campeau *et al.*, 2009). In diesem Fall erforderte die Zeitspanne des FACS-basierenden Screenings eine stabil anhaltende Expression der cDNA-Bank. Lentivirale Vektoren und Partikel haben sich als effiziente Transportmittel für Transgene in verschiedenste Zelltypen erwiesen (Matrai *et al.*, 2010). Der hergestellte pMACE Vektor enthält die lentiviralen Elemente, um eine optimale Virus Produktion und Transgen Expression in den Zielzellen sicherzustellen.

Der HCMV MIEP Promotor im lentiviralen Vektor sichert eine starke konstitutive Expression des Transgens. Abhängig vom Transgen oder der Zelllinie kann die Promotorstärke jedoch variieren (Qin *et al.*, 2010; Skalamera *et al.*, 2011). In RPE Zellen ist eine ausreichend starke Expression der transduzierten cDNAs sichergestellt (Abb. 2.27). Als Alternative bietet sich der EF1 α Promotor an, der sich für cDNA-Banken und verschiedenste Transgene als stabiler

DISKUSSION

langzeitaktiver Promotor erwiesen hat, jedoch im Vergleich zum MIEP in einigen Zelllinien eine schwächere Expression des Transgens zur Folge hat (Mao *et al.*, 2008; Skalamera *et al.*, 2011). Eine Subklonierung der cDNA-Bank in einen entsprechend modifizierten lentiviralen Vektor ist mittels Gateway problemlos möglich.

Die Länge der HCMV Transkripte liegt in der Mehrheit zwischen 1 kb und 4 kb (Abb. 2.7), aber auch 10 kb Transkripte können produziert werden (Ma *et al.*, 2012; Wing & Huang, 1995). Es stellt sich die Frage, inwiefern stark vom natürlichen lentiviralen Genom abweichende cDNA-Vektor Konstrukte erfolgreich in lentivirale Partikel verpackt werden können. Bis zu einer Insertgröße von 3,5 kb konnte kein größenabhängiger Unterschied im Virustiter ermittelt werden (Skalamera *et al.*, 2011). Bei größeren Inserts fällt der virale Titer mit steigender Vektorlänge (Kumar *et al.*, 2001). Es existiert aber kein absolutes Verpackungslimit. Selbst eine provirale RNA von 17,5 kb wurde verpackt. Der pMACE Vektor (7,7 kb) bietet somit Platz für annähernd 10 kb cDNA. Betroffen von einem vermutlich geringeren Virustiter wären lediglich 7,5% der viralen Konstrukte (Tab. S2). Neben der Insertgröße ist der Virustiter auch abhängig von den eingefügten kodierenden Sequenzen. Betrachtet man humane Gene, betrifft dies in der Regel mitochondriale Proteine oder Genprodukte, die mit Apoptose in Verbindung gebracht werden (Skalamera *et al.*, 2012). Jedoch kann auch eine Überexpression unter Umständen cytotoxisch wirken, selbst wenn das Genprodukt per se nicht cytotoxisch ist. Eine durch Überexpression induzierte Cytotoxizität betrifft häufig Gene, die unter normalen Umständen konstitutiv exprimiert werden (Vavouri *et al.*, 2009). Dies spricht für eine cytotoxische Wirkung der Gendosierung und gegen eine intrinsische Cytotoxizität. Vergleichbar scheint das MCMV Genprodukt von M27 bei Überexpression eine cytotoxische Wirkung zu haben (persönliche Kommunikation M. Trilling, Universität Duisburg-Essen), weist im Replikationsverlauf jedoch eine durchgängige Expression auf (Zimmermann *et al.*, 2005). Es ist nicht auszuschließen, dass aufgrund einer derartigen Cytotoxizität im FACS Screening nach IFN-Antagonisten kein viraler Kandidat identifiziert werden könnte. Auch miRNAs oder andere RNAs ohne 5'-Cap und Polyadenylierung, die aufgrund der gewählten Art der cDNA-Synthese in der cDNA-Bank fehlen, kommen als mögliche IFN- γ Antagonisten in Frage. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die Inhibition der IFN Signalkaskade aufgrund einer synergistischen Wirkung mehrerer Genprodukte erfolgt, deren cDNAs nicht gleichzeitig innerhalb einer transduzierten Zelle exprimiert wurden.

DISKUSSION

Trotzdem liefert die cDNA-Bank eine das HCMV Transkriptom umfassende Analysemöglichkeit. Insgesamt weist die cDNA-Bank nicht die bereits erwähnten Nachteile der zuvor publizierten cDNA-Banken auf (Ma *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007). Bedeutende immunregulatorische Genprodukte wie US2 und UL40, die zum gewählten Zeitpunkt ein geringes Expressionsniveau aufweisen und nicht in den bisherigen cDNA-Banken vertreten waren, konnten im Southern Blot, mittels PCR und als Einzelklone nachgewiesen werden (Abb. 2.5; Abb. 2.9; Tab. S2). Dies lässt auf die Existenz wenig abundanter mRNAs in der cDNA-Bank schließen. Außerdem konnte durch 5'-Cap Selektion nicht nur der Anteil an *full length* Transkripten erhöht, sondern auch der Anteil an nicht kodierenden Transkripten erheblich reduziert werden. Im Gegensatz dazu führt die von Ma *et al.* (2011) verwendete SMART Klonierung zu einer äußerst hohen Anzahl von 5'-verkürzten cDNAs (Bachelorarbeit M. Preuten, 2011) Die Klonierung von *full length* Klonen ist somit nicht sichergestellt und ein vorzeitiger cDNA-Strangabbruch kann nicht ausgeschlossen werden. Zumindest 18% der Klone (Ma *et al.*, 2011) weichen vom erwarteten 5'-Ende der mRNA ab. Eine Aussage, inwiefern diese Klone alternativen Startpositionen der Transkription oder Artefakten während der cDNA-Synthese entstammen, ist entsprechend schwierig. Die relativ gleichmäßige Streuung von cDNA-5'-Enden deutet jedoch eher auf eine statistische Verteilung durch Strangabbrüche hin.

Neben der Qualität der Transkripte spricht die mangelnde Möglichkeit eines ausgedehnten funktionellen Screenings gegen die publizierten cDNA-Banken. Die von Zhang *et al.* (2007) verwendeten Klonierungsvektoren erlauben nur eine transiente Expression der cDNAs. Im Fall des pSMART Vektors wären sogar aufwendige Subklonierungen in einen Expressionsvektor für Analysen auf Proteinebene erforderlich. Eine HCMV ORF-Bank (Salsman *et al.*, 2008), die auf der Klonierung einzelner ORFs in Expressionsvektoren beruht, erlaubt zwar die Analyse der jeweiligen ORFs, ist jedoch mehr als unvollständig, da mehr als 500 virale Genprodukte außer Acht gelassen werden. Demgegenüber weisen 27,4% der Transkripte der cDNA-Bank einen dieser neu identifizierten ORFs am 5'-Ende der cDNA auf (Abb. 2.14 A). Auch von den etablierten ORFs fehlen 67 in der ORF-Bank, von denen 31 entweder in den Einzelklonen oder den PCR-Analysen der cDNA-Bank nachgewiesen wurden. Zudem verändert die gewählte C-terminale SPA-Markierung in einigen Fällen die Lokalisation und damit einhergehend vermutlich die Funktion des Fusionsprodukts (Salsman *et al.*, 2008). In einem alternativen Screening-Ansatz, der auf der proteasomalen Degradation

DISKUSSION

eines Fusionsprodukts von Jak1 und eines Selbstmordgens beruht, konnte ein HCMV Gen der transduzierten cDNA-Bank als ein möglicher Kandidat ermittelt werden, der eine Jak1 Degradation vermittelt (persönliche Kommunikation S. Howe, Universität Duisburg-Essen). Interessanterweise war das betroffene Gen nicht Bestandteil der ORF-Banken, die zeitgleich untersucht wurden. Dies zeigt, dass sich die cDNA-Bank durchaus zur Identifikation von viralen Genen in einem funktionellen Screening eignet. Dementsprechend ergibt sich auch die Möglichkeit eines FACS-Screenings der transduzierten cDNA-Bank nach HCMV Genen, deren Genprodukte die Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche modulieren. Neben den Inhibitoren der MHC Klasse I und II existieren weitere bisher nicht identifizierte Genprodukte, die die Expression zellulärer Oberflächenproteine nach HCMV Infektion auf transkriptioneller Ebene oder posttranskriptionell verändern. Zu diesen Oberflächenproteinen zählen das Adhäsionsmolekül CD90/Thy-1 (Leis *et al.*, 2004), die Komplement-Regulatoren CD46 und CD50 (Spiller *et al.*, 1996) sowie die Aminopeptidasen CD10 und CD13 (Phillips *et al.*, 1998).

3.3 Stathmin-1 – mehr als nur ein Regulator der Mikrotubuli-Organisation?

Das Screening nach viralen IFN- γ Antagonisten lieferte überraschenderweise zelluläre Kandidaten, die HLA-DR als FACS-Marker der IFN- γ Signaltransduktion positiv und negativ beeinflussen können. In sukzessiven FACS-Sortierungsrunden wurden Stathmin-1 exprimierende Zellen aufgrund niedriger HLA-DR Oberflächenexpression nach IFN- γ Stimulation aus dem cDNA-Pool transduzierter Zellen angereichert. Mit einer Inhibition der IFN- γ Signaltransduktion übereinstimmend, zeigten Stathmin-1 überexprimierende Zellen keine Induktion von IDO oder STAT1 Phosphorylierung nach IFN- γ Zugabe. Transiente Überexpression von Stathmin-1 beeinflusst die IFN- γ induzierte HLA-DR Expression ebenfalls negativ, auch wenn die Inhibition im Vergleich zur lentiviralen Transduktion von Stathmin-1 und zum Modell-IFN-Antagonisten SeV C schwächer ausfällt. Im Fall eines konstitutiv exprimierten Proteins wie Stathmin-1 ist auch eher von einer Feintuning des IFN-Signalwegs unter bestimmten Umständen als von einer kompletten Inhibition, wie es nach Virusinfektion vonnöten ist, auszugehen. Dies liefert möglicherweise eine Erklärung für die zusätzliche Zahl an Sortierungsrunden bis zur Aufreinigung der Stathmin-1 exprimierenden

DISKUSSION

Subpopulation (Abb. 2.35) im Vergleich zu der anfänglichen Etablierung der Methode durch Sortierung SeV C exprimierender Zellen (Abb. 2.32 A). Alternativ wäre auch denkbar, dass ein geringerer Anteil an Stathmin-1 cDNA in der cDNA-Bank den Prozess verlängerte. Da Stathmin-1 als Onkoprotein beschrieben ist (siehe unten), das den Zellzyklus reguliert (Belletti & Baldassarre, 2011; Curmi *et al.*, 1999), könnten sich auch durch eine begünstigte Proliferation Stathmin-1 exprimierende Zellen angereichert und andere Kandidatengene verdrängt haben. Dies verdeutlicht die Bedeutung einer unabhängigen Validierung der Stathmin-1 vermittelten IFN- γ antagonistischen Wirkung durch die Transfektion von pIRES-STMN1, die eine Inhibition der IFN- γ induzierten HLA-DR Expression bestätigt (Abb. 2.41). Nach Selektion auf transduzierte Zellen mit hoher HLA-DR Expression konnte eine PQLC2 (*PQ-loop repeat containing 2*) exprimierende Zellpopulation isoliert werden. Diese weisen entweder eine konstitutiv erhöhte HLA-DR Oberflächenexpression oder einen verlangsamten Turnover der HLA-DR Moleküle aus der vorausgegangenen IFN- γ Stimulation auf.

In beiden Fällen, Stathmin-1 und PQLC2, besteht laut Literatur kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Proteinfunktion und einer Regulation des IFN- γ Signalwegs oder der Präsentation von MHC-Klasse II Molekülen. PQLC2 ist ein lysosomaler Transporter der kationischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin (Jezegou *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Die wenig charakterisierte Familie von *PQ-loop* Proteinen wird definiert durch Cystinosin (PQLC4), einen lysosomalen Cystin Transporter (Kalatzis *et al.*, 2001; Town *et al.*, 1998). *PQ-loop* Proteine besitzen sieben helicale Transmembrandomänen und ein dupliziertes Motiv, den *PQ-loop*, dem eine für den Transport-Mechanismus essentielle Funktion zugeschrieben wird (Ruivo *et al.*, 2012).

Stathmin-1 (vom griechischen *stathmos* = Relais) oder Onkoprotein 18 (Op18) wurde ursprünglich als ein durch zahlreiche Stimuli wie Wachstumsfaktoren und Hormone induzierbares Phosphoprotein identifiziert (Sobel & Tashjian, 1983), das in Leukämiezellen stark überexprimiert ist (Hanash *et al.*, 1988). Die Reduktion der Stathmin-1 Expression hebt den transformierenden Phänotyp von Leukämiezellen auf (Jeha *et al.*, 1996). Obwohl in Stathmin-1 *knockout* Mäusen zunächst kein aberranter Phänotyp beobachtet wurde (Schubart *et al.*, 1996), tritt eine altersbedingte Axonopathie im zentralen und peripheren Nervensystem auf (Liedtke *et al.*, 2002). Außerdem wurde eine Dysregulation der Angstkontrolle und Gefahrenerkennung in Stathmin-1 defizienten Mäusen beobachtet (Martel *et al.*, 2012; Shumyatsky *et al.*, 2005). Am besten charakterisiert ist Stathmin-1 als ein Inhibitor der

DISKUSSION

Mikrotubulipolymerisation (Belmont & Mitchison, 1996). Stathmin-1 ist in punktuellen Spots im Cytoplasma und während der Mitose an den Spindelpolen lokalisiert (Gavet *et al.*, 1998). Während Stathmin-1 in den meisten, wenn nicht allen, proliferierenden Zellen und Neuronen exprimiert wird (Rowlands *et al.*, 1995), ist die Expression verwandter Proteine auf das Nervensystem beschränkt (Ozon *et al.*, 1997). Dazu zählen SCG10, SCLIP und RB3 mit zwei Spleißvarianten RB3' und RB3'', die eine C-terminale SLD (*stathmin-like domain*) Domäne hoher Homologie teilen (Cassimeris, 2002). Dementsprechend ist jedes dieser Proteine in der Lage, Mikrotubuli zu destabilisieren (Charbaut *et al.*, 2001). Auf molekularer Ebene bindet Stathmin-1 an zwei Tubulin Moleküle und inhibiert eine Polymerisation entweder durch Sequestration der freien Tubuline oder durch die Induktion einer Depolymerisation, die als Mikrotubuli-Katastrophe bezeichnet wird (Belmont & Mitchison, 1996; Curmi *et al.*, 1997; Howell *et al.*, 1999). Phosphorylierungen der zwei Stathmin-1 Spleißvarianten, α und β , finden an vier Serinen (Ser16, Ser25, Ser38 und Ser63) statt und verhindern in verschiedenen Kombinationen die Tubulin-Bindung, wodurch die Mikrotubuli destabilisierende Wirkung inaktiviert wird (Cassimeris, 2002). Es ist nicht klar, inwiefern die multiplen Kombinationen der Phosphorylierungen für die Weiterleitung individueller Stimuli erforderlich sind, aber der hohe Grad der Spezifität der Phosphorylierung bestimmter Serinreste durch unterschiedliche Kinasen (u.a. MAPKs, CDKs, PKA) spricht dafür.

Aktiviertes STAT3 interagiert mit Stathmin-1 und sequestriert dieses, sodass Mikrotubuli polymerisieren können (Ng *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2009). Dadurch ergibt sich ein proviraler Effekt für Hepatitis C Viren (McCartney *et al.*, 2013). Eine derartige Sequestration des STMN-1-STAT3 Komplexes scheint jedoch die Funktion von phosphoryliertem STAT3 als Transkriptionsfaktor nicht zu unterbinden (Ng *et al.*, 2006). Trotzdem stellt sich die Frage, welche Rolle STAT1-STAT3 Heterodimere einnehmen (Delgoffe & Vignali, 2013) und inwiefern Stathmin-1 solche Komplexe auch direkt mit verwandten STAT Molekülen wie STAT1 eingehen kann, um eine IFN- γ Signaltransduktion zu unterbinden. Zumindest sind auch im Fall von STAT1 Protein-Interaktionen und nicht-transkriptionelle Funktionen beschrieben, die vom klassischen Signalweg abweichen (Dimco *et al.*, 2010; Kim & Lee, 2007). Derartige Interaktionen sind möglicherweise auch abhängig vom Phosphorylierungsstatus von Stathmin-1. Mehrere herpesvirale Serin/Threonin-Kinasen, HSV UL13, EBV BGLF4, KSHV ORF36 und auch HCMV UL97, phosphorylieren Stathmin-1 nach Transfektion in HeLa Zellen (Chen *et al.*, 2010). Nachfolgende Untersuchungen müssen

DISKUSSION

zeigen, ob dieser Effekt nicht nur in EBV infizierten Zellen, sondern auch nach HCMV Infektion nachzuweisen ist.

Die miRNA-223 beeinflusst die Stabilität der Stathmin-1 mRNA negativ und reduziert folglich auch die Stathmin-1 Proteinmenge. Deshalb ist die miRNA-223 Expression in diversen Tumoren (Kang *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2008) aber auch nach einer Infektion mit Denguevirus vermindert (Wu *et al.*, 2014). Damit übereinstimmend ist die Stathmin-1 Proteinmenge nach Denguevirus Infektion erhöht und eine Stathmin-1 Überexpression steigert die Denguevirus Replikation. Ob diese Stathmin-1 Überexpression lediglich das Mikrotubuli Netzwerk verändert oder weiterreichende Konsequenzen hat, bedarf weiterer Untersuchungen. Ohne eine Verknüpfung zu Stathmin-1 herzustellen ist die miRNA-223 auch als antiviraler Faktor in HIV-1 und SARS-Coronavirus Infektionen beschrieben (Mallick *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009b). Sich widersprechende erhöhte und erniedrigte Stathmin-1 Proteinexpressionsmengen wurden nach Rabiesvirus Infektionen beobachtet, die sich vermutlich durch die differentielle Regulation unterschiedlicher Isoformen ergeben (Zandi *et al.*, 2009). Folgt man diesen Überlegungen, wären auch die miRNA-223, Stathmin-1 mRNA und Proteinmengen nach HCMV Infektion von Interesse. Präliminäre Real-Time PCR Daten zeigen überraschenderweise eine erhöhte miRNA-223 Expression 24 hpi nach MCMV Infektion in der Leber (persönliche Kommunikation S. Rattay, HHU Düsseldorf). Es stellt sich die Frage, ob eine Stathmin-1 Überexpression und ein Stathmin-1 knockdown die HCMV Infektion positiv beziehungsweise negativ beeinflussen. Bedenkt man, dass virale Proteine sowohl Aktivierungsstatus als auch die Proteinexpression von Stathmin-1 modulieren, ist eine Klärung einer möglichen Wechselwirkung zwischen Stathmin-1 und Viren von Bedeutung. Insbesondere im Hinblick einer potenziellen Funktion als Regulator des IFN-Signalwegs kann dies grundlegende Erkenntnisse über die Mechanismen der angeborenen Immunität liefern.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

Blotting-Apparatur:	Fastblot B64, Biometra Turbo Blotter, Schleicher & Schuell SRC 072/0 Minifold, Schleicher & Schuell
Durchfluscytometer:	FACSCanto II, BD
Elektrophorese-Kammern:	Agagel mini, Biometra Agagel maxi, Biometra Minigel-Twin, Biometra
Elektroporator:	Gene Pulser II, Biorad
FACS-Sorter:	MoFlo XDP, Beckman-Coulter
Gel Dokumentation:	Ge iX Imager, Intas ChemoFluorBlot Epi-UV, Intas
Hybridisierungsöfen:	OV5, Biometra
Inkubatoren:	BBD 6220, Heraeus
Mikroskope:	TS100, Nikon Axiovert 40 CFL, Zeiss
Photometer	UV mini 1240, Shimadzu
Power-Supplies:	Power Pack P25T, Biometra EPS 301, Amersham EV202, Consort
Stickstofftank:	Biosafe MD, Cryotherm
Sterilbänke:	Hera Safe, Heraeus
Thermoblöcke:	ThermoStat plus, Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf

MATERIAL UND METHODEN

Thermocycler:	T1 und T3000, Biometra
UV-Crosslinker:	CL-1000, UVP
Vortexer:	L46, Labinco VV3, VWR
Wiegeschüttler:	3017, GFL
Zentrifugen:	5810R, Eppendorf 5415D, Eppendorf 5415C, Eppendorf 5417R, Eppendorf 3K30, Sigma-Aldrich Allegra X-15R , Beckman-Coulter J2-21, Beckman-Coulter Avanti J-E, Beckman-Coulter

4.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid (Rotiphorese-30)	Roth
AEC (3-Amino-9-ethyl-carbazol)	Sigma-Aldrich
Agar	Invitrogen
Agarose	Biozym
Ampicillin	Roth
APS (Ammoniumpersulfat)	Riedel-de Haen
Bacitracin	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	Roth
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	New England Biolabs
CaCl ₂	Roth
Complete Protease Inhibitors	Roche

MATERIAL UND METHODEN

Coomassie Blue G-250	LKB
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid)	Polysciences
DIG-Blocking-Reagenz	Roche
DIG-Easy Hyb	Roche
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
dNTPs	Roche
DTT (Dithiothreitol)	Serva
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Biorad
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Invitrogen
Formaldehyd 37%	Merck
Glycerol	Roth
Glycin	Neolab
HCl	Roth
Hyperladder I (DNA-Größenstandard)	Bioline
IFN- γ	PBL Interferon Source
Isopropanol	Merck
KCl	Roth
KH ₂ PO ₄	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich
LB(Luria-Bertani)-Medium	Roth
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Sucofin
Maleinsäure	Roth
Methanol	Merck
MgCl ₂	Roth

MATERIAL UND METHODEN

Na-Citrat	Roth
NaCl	Roth
Na-Deoxycholat	Roth
NaF	Alexis
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	Merck
NaOH	Merck
Na-Vanadat	Alexis
NP-40/Igepal	Sigma-Aldrich
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	Invitrogen
PEI (Polyethylenimin)	Sigma-Aldrich
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml)	Invitrogen
Pepstatin	Sigma-Aldrich
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
Phosphorsäure	Merck
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth
Ponceau-S	Roth
RPMI-1640 GlutaMAX	Invitrogen
Protaminsulfat	Merck
Proteinase K	Roche
Saccharose	Roth
Saponin	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
Sorbitol	Roth
TEMED	Roth
Tris-Base	Roth
Trypsin 2,5%	Invitrogen
Tween-20	Sigma-Aldrich

MATERIAL UND METHODEN

4.1.3 Puffer und Lösungen

AP-Puffer	100 mM Tris/HCl; pH 9,5 100 mM NaCl
Bradford-Lösung	8,5% (v/v) Phosphorsäure 4,75% (v/v) Ethanol 100 mg/l Coomassie Blue G-250
FACS-Puffer	10x PBS; pH 7,4 3% FCS
LB-Agar	LB-Medium 1,5% (w/v) Agar
LB-Medium	1% (w/v) Trypton 5% (w/v) Hefeextrakt 5% (w/v) NaCl
Lämmli-Puffer (10x)	252 mM Tris 1,92 mM Glycin 1% (w/v) SDS
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure; pH 7,5 150 mM NaCl
PBS (1x); pH 7,4	136 mM NaCl 2,6 mM KCl 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Ponceau-Lösung	0,1% (w/v) Ponceau-S 5% (v/v) Essigsäure

MATERIAL UND METHODEN

Proteinase K-Puffer (4x); pH 8,0	2% (w/v) SDS 40 mM Tris 20 mM EDTA
RIPA ⁺ -Lysepuffer	50 mM Tris/HCl; pH 7,5 150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40/Igepal 0,1% (v/v) SDS 1% (v/v) Na-Deoxycholat 0,2 mM PMSF 1 mM DTT 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 50 mM NaF 0,1 mM Na-Vanadat Complete Protease Inhibitors
SDS-Probenpuffer (5x)	0,25 M Tris/HCl; pH 6,8 25% (v/v) Glycerol 20% (w/v) SDS 0,5% (v/v) β-Mercaptoethanol eine Pipettenspitze Bromphenolblau
Semidry-Blot-Puffer (10x)	480 mM Tris 280 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
Sorbitol-Kissen	20% (w/v) Sorbitol 50 mM Tris; pH 7,4 1 mM MgCl ₂ 100 µg/ml Bacitracin

MATERIAL UND METHODEN

SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat
TBE (10x)	900 mM Tris 900 mM Borsäure 20 mM EDTA; pH 8,0
TBE-Probenpuffer (6x)	10% (v/v) Glycerol 6x TBE eine Pipettenspitze Bromphenolblau
TBST (10x)	0,1 M Tris/HCl; pH 8,0 1,5 M NaCl 5% (v/v) Tween-20

4.1.4 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von MWG-Biotech synthetisiert.

Tab. 4.1: Klonierungsprimer

pMACE	5'-3'
MM-MIEPatRfwd	gagatcgattccatagagcccaccgcatcc
MM-MIEPatRrev	gaggaattcgttgacattgatttgacta
MM-pcDNA-ccdBm1	gcctgatgaatgctcatccggagtccgtatggcaatgaaagacg
MM-pcDNA-ccdBm2	cgtcttcaatgccatacggaaactccggatgagcattcatcagcg
MM-attRfr1 fwd	gagaagcttacaagttgtacaaaaaagct
MM-attRfr1 rev	gaggaattccggatgagcattcatcagcg
MM-attRfr2 fwd	gaggaattccgtatggcaatgaaagacggt
MM-attRfr2 rev	gagctcgagaccatttgtacaag aaagct
MM-SV40prEGFP fwd	gagccaaggcagccctcgctgtggaatgtgtcagtt
MM-SV40prEGFP rev	gaggtaacctactgtacagctcgtccatg
pIRES- <i>STMN1</i>	5'-3'
MM- Stathmin1 fl1	gagctcgagagagtgtgctcagggcgctcg
MM- Stathmin1 fl2	gagggatccgtcaccacagcactgtcag
puc2CL6IEGwo-SeV C-HA	5'-3'
MM-SeVC fwd	gaggctagcatgaccttattcttaagaaga
MM-SeVCH arev	gagtctagatcaagcgtaatctggaacatcg

MATERIAL UND METHODEN

Tab. 4.2: HCMV PCR-Kontrollprimer

Genregion	fwd 5'-3'	rev 5'-3'
lncRNA2.7	tatgatccttttttttggcttttaggttc	tatcgccggcgaaaaggatgaaacatggaatac
lncRNA1.2	tategatcctgaattctcagttatcggaag	tatcgccggcgagatcgtgctgccccggcg
RL8A-RL9A	ccagcgggaattcaaacagcggagatccccag	gaggggaagctctattggattcgcatgg
RL10	gtgaagcttatgtatccgctgtaatgcac	agatatcagcagcgttctgctcctctgc
RL11	cggattcccaagaggcagac	tgttcagcgtctgttcccc
RL13	atggactggcagtttacggtaag	ctacataccatgtatccgttctagtc
UL1	atgtaaaacacccatcac	tacatgaaaatcacagtc
UL14	ttcgtggtggtggcagcac	caggctgtgggtctcgttgc
UL16	acgagatcatcgccgtggct	cggacgtagaggcgtcgtat
UL18	gaaagcttggggcccccacatgatgacaatgtgt	ctccggatccccgttagctgtcgggtgatcaggac
UL23	ggaagatcgcgatgctggtaacaagga	ggaattcgttaaacgcctcctcaaaaagtgtgtg
UL24	ggaagatctacatggagagaccggc	ggaattcgttaaacacggctgctgacgtcctttgg
UL27	ggcgtgcttggaggtttg	ctgctgtagatgagaggtttg
UL37	ctgctagcatgtttctgtgctgtgtgtgac	gcaggatcctcagacatccgatgaaagtc
UL40	gacgggtgtaactgtggtggag	tgggttctcgggtctg
UL42	gaccgaacgtggcggctgcagctcagatggtagg	ctcaatattaaaggtttggagaagacctctctgtgc
UL43	tgggtaaacagctcggggc	ggcccacggcaactggttaa
UL44	atcgtcggatccatggatcgaagacgcgcctc	agcaatgcggcccttagcccatctttgtctct
UL50	tctccagaggccgacgcggaccctccgacgtcc	atcctggagggaagacagctggcgggttaa
lncRNA4.9	cgctctccaaggaacactggg	cgagcaccaaaggctaaagtc
UL73	agttctgtaacaattcatccagctcaacctctgca	ggcggaaacaccggcgtgtaaacctgtccaccct
UL75	ctctaagcttctatcgccccgcctc	ctgaattctcagatgctttagcatgc
UL82	cgctctagatgctcagcactgtctct	cgctctagatcggggctcactgcgtgg
UL99	gctctggctcaccaggtgtctc	ggcgcggagctcctgggtgtctggg
UL100	ctgaattctaaagctcctcgaagcttc	gagaggatccatggccccctccacgtgataagg
UL111A	aaagcccgagctgctccag	accgctcaacaaccagtc
UL114	ttcgtggtggtggcagcac	caggctgtgggtctcgttgc
UL115	gtgaagcttatgtccggccggcggattg	agatatcagcgcgagcatccactgcttgg
UL116	cgcaatgtctacgtgctctgag	ttccccctccccctctgtatcc
UL117	tcgccagacagactccg	ggacgcaaaactccgtcc
UL120	gctgtagttgacctgctggtgag	ggtggfaagctcgggaagatggg
UL123	ggatcgcccccaaatgtact	tggcggcattgcagaactg
UL128	accctgtgatacctgtggaac	cactttcactgctgctctctg
UL130	gtgaagcttatgctggcttctgctctc	agatatcagcaacgatgagattgggatgggtac
UL148	tgacaccagccaacctctgct	gcgccgatttagtaagcagcc
US2	ggaqatcactaaagccggggaaga	acacgaaaaaccgcatccacatc
US3	tctgttctgagactcgcgga	accctacgctcaggagcaca
US6	cccgaaaaccttctctctctc	tcaggagccacacgtcgaatc
US7	ctgcaatcacagaagggaattgtaaaa	aggtcaaaagattatagattttccgg
US8	tgctgttggtaacgtggct	ggcggatcctcaacataaggacttttcaactttggg
US10	tattcgcgaggtgataataaccg	tgtacattctcgtcccacgga
US11	ttcgtatgaacctccgcctt	tgtccgaaacatccaggga
US12	cctggaattaccacggctgat	cgatacattgccctctgagc
US13	atggaacacggtctgctgc	ggtttttccccctccctc
US18	ggcaacgacagaccgatgac	gctctccaatggttgaacgc
US24	agattagcagggacacccca	ccactctgggagaatgagc
US26	gtcggctcggcagataaac	gggtgtggtggcgaatc
US28	gctactaccgatttccagaatc	aaacttgggtcccacgaagac
US34	ttgtctgctcgtgattg	tgtcggcagagtaagatgc

Tab. 4.3: Standard-Sequenzierprimer

	5'-3'
m13	gtaaacgacgcccaagtc
CMVfwd	cgcaaatggcggtaggcgtg

MATERIAL UND METHODEN

Tab. 4.4: Sequenzierprimer von viralen Klonen

weitere Sequenzierungsprimer (Bachelorarbeit T. Stephan, 2014)

Klon	5'-3'	Klon	5'-3'
EE10	atgctgctgctgggggccaac	EE857	caccactttgaactctctacc
EE10.2	ccgtcgggtgccggcgccacgt	ME73	gagagatctccgtgagaagac
EE10.3	cggtagacggcgccccaacc	ME73.2	ggcctcggccgcccgccacc
EE10.4	aacagaggctgggagcccgaca	ME73.3	agccgagcgggagcggtgacg
EE10.5	agacaacgtggttctgtacgt	ME73.4	gcggaaccgcctctactgact
EE51	gccaacggcatgcccccctca	ME73.5	ggcggccacattgtcagcagg
EE57	ccatcttttaatcaatcagcgt	ME73.6	ccggcgggtgtggagcggcgcc
EE64	cagatatcacaagtgtgtacaa	ME81	cgttctccgattaccgcaaca
EE76	atatatagactgaagcggagtg	ME104	ctgacgggtgagctcgttaacg
EE81	tcgcctgccgcatcgataccag	ME104.2	gagacgctgcgctactctact
EE89	atcgtgcgcctatcactcaatc	ME106	caccttttattactctgttac
EE89.2	acgctgaatcggggttgctgt	ME127	ttacaccttctgtaccatccc
EE103	gagcggcactggacgactca	ME130	tgctgaggtcttctcggcgtcg
EE103.2	gaagaaatggaagcgaataagc	ME138	cgttggttaagcgcactttcc
EE103.3	ggcggcccaaccgcaaggagctg	ME138	aaagaccgctgcctcgtttacc
EE103.4	gtttacctcatcggcaatcgg	EL3	cctccggtggagcgggtgtgtg
EE103.5	tggaggtctcggagaggaagtc	EL3.2	gtcgcctggtgtgtgtggat
EE154	aaccagcaagtcaacaaaagac	EL3.3	aacccgttctcgcaccgccg
EE247	tcaaggaacatccttcagcgt	EL19	ctggggcgcccatgatcgccg
EE247.2	ggggatgatgagcagatggtc	EL19.2	accgacggcgaaaaccgctcg
EE249	gccgccagacctccaacaacac	EL34	aaaagaccaccgcacagcaga
EE301	cgatctccgtatagtagatga	EL34.2	gacggtgcagagctccgaggcg
EE301.2	ttatcctgcactctctcgtc	EL97	cgattcttgaagacaatattct
EE478	agcgcttcgacggccgcgtga	EL189	tcccgatgctgctctttgtcg
EE478.2	tcagacggcgagtagaccgcgac	EL197	gacctacgcgacgctacgaatg
EE578	aaccgtgcccttttcacagca	EL200	actaacagcgtgcatcgtacg
EE578.2	gcggtcgtaaagcggcagcatgg	EL200.2	aatgagacaggtcgcgtaccgc
EE578.3	gtgagtcctcagcttgtgt	EL211	ggccactcggggaatcggcgca
EE704	ttcgggacccaanafttggtcc	ML1	ctacctggaggagatggcctta
EE788	ggatatcgcaaaagttttcgac	ML1.2	tcaacctgttggacgacacgga
EE824	gtttccccgtctctcccctc	ML22	ggtggtgaccggccttcggcc
EE834	tcgagatatcaaaactcaata	ML28	tccaccgcaatgtctacgctgc
EE834.2	tgttccatcatcagcatgagt	ML28.2	ggtgacgttgcgaacttgagc
EE834.3	ttactgtctatcacacgaaatg	ML28.3	acaacacagcagccgctcctc
EE834.4	aggcagtagataccagattctc	ML28.4	gcgtataggagctcctaggtcgg
EE852	aatcatgaaagcaaggcagc		

4.1.5 Plasmide

- pIRES-SeV C-HA (J. Rashidi-Alavijeh, HHU Düsseldorf, Universität Duisburg-Essen)
- pIRES-*STMN1* (4.1.4; Tab. 4.1)
- pDONR (Invitrogen)
- pMACE (2.3.1; 4.1.4; Tab. 4.1)
- Tet-pLKO-puro (Addgene)

MATERIAL UND METHODEN

puc2CL6IEGwo (H. Hanenberg, HHU Düsseldorf, Indiana University School of Medicine Indianapolis)

puc2CL6IEGwo-SeV C-HA (4.1.4; Tab. 4.1)

pCD/NL-BH; pcz-VSV-G (H. Schaal, HHU Düsseldorf)

4.1.6 Antikörper

Tab. 4.5: WB und FACS Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung
p-Tyr701-STAT1	Kaninchen	R&D	AF2894	1:1000
STAT1	Kaninchen	Santa Cruz	sc-346	1:1000
HLA-DR	Maus	Leinco	H131	1:50
IDO	Maus	Millipore	05-840	1:500 (FACS); 1:1000 (WB)
Jak1	Maus	BD	610231	1:1000
MHC-I (W6/32)	Maus	-	-	1:50
Stathmin-1	Maus	Santa Cruz	sc-48362	1:100
β-Aktin	Maus	Sigma	A2228	1:20.000
α-Maus-APC	Ziege	BD	550826	1:300
α-Maus-POD	Ziege	Dianova	115-035-003	1:3000
α-Kaninchen-POD	Ziege	Sigma	A6154	1:3000

4.1.7 *E. coli* Stämme

XL1-Blue $F'::Tn10$ *proA+B+* *lacIq* $\Delta(lacZ)M15/recA1$ *endA1* *gyrA96*
(Nal^r) *thi* *hsdR17* (rK- mK+) *glnV44* *relA1* *lac*

TOP10 F *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$
recA1 *araD139* $\Delta(araleu)7697$ *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1*
nupG

DH10B T1 Phage-Resistant F *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$
recA1 *endA1* *araD139* $\Delta(ara, leu)7697$ *galU* *galK* λ *rpsL* *nupG*
tonA

ccdB Survival 2 T1^R F *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$
recA1 *araD139* $\Delta(ara-leu)7697$ *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1*
nupG *fhuA::IS2*

MATERIAL UND METHODEN

4.1.8 Humane Zelllinien

MRC-5	fetale Lungenfibroblasten, ATCC CCL-171
RPE	retinale Pigment-Epithelzellen, ATCC CRL-2302
HeLa	Zervixkarzinom-Zelllinie, ATCC CCL-2
HEK293T	fetale Nierenzellen, ATCC CRL-3216
ILN7	immortalisierte GM02290A Hautfibroblasten (Greaves <i>et al.</i> , 1995)
U373	Astrocytom-Zelllinie, ATCC HTB-17
2fTGH	Sarkom-Zelllinie
HuH7	Hepatom-Zellen
THP-1	Monozyten-Zelllinie, ATCC TIB-202
U937	Monozyten-Zelllinie, ATCC CRL-1593.2
8866	B-Zelllinie
722.221	B-Zelllinie
BL-2	B-Zelllinie
Jurkat	T-Zell-Lymphom-Zelllinie, ATCC TIB-152
Daudi	Burkitt Lymphom-Zelllinie, ATCC® CCL-213
SKOV-3	Adenokarzinom-Zelllinie, ATCC HTB-77

4.1.9 Viren

HCMV-AD169	(Chee <i>et al.</i> , 1990)
HCMV-TB40/E	(Sinzger <i>et al.</i> , 1999)
HCMV-GFP (AD169-GFP Δ US2-11)	(Borst & Messerle, 2000)

4.2 Arbeiten mit *E.coli*

4.2.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli* für Plasmid-Transformationen

Um chemisch-kompetente *E.coli* herzustellen, wurden 100 ml LB-Medium mit 3 ml *E.coli* XL1-Blue Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,4-0,5 (bei 600 nm) unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert (10 min, 4000 rpm, 4°C, 5810R, Eppendorf) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 ml kaltem 0,1 M MgCl₂ resuspendiert. Die Bakterien wurden nochmals pelletiert und in 50 ml kaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml kaltem 0,05 M CaCl₂, 15% Glycerol aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

4.2.2 Transformation kompetenter *E.coli*

Chemisch-kompetente *E.coli* wurden auf Eis aufgetaut und die zu transformierende Plasmid-DNA zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde für 90 sec ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterien nach Zugabe von 1 ml LB-Medium 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach Pelletierung (2 min, 8000 rpm, 5415D, Eppendorf) und erneuter Aufnahme in 50 µl LB-Medium wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und μ N bei 37°C inkubiert.

Chemisch kompetente One Shot TOP10 und One Shot *ccdB* Survival 2 T1^R (beide Invitrogen) wurden nach Angaben des Herstellers transformiert.

4.2.3 Glycerol-Dauerkulturen

Zur längerfristigen Lagerung von *E.coli*-Klonen wurden Glycerol-Dauerkulturen angelegt. Übernachtskulturen in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden 1:1 mit zuvor autoklaviertem Glycerol gemischt. Die Bakterien-Glycerol Mischung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

4.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

4.3.1 Zellkultur

Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter Sterilbänken (Hera Safe, Heraeus) durchgeführt. Verwendete Zellen wurden entweder in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), welches mit 10% Hitze-inaktiviertem (30 min, 56°C) FCS (*fetal calf serum*), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde (MRC-5, RPE, HeLa, HEK293T, ILN7, U373, 2fTGH, HuH7), oder in RPMI-1640 GlutaMAX/10%FCS/ Penicillin/Streptomycin (THP-1, U937, 8866, 722.221, BL-2, Jurkat, Daudi, SKOV-3) in einem Inkubator mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Zur Passagierung adhärenter Zellen wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch eine 0,5%ige Trypsin-Lösung (Invitrogen, in PBS verdünnt) nach kurzer Inkubation bei 37°C vom Boden der Zellkulturgefäße gelöst. Gelöste Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und auf neue Zellkulturgefäße umgesetzt.

4.3.2 Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff

Zur längerfristigen Lagerung wurden eukaryotische Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Einfriermedium besteht aus 10% DMSO (v/v), 40% DMEM bzw. RPMI (v/v) und 50% FCS (v/v). Gelöste und resuspendierte Zellen (4.3.1) wurden in 5 ml-Zentrifugen-Röhrchen für 3 min pelletiert (1000 rpm, 5810R, Eppendorf). Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium pro Aliquot resuspendiert und in Cryo-Röhrchen (Nunc) überführt. Diese wurden in Cryo-Einfrierbehältern (Qualifreeze, Qualilab) langsam (-1°C/h) bei -70°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert.

4.3.3 Transfektion

Die Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte unter Verwendung des „Superfect Transfection Reagent“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

4.3.4 IFN- γ Behandlung

IFN- γ wurde entsprechend der gewünschten Konzentration (250-500 U/ml) in Zellkulturmedium verdünnt auf die Zellen gegeben und für den angegebenen Zeitraum auf den Zellen belassen. IFN- γ wurde zuvor in PBS/0,1%FCS aufgenommen.

4.4 Virologische Arbeiten

4.4.1 Herstellung eines gereinigten HCMV-Stocks

MRC-5 Zellen in 20 T175-Zellkulturflaschen wurden mit HCMV infiziert. Nachdem alle Zellen einen CPE zeigten und sich ablösten (ca. 9 Tage) wurde das Medium mit den infizierten Zellen in 500 ml-Zentrifugenbecher überführt und pelletiert (10 min, 6000 rpm, 15°C, J2-21, Beckman-Coulter). Der Überstand wurde in 250 ml-Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (3 h, 13.000 rpm, 15°C, J2-21, Beckman-Coulter), um die Viren zu pelletieren. Das Virus-Pellet wurde nach dem Verwerfen des Überstandes in 10 ml Medium resuspendiert und in einem *Douncer* (Wheaton) homogenisiert. Die Virus-Suspension wurde auf ein Sorbitolkissen pipettiert und zentrifugiert (1 h, 20.000 rpm, 10°C, Optima L-70K, Beckman-Coulter). Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand verworfen. Das Virus-Pellet wurde in 2-3 ml PBS 1 h bei 4-10°C belassen, bevor die Viren resuspendiert und mittels „*Douncer*“ homogenisiert wurden. 30-50 μ l Aliquots wurden bei -80°C eingefroren.

4.4.2 Infektion mit HCMV

Zu infizierende Zellen wurden in 12-*well* Platten ausgelegt. HCMV wurde der verwendeten MOI entsprechend in Zellkulturmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Zellkulturplatten wurden zur Verstärkung der Infektion zentrifugiert (2 x 15 min, 2000 rpm, Allegra X-15R, Beckman-Coulter). Anschließend wurden die infizierten Zellen für den angegebenen Zeitraum bei 5% CO₂, 37°C inkubiert. Drei Stunden nach Infektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

4.4.3 Titration von HCMV

Für die Bestimmung des Virus-Titers eines HCMV-Stocks wurden MRC5-Zellen in 96-well Platten angelegt (mindestens 80% konfluent). Diese wurden mit einer sequenziellen 1:10 Verdünnungsreihe der zu titrierenden Virus-Suspension infiziert (4.4.2). Pro Virus-Stock wurde mindestens eine 3-fach-Bestimmung durchgeführt. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Methanol fixiert sowie permeabilisiert. Nach einer Lagerung üN bei -20°C wurde das Methanol abgekippt und die Platten wurden unter dem Abzug vollständig getrocknet. Daraufhin erfolgte der Nachweis von HCMV Antigenen. Nach Zugabe von Primär-Antikörper (CCH2 + DDG9, Dako, 1:100 verdünnt in 1% Milchpulver/PBS) bzw. Sekundär-Antikörper (α -Maus-POD, Dianova, 1:200) wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischen den Schritten wurde jeweils dreimal mit PBS gewaschen. Als präzipitierbares Substrat wurde AEC (3-Amino-9-ethyl-carbazol) verwendet, dessen Umsetzung nach dem Auftreten braun gefärbter Zellen gestoppt wurde. Die gefärbten Zellen wurden gezählt und der HCMV-Titer in pfu (*plaque forming units*) pro ml angegeben.

4.4.4 Herstellung lentiviraler Partikel und Infektion von Zielzellen

Um lentivirale Partikel zu produzieren, wurden HEK293T Zellen (Zellkulturschale, 60cm², 5x10⁶ Zellen am Tag vor der Transfektion) mit dem lentiviralen Vektor und Helferplasmiden, die für *gag/pol* und VSV-G kodieren (pCD/NL-BH; pcz-VSV-G), cotransfiziert. Einem Ansatz aus 1µg/µl PEI in 1 ml DMEM wurde ein weiterer Ansatz bestehend aus 6 µg der jeweiligen Vektoren in 1 ml DMEM zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsmedium durch 2 ml Zellkulturmedium aufgefüllt. Diese Mischung aus ca. 4 ml wurde auf die am Tag zuvor ausgelegten HEK293T Zellen gegeben und üN bei 5% CO₂, 37°C inkubiert. Danach erfolgte nach dem Austausch des Mediums durch 8 ml Zellkulturmedium eine erneute üN Inkubation bei 5% CO₂, 37°C. 2 ml des gefilterten Überstandes (0,45 µm Filter, Sarstedt) wurde 1,5 ml Zellkulturmedium und Protaminsulfat (10µg/ml) zugegeben, um Zielzellen einer 6-well Schale (70-80% konfluent) zu infizieren. Nach zwei Tagen Inkubation bei 5% CO₂, 37°C lassen sich transduzierte Zellen anhand der EGFP Fluoreszenz erkennen. Lentivirale Partikel im Überstand können bei -70°C eingefroren werden.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 RNA-Isolation

RNA wurde 24 hpi (AD169) und 72 hpi (TB40/E) nach Infektion von MRC-5 Zellen (jeweils MOI 3) isoliert. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

4.5.2 cDNA-Synthese und Klonierung in pENTR

Die Produktion der cDNA-Bank erfolgte mit dem „Full Length cDNA Library Construction Kit II“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

4.5.3 cDNA-Transfer von pENTR in pMACE durch homologe Rekombination

Der Transfer der cDNA-Bank von pENTR in den lentiviralen Vektor pMACE wurde nach den Vorgaben des Superscript „Full Length cDNA Library Construction Kit II“ (Invitrogen) mit den Komponenten des „Gateway LR Clonase II Enzyme Mix“ (Invitrogen) durchgeführt.

4.5.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte je nach Mengen-Bedarf mit dem „QIAprep Spin Mini Kit“ oder dem „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ (beide Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

4.5.5 Klonierung von pIRES-*STMN1*, pMACE, und puc2CL6IEGwo-SeV C-HA

Restriktionsverdauete PCR-Produkte und Plasmid-Fragmente wurden nach Zugabe von TBE-Probenpuffer in einem 1%-igem Agarosegel (Laufpuffer: 1xTBE) aufgetrennt und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) extrahiert. Nach der Ligation (üN, 16°C) durch eine T4 DNA Ligase (New England Biolabs) erfolgte die Transformation in chemisch-kompetente *E.coli* (4.2.2).

4.5.6 PCR (*polymerase chain reaction*)

Bei Kontroll-PCRs wurde die AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems) eingesetzt:

0,2 µl dNTPs
0,5 µl *forward* Primer (10 µM)
0,5 µl *reverse* Primer (10 µM)
10 ng *template*
2µl 10x PCR-Puffer
0,1 µl AmpliTaq DNA Polymerase
ad. 20 µl H₂O

Amplifikationen integrierter cDNAs aus DNA-Präparationen transduzierter Zellen wurden mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) durchgeführt:

0,5 µl dNTPs
1,25 µl *forward* Primer (10 µM)
1,25 µl *reverse* Primer (10 µM)
1 µl *template*: genomische DNA (4.5.7)
5 µl 5x PCR-Puffer (mit MgCl₂)
0,75 µl DMSO
0,25 µl Phusion High-Fidelity DNA Polymerase
ad. 25 µl H₂O

Bei PCR-Reaktionen für nachfolgende Klonierungen wurde das „Expand High Fidelity PCR System“ (Roche) eingesetzt:

1 µl dNTPs
1,5 µl *forward* Primer (10 µM)
1,5 µl *reverse* Primer (10 µM)
10 ng *template*
5µl 10x PCR-Puffer (mit MgCl₂)
0,3 µl Expand High Fidelity Polymerase
ad. 50 µl H₂O

MATERIAL UND METHODEN

Alle PCR-Reaktionen wurden mittels Touchdown-PCR im Thermocycler bei folgendem Programm ausgeführt:

5 min 95°C

1 min 40°C

Zyklus 1: 1 min 94°C
 2 min 62°C → 43°C 20 Zyklen
 2 min 72°C (3min bei PCR-Produkten >2 kb)

Zyklus 2: 1 min 94°C
 2 min 43°C 15 Zyklen
 2 min 72°C

10 min 72°C

4.5.7 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von Plasmiden (3µg) und PCR-Produkten (25 µl; 4.5.6) fand mit den angegebenen Restriktionsenzymen (New England Biolabs) unter Verwendung des NEBuffer Systems und falls erforderlich nach Zugabe von BSA (*bovine serum albumin*) für 1-2 h bei 37°C statt. Die Plasmid-Fragmente wurden nach Zugabe von TBE-Probenpuffer in einem 1%-igem Agarosegel (Laufpuffer: 1xTBE) aufgetrennt.

4.5.8 Präparation genomischer DNA eukaryotischer Zellen

$1,2 \times 10^6$ Zellen wurden in 1x Proteinase K-Puffer mit 250 µg/ml Proteinase K resuspendiert und üN bei 56°C inkubiert. Zur Extraktion der genomischen DNA wurde Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 1:1 zugegeben und durch wiederholtes Invertieren gemischt. Nach der Phasentrennung (5 min, 14.000 rpm, 5415C, Eppendorf) wurde die obere wässrige Phase abgenommen. Abschließend wurde die DNA mit 1 Volumen Isopropanol gefällt (20 min, 14.000rpm, 5417R, Eppendorf), mit 70% Ethanol gewaschen (10 min, 14.000rpm, 5417R, Eppendorf) und nach dem Trocknen des Pellets in 50 µl H₂O aufgenommen.

4.5.9 Präparation viraler DNA aus Virionen

Um genomische HCMV-DNA aus Virionen zu isolieren, wurde ein Aliquot (4.4.1) wie in 4.5.7 beschrieben mit Proteinase K behandelt und über eine Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt.

4.5.10 Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurden durchgeführt vom Genomics & Transcriptomics Labor des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ), HHU Düsseldorf oder von Beckmann-Coulter Genomics.

4.5.11 Southern Blot

Die DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen (New England Biolabs) verdaut und in einem 0,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf den DNA-Transfer vorbereitet (10 min 250mM HCl; 2x 15 min 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl; 2 x15 min 0,5M Tris/HCl pH 7,5 3 M NaCl; das Gel wurde zwischen Lösungen mit H₂O gewaschen) Der DNA-Transfer fand mittels Kapillarblot (Turbo Blotter, Schleicher & Schuell) nach den Angaben des Herstellers durch 20x SSC auf eine zuvor äquilibrierte Nylonmembran (Roche) statt. Nach dem Transfer wurde die DNA durch UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gebunden (120 mJ/cm², 5 min, UV-Crosslinker CL-1000, UVP). Nach einer Prä-Hybridisierung in „DIG-Easy Hyb“ Puffer (Roche) bei 42°C für 1 h wurde die Hybridisierung mit einer zuvor denaturierten Sonde (10 min >95°C; 4.5.13) bei 42°C üN durchgeführt.

4.5.12 Slot Blot

1 µg Plasmid DNA pro Slot wurde mit Hilfe einer Slot Blot Apparatur (SRC 072/0 Minifold, Schleicher & Schuell) auf eine zuvor in 20x SSC äquilibrierte Nylonmembran (Roche) übertragen. Die weitere Behandlung der Membran erfolgte wie in 4.5.11 beschrieben.

4.5.13 Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter Sonden

DIG-markierte DNA-Sonden wurden mit dem „DIG High Prime“ Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers hergestellt. Virale genomische DNA wurde zuvor mit dem Restriktionsenzym *HinfI* (New England Biolabs) auf eine für die Sondenherstellung kompatible Größe gebracht und mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt.

4.5.14 DIG-Detektion

Vor der Detektion wurde die Membran 2x 5 min mit 2x SSC, 0,1% SDS und 2x 15 min mit 0,2x SSC, 0,1% SDS bei 68°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Maleinsäurepuffer mit 1% Blocking-Reagenz (Roche) für 30 min inkubiert, um unspezifische Signale zu minimieren. Danach erfolgte die Bindung von AP (alkalische Phosphatase)-gekoppelten anti-DIG-Antikörpern (Roche, 1:20.000 in Maleinsäurepuffer/1% Blocking-Reagenz verdünnt) für 30 min. Um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 2x für 15 min mit Maleinsäurepuffer gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran 2 min mit AP-Puffer behandelt, danach 5 min in der Substratlösung (CDP-Star, Roche, 1:100 in AP-Puffer verdünnt) geschwenkt und abschließend zwischen Whatman-Papier getrocknet und in Klarsichtfolie eingeschlagen. Bei Substratumsetzung freigesetzte Energie in Form von Lichtsignalen wurde auf „High performance chemiluminescence“ Filmen (Amersham) oder im ChemoFluorBlot Epi-UV (Intas) detektiert.

4.6 Proteinanalytische und immunologische Methoden

4.6.1 Western Blot

Bei der Herstellung von Proteinlysaten für den Nachweis nicht-phosphorylierter Proteine wurde der Lysepuffer aus dem „Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity“ Kit (Roche) verwendet. Proteinlysate, die zum Nachweis von phosphorylierten Proteinen dienen sollten, wurden mit Hilfe von RIPA⁺-Lysepuffer hergestellt. Zellen wurden bei 4°C abgekratzt (*cell scraper*, Renner), pelletiert (3 min, 12000 rpm, 4°C, 5417R, Eppendorf) und mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde im jeweiligen Lysepuffer (100 µl pro 10⁶ Zellen) resuspendiert und bei -20°C eingefroren wurden. Nach dem Auftauen wurde 3 min

MATERIAL UND METHODEN

(Luciferase-Lysepuffer) oder 30 min (RIPA⁺-Lysepuffer) zentrifugiert (12000 rpm, 4°C, 5417R, Eppendorf). Der Überstand wurde für Westernblot-Analysen verwendet. Die Proben wurden nach einer Bradford-Protein-Messung (5µl Überstand in 995µl Bradford-Lösung) bei 595 nm mit dem verwendeten Lysepuffer angeglichen.

Die Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) im Minigel-Twin (Biometra) aufgetrennt. Die Zusammensetzung der SDS-Gele mit unterschiedlichen Acrylamid-Konzentrationen ist in Tab. 4.6 aufgelistet. Vor dem Auftragen der Proben auf das SDS-Gel wurden diese 5 min bei 95°C in denaturierendem SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 20 mA pro Gel für 1-1,5 h. Als Laufpuffer wurde Lämmli-Puffer verwendet.

Tab. 4.6: Zusammensetzung der SDS-Gele

	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	12%	5%
30% Acrylamid	3,2 ml	4 ml	4,8 ml	1,5 ml
2 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml			
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)				1,2 ml
60% Saccharose				2,1 ml
20% SDS	60 µl			45 µl
H ₂ O	6,1 ml	5,3 ml	4,5 ml	4,2 ml
TEMED	24 µl			12 µl
10% APS	144 µl			120 µl

Die Proteine wurden im Semidry-Blotverfahren (Fastblot B64, Biometra) auf eine Nitrocellulosemembran (Protran 0,45 µm NC, Amersham) transferiert (1 h, 14V). Der Blotaufbau bestand aus: Anode, 3x 3mm-Whatman-Papier, Nitrocellulosemembran, Gel, 3x 3mm-Whatman-Papier, Kathode. Whatman-Papier und Nitrocellulosemembran wurden zuvor mit Semidry-Blot-Puffer befeuchtet. Nach dem Transfer wurden die Proteine zur Kontrolle mit Ponceau-Lösung reversibel angefärbt (mit Ausnahme der Detektion von Phospho-Proteinen). Zum Blockieren der Membran wurde 10% Milchpulver/TBST eingesetzt (30 min). Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tab. 4.5) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder üN bei 4°C (Phospho-Blots). Die Inkubation des sekundären POD-koppelten Antikörpers (Tab. 4.5) erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Antikörper

MATERIAL UND METHODEN

wurden jeweils in 1% Milchpulver/TBST verdünnt. Zwischen den jeweiligen Schritten wurde die Membran gewaschen (mindestens 3x 10 min TBST). Nach dem Trocknen der Membran zwischen Whatman-Papier wurden die Proteine mit den „ECL Western Blotting Detection Reagents“ (Amersham) auf „High performance chemiluminescence“ Filmen (Amersham) oder im ChemoFluorBlot Epi-UV (Intas) detektiert.

Zum Re-Blot wurde die Membran gewaschen (2x 5 min TBST; 2x 5 min H₂O) und für 20-30 min in „Re-Blot Strong Solution“ (Millipore) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (2x 5 min TBST) kann die Membran wie zuvor beschrieben erneut mit Antikörpern behandelt werden.

4.6.2 Durchflusszytometrie

Zum Nachweis von Proteinen auf der Zelloberfläche wurden die Zellen in der Regel durch 0,5%ige Trypsin-Lösung (Invitrogen, in PBS verdünnt) vom Boden der Zellkulturgefäße gelöst und in FACS-Puffer aufgenommen. Es folgte ein Waschschriff mit FACS-Puffer (1500 rpm, 3 min, 4°C, 5810R, Eppendorf). Die Fluoreszenz-Markierung der Oberflächenproteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern (siehe Tab. 4.5, verdünnt in FACS-Puffer). Die Inkubationsphase mit primärem und sekundärem Antikörper betrug jeweils 30 min bei 4°C. Bei Verwendung eines Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers wurde im Dunkeln inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationsphasen wurde zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (1500 rpm, 3 min, 4°C, 5810R, Eppendorf). Zur Detektion wurden die Zellen in 200-300 µl FACS Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen (BD, 352008) überführt. Die Markierung toter Zellen erfolgte durch die Zugabe von DAPI (125 ng/ml). Anschließend wurden die Fluoreszenz-Intensitäten im FACSCanto II (BD) gemessen. Für jede Probe wurden 10.000 Zellen ausgewertet.

Der Nachweis intrazellulärer Proteine erfolgte im Wesentlichen entsprechend der Analyse extrazellulärer Proteine. Vor der Zugabe der Antikörper wurden die Zellen jedoch mit 3% Paraformaldehyd fixiert (10 min bei RT) und anschließend permeabilisiert (10 min bei 4°C). Zur Permeabilisierung wurde Saponin (0,05% w/v in FACS-Puffer) verwendet. Der FACS-Puffer enthielt in den nachfolgenden Inkubations- und Wasch-Schritten ebenfalls 0,05% Saponin.

4.6.3 FACS-Sortierung

FACS-Sortierungen wurden am MoFlo XDP (Beckman-Coulter) der *Core Flow Cytometry Facility* (Laborleitung: Katharina Raba) des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, HHU Düsseldorf durchgeführt. Zu sortierende Zellen wurden wie in 4.6.2 beschrieben behandelt, gefiltert (Celltrics 50µm, Sysmex Pardec) und in sterilen FACS-Röhrchen (BD) aufgenommen. Sortierte Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und in einer der Zellzahl entsprechenden *well*-Platte ausgelegt.

Einzelzellsortierungen erfolgten ebenfalls am MoFlo XDP (Beckman-Coulter) in vorgelegtes Zellkulturmedium von 96-*well* Platten.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abate, D. A., Watanabe, S. & Mocarski, E. S. (2004). Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *Journal of virology* **78**, 10995-11006.
- Adams, O., Besken, K., Oberdorfer, C., MacKenzie, C. R., Takikawa, O. & Daubener, W. (2004). Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *Journal of virology* **78**, 2632-2636.
- Adjei, A., Armah, H. & Narter-Olaga, E. (2006). Seroprevalence of cytomegalovirus among some voluntary blood donors at the 37 military hospital, accra, ghana. *Ghana medical journal* **40**, 99-104.
- Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P. A., Yang, Y. & Fruh, K. (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 10990-10995.
- Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T. R., Wiertz, E. J., Ploegh, H. L., Peterson, P. A., Yang, Y. & Fruh, K. (1997). The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* **6**, 613-621.
- Alderete, J. P., Child, S. J. & Geballe, A. P. (2001). Abundant early expression of gpUL4 from a human cytomegalovirus mutant lacking a repressive upstream open reading frame. *Journal of virology* **75**, 7188-7192.
- Andrews, S. J. & Rothnagel, J. A. (2014). Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames. *Nature reviews Genetics* **15**, 193-204.
- Arias, C., Weisburd, B., Stern-Ginossar, N., Mercier, A., Madrid, A. S., Bellare, P., Holdorf, M., Weissman, J. S. & Ganem, D. (2014). KSHV 2.0: a comprehensive annotation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome using next-generation sequencing reveals novel genomic and functional features. *PLoS pathogens* **10**, e1003847.
- Atalay, R., Zimmermann, A., Wagner, M., Borst, E., Benz, C., Messerle, M. & Hengel, H. (2002). Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fc gamma receptor homologs. *Journal of virology* **76**, 8596-8608.
- Bai, Z., Huang, Y., Li, W., Zhu, Y., Jung, J. U., Lu, C. & Gao, S. J. (2014). Genomewide mapping and screening of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) 3' untranslated regions identify bicistronic and polycistronic viral transcripts as frequent targets of KSHV microRNAs. *Journal of virology* **88**, 377-392.
- Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Chee, M. S., Hutchison, C. A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J. A., Preddie, E. & et al. (1991). The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping* **2**, 1-12.
- Barchet, W., Cella, M., Odermatt, B., Asselin-Paturel, C., Colonna, M. & Kalinke, U. (2002). Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *The Journal of experimental medicine* **195**, 507-516.
- Barel, M. T., Pizzato, N., van Leeuwen, D., Bouteiller, P. L., Wiertz, E. J. & Lenfant, F. (2003a). Amino acid composition of alpha1/alpha2 domains and cytoplasmic tail of

- MHC class I molecules determine their susceptibility to human cytomegalovirus US11-mediated down-regulation. *European journal of immunology* **33**, 1707-1716.
- Barel, M. T., Rensing, M., Pizzato, N., van Leeuwen, D., Le Bouteiller, P., Lenfant, F. & Wiertz, E. J. (2003b)**. Human cytomegalovirus-encoded US2 differentially affects surface expression of MHC class I locus products and targets membrane-bound, but not soluble HLA-G1 for degradation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **171**, 6757-6765.
- Baron, M. & Davignon, J. L. (2008)**. Inhibition of IFN-gamma-induced STAT1 tyrosine phosphorylation by human CMV is mediated by SHP2. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **181**, 5530-5536.
- Beaudoing, E., Freier, S., Wyatt, J. R., Claverie, J. M. & Gautheret, D. (2000)**. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome research* **10**, 1001-1010.
- Bego, M., Maciejewski, J., Khaiboullina, S., Pari, G. & St Jeor, S. (2005)**. Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *Journal of virology* **79**, 11022-11034.
- Belletti, B. & Baldassarre, G. (2011)**. Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert opinion on therapeutic targets* **15**, 1249-1266.
- Belmont, L. D. & Mitchison, T. J. (1996)**. Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* **84**, 623-631.
- Biegalka, B. J. & Geballe, A. P. (1990)**. Translational inhibition by cytomegalovirus transcript leaders. *Virology* **177**, 657-667.
- Biegalka, B. J., Lester, E., Branda, A. & Rana, R. (2004)**. Characterization of the human cytomegalovirus UL34 gene. *Journal of virology* **78**, 9579-9583.
- Bieleski, L. & Talbot, S. J. (2001)**. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vCyclin open reading frame contains an internal ribosome entry site. *Journal of virology* **75**, 1864-1869.
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., Kuehn, M. S., Taylor, C. M., Neph, S., Koch, C. M., Asthana, S., Malhotra, A., Adzhubei, I., Greenbaum, J. A., Andrews, R. M., Flicek, P., Boyle, P. J., Cao, H., Carter, N. P., Clelland, G. K., Davis, S., Day, N., Dhami, P., Dillon, S. C., Dorschner, M. O., Fiegler, H., Giresi, P. G., Goldy, J., Hawrylycz, M., Haydock, A., Humbert, R., James, K. D., Johnson, B. E., Johnson, E. M., Frum, T. T., Rosenzweig, E. R., Karnani, N., Lee, K., Lefebvre, G. C., Navas, P. A., Neri, F., Parker, S. C., Sabo, P. J., Sandstrom, R., Shafer, A., Vetrie, D., Weaver, M., Wilcox, S., Yu, M., Collins, F. S., Dekker, J., Lieb, J. D., Tullius, T. D., Crawford, G. E., Sunyaev, S., Noble, W. S., Dunham, I., DENOUD, F., REYMOND, A., KAPRANOV, P., ROZOWSKY, J., ZHENG, D., CASTELO, R., FRANKISH, A., HARROW, J., GHOSH, S., SANDELIN, A., HOFACKER, I. L., BAERTSCH, R., KEEFE, D., DIKE, S., CHENG, J., HIRSCH, H. A., SEKINGER, E. A., LAGARDE, J., ABRIL, J. F., SHAHAB, A., FLAMM, C., FRIED, C., HACKERMULLER, J., HERTEL, J., LINDEMEYER, M., MISSAL, K., TANZER, A., WASHIETL, S., KORBEL, J., EMANUELSSON, O., PEDERSEN, J. S., HOLROYD, N., TAYLOR, R., SWARBRECK, D., MATTHEWS, N., DICKSON, M. C., THOMAS, D. J., WEIRAUCH, M. T., GILBERT, J., DRENKOW, J., BELL, I., ZHAO, X., SRINIVASAN, K. G., SUNG, W. K., OOI, H. S., CHIU, K. P., FOISSAC, S., ALIOTO, T., BRENT, M., PACTER, L., TRESS, M. L., VALENCIA, A., CHOO, S. W., CHOO, C. Y., UCLA, C., MANZANO, C., WYSS, C., CHEUNG, E., CLARK, T. G., BROWN, J. B., GANESH, M., PATEL, S., TAMMANA, H., CHRAST, J., HENRICHSEN, C. N., KAI, C., KAWAI, J., NAGALAKSHMI, U., WU, J., LIAN, Z., LIAN, J., NEWBURGER, P.,**

- Zhang, X., Bickel, P., Mattick, J. S., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Weissman, S., Hubbard, T., Myers, R. M., Rogers, J., Stadler, P. F., Lowe, T. M., Wei, C. L., Ruan, Y., Struhl, K., Gerstein, M., Antonarakis, S. E., Fu, Y., Green, E. D., Karaoz, U., Siepel, A., Taylor, J., Liefer, L. A., Wetterstrand, K. A., Good, P. J., Feingold, E. A., Guyer, M. S., Cooper, G. M., Asimenos, G., Dewey, C. N., Hou, M., Nikolaev, S., Montoya-Burgos, J. I., Loytynoja, A., Whelan, S., Pardi, F., Massingham, T., Huang, H., Zhang, N. R., Holmes, I., Mullikin, J. C., Ureta-Vidal, A., Paten, B., Sereinghaus, M., Church, D., Rosenbloom, K., Kent, W. J., Stone, E. A., Batzoglou, S., Goldman, N., Hardison, R. C., Haussler, D., Miller, W., Sidow, A., Trinklein, N. D., Zhang, Z. D., Barrera, L., Stuart, R., King, D. C., Ameer, A., Enroth, S., Bieda, M. C., Kim, J., Bhinge, A. A., Jiang, N., Liu, J., Yao, F., Vega, V. B., Lee, C. W., Ng, P., Shahab, A., Yang, A., Moqtaderi, Z., Zhu, Z., Xu, X., Squazzo, S., Oberley, M. J., Inman, D., Singer, M. A., Richmond, T. A., Munn, K. J., Rada-Iglesias, A., Wallerman, O., Komorowski, J., Fowler, J. C., Couttet, P., Bruce, A. W., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Langford, C. F., Nix, D. A., Euskirchen, G., Hartman, S., Urban, A. E., Kraus, P., Van Calcar, S., Heintzman, N., Kim, T. H., Wang, K., Qu, C., Hon, G., Luna, R., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Aldred, S. F., Cooper, S. J., Halees, A., Lin, J. M., Shulha, H. P., Zhang, X., Xu, M., Haidar, J. N., Yu, Y., Ruan, Y., Iyer, V. R., Green, R. D., Wadelius, C., Farnham, P. J., Ren, B., Harte, R. A., Hinrichs, A. S., Trumbower, H., Clawson, H., Hillman-Jackson, J., Zweig, A. S., Smith, K., Thakkapallayil, A., Barber, G., Kuhn, R. M., Karolchik, D., Armengol, L., Bird, C. P., de Bakker, P. I., Kern, A. D., Lopez-Bigas, N., Martin, J. D., Stranger, B. E., Woodroffe, A., Davydov, E., Dimas, A., Eyras, E., Hallgrimsdottir, I. B., Huppert, J., Zody, M. C., Abecasis, G. R., Estivill, X., Bouffard, G. G., Guan, X., Hansen, N. F., Idol, J. R., Maduro, V. V., Maskeri, B., McDowell, J. C., Park, M., Thomas, P. J., Young, A. C., Blakesley, R. W., Muzny, D. M., Sodergren, E., Wheeler, D. A., Worley, K. C., Jiang, H., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., Graves, T., Fulton, R., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Clamp, M., Cuff, J., Gnerre, S., Jaffe, D. B., Chang, J. L., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S., Koriabine, M., Nefedov, M., Osoegawa, K., Yoshinaga, Y., Zhu, B. & de Jong, P. J. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**, 799-816.
- Bodaghi, B., Goureau, O., Zipeto, D., Laurent, L., Virelizier, J. L. & Michelson, S. (1999).** Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **162**, 957-964.
- Borst, E. & Messerle, M. (2000).** Development of a cytomegalovirus vector for somatic gene therapy. *Bone marrow transplantation* **25 Suppl 2**, S80-82.
- Borst, E. M., Hahn, G., Koszinowski, U. H. & Messerle, M. (1999).** Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *Journal of virology* **73**, 8320-8329.
- Boss, J. M. (1997).** Regulation of transcription of MHC class II genes. *Current opinion in immunology* **9**, 107-113.
- Bradley, A. J., Lurain, N. S., Ghazal, P., Trivedi, U., Cunningham, C., Baluchova, K., Gatherer, D., Wilkinson, G. W., Dargan, D. J. & Davison, A. J. (2009).** High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. *The Journal of general virology* **90**, 2375-2380.

- Browne, E. P. & Shenk, T. (2003).** Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 11439-11444.
- Budt, M., Reinhard, H., Bigl, A. & Hengel, H. (2004).** Herpesviral Fcγ receptors: culprits attenuating antiviral IgG? *International immunopharmacology* **4**, 1135-1148.
- Burgert, H. G., Ruzsics, Z., Obermeier, S., Hilgendorf, A., Windheim, M. & Elsing, A. (2002).** Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Current topics in microbiology and immunology* **269**, 273-318.
- Campeau, E., Ruhl, V. E., Rodier, F., Smith, C. L., Rahmberg, B. L., Fuss, J. O., Campisi, J., Yaswen, P., Cooper, P. K. & Kaufman, P. D. (2009).** A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS one* **4**, e6529.
- Cao, J. & Geballe, A. P. (1995).** Translational inhibition by a human cytomegalovirus upstream open reading frame despite inefficient utilization of its AUG codon. *Journal of virology* **69**, 1030-1036.
- Cao, J. & Geballe, A. P. (1996).** Inhibition of nascent-peptide release at translation termination. *Molecular and cellular biology* **16**, 7109-7114.
- Carvunis, A. R., Rolland, T., Wapinski, I., Calderwood, M. A., Yildirim, M. A., Simonis, N., Charlotteaux, B., Hidalgo, C. A., Barbette, J., Santhanam, B., Brar, G. A., Weissman, J. S., Regev, A., Thierry-Mieg, N., Cusick, M. E. & Vidal, M. (2012).** Proto-genes and de novo gene birth. *Nature* **487**, 370-374.
- Cassimeris, L. (2002).** The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Current opinion in cell biology* **14**, 18-24.
- Cazalla, D., Yario, T. & Steitz, J. A. (2010).** Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA. *Science* **328**, 1563-1566.
- Cha, T. A., Tom, E., Kemble, G. W., Duke, G. M., Mocarski, E. S. & Spaete, R. R. (1996).** Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *Journal of virology* **70**, 78-83.
- Charbaut, E., Curmi, P. A., Ozon, S., Lachkar, S., Redeker, V. & Sobel, A. (2001).** Stathmin family proteins display specific molecular and tubulin binding properties. *The Journal of biological chemistry* **276**, 16146-16154.
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C. A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J. A. & et al. (1990).** Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Current topics in microbiology and immunology* **154**, 125-169.
- Chen, J., Sun, M., Kent, W. J., Huang, X., Xie, H., Wang, W., Zhou, G., Shi, R. Z. & Rowley, J. D. (2004).** Over 20% of human transcripts might form sense-antisense pairs. *Nucleic acids research* **32**, 4812-4820.
- Chen, P. W., Lin, S. J., Tsai, S. C., Lin, J. H., Chen, M. R., Wang, J. T., Lee, C. P. & Tsai, C. H. (2010).** Regulation of microtubule dynamics through phosphorylation on stathmin by Epstein-Barr virus kinase BGLF4. *The Journal of biological chemistry* **285**, 10053-10063.
- Child, S. J., Hakki, M., De Niro, K. L. & Geballe, A. P. (2004).** Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *Journal of virology* **78**, 197-205.
- Clemens, M. J., Laing, K. G., Jeffrey, I. W., Schofield, A., Sharp, T. V., Elia, A., Matys, V., James, M. C. & Tilleray, V. J. (1994).** Regulation of the interferon-inducible eIF-2α protein kinase by small RNAs. *Biochimie* **76**, 770-778.

- Coleman, H. M., Brierley, I. & Stevenson, P. G. (2003).** An internal ribosome entry site directs translation of the murine gammaherpesvirus 68 MK3 open reading frame. *Journal of virology* **77**, 13093-13105.
- Curmi, P. A., Andersen, S. S., Lachkar, S., Gavet, O., Karsenti, E., Knossow, M. & Sobel, A. (1997).** The stathmin/tubulin interaction in vitro. *The Journal of biological chemistry* **272**, 25029-25036.
- Curmi, P. A., Gavet, O., Charbaut, E., Ozon, S., Lachkar-Colmerauer, S., Manceau, V., Siavoshian, S., Maucuer, A. & Sobel, A. (1999).** Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin. *Cell structure and function* **24**, 345-357.
- Davison, A. J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D. J., Alcendor, D. J., McGeoch, D. J. & Hayward, G. S. (2003).** The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *The Journal of general virology* **84**, 17-28.
- Dearolf, C. R. (1999).** JAKs and STATs in invertebrate model organisms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **55**, 1578-1584.
- Degnin, C. R., Schleiss, M. R., Cao, J. & Geballe, A. P. (1993).** Translational inhibition mediated by a short upstream open reading frame in the human cytomegalovirus gpUL4 (gp48) transcript. *Journal of virology* **67**, 5514-5521.
- Delgoffe, G. M. & Vignali, D. A. (2013).** STAT heterodimers in immunity: A mixed message or a unique signal? *Jak-stat* **2**, e23060.
- Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. & Silverman, R. H. (1998).** Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15623-15628.
- Dimco, G., Knight, R. A., Latchman, D. S. & Stephanou, A. (2010).** STAT1 interacts directly with cyclin D1/Cdk4 and mediates cell cycle arrest. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **9**, 4638-4649.
- Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D., Hassan-Walker, A. F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D. J., McGeoch, D. J., Gatherer, D., Emery, V. C., Griffiths, P. D., Sinzger, C., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W. & Davison, A. J. (2004).** Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *The Journal of general virology* **85**, 1301-1312.
- Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H. & Liu, F. (2003).** Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 14223-14228.
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I. Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chapgier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al Ghonaium, A., Tufenkeji, H., Frayha, H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R. D., Gresser, I. & Casanova, J. L. (2003).** Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nature genetics* **33**, 388-391.
- Durbin, J. E., Hackenmiller, R., Simon, M. C. & Levy, D. E. (1996).** Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* **84**, 443-450.
- Faghihi, M. A., Modarresi, F., Khalil, A. M., Wood, D. E., Sahagan, B. G., Morgan, T. E., Finch, C. E., St Laurent, G., 3rd, Kenny, P. J. & Wahlestedt, C. (2008).** Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nature medicine* **14**, 723-730.

- Faghihi, M. A., Zhang, M., Huang, J., Modarresi, F., Van der Brug, M. P., Nalls, M. A., Cookson, M. R., St-Laurent, G., 3rd & Wahlestedt, C. (2010).** Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome biology* **11**, R56.
- Firth, A. E. & Brierley, I. (2012).** Non-canonical translation in RNA viruses. *The Journal of general virology* **93**, 1385-1409.
- Fitzgerald, K. D. & Semler, B. L. (2009).** Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochimica et biophysica acta* **1789**, 518-528.
- Furman, M. H., Dey, N., Tortorella, D. & Ploegh, H. L. (2002).** The human cytomegalovirus US10 gene product delays trafficking of major histocompatibility complex class I molecules. *Journal of virology* **76**, 11753-11756.
- Galindo, M. I., Pueyo, J. I., Fouix, S., Bishop, S. A. & Couso, J. P. (2007).** Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family. *PLoS biology* **5**, e106.
- Garcin, D., Curran, J. & Kolakofsky, D. (2000).** Sendai virus C proteins must interact directly with cellular components to interfere with interferon action. *Journal of virology* **74**, 8823-8830.
- Garcin, D., Marq, J. B., Strahle, L., le Mercier, P. & Kolakofsky, D. (2002).** All four Sendai Virus C proteins bind Stat1, but only the larger forms also induce its mono-ubiquitination and degradation. *Virology* **295**, 256-265.
- Gatherer, D., Seirafian, S., Cunningham, C., Holton, M., Dargan, D. J., Baluchova, K., Hector, R. D., Galbraith, J., Herzyk, P., Wilkinson, G. W. & Davison, A. J. (2011).** High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 19755-19760.
- Gavet, O., Ozon, S., Manceau, V., Lawler, S., Curmi, P. & Sobel, A. (1998).** The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *Journal of cell science* **111** (Pt 22), 3333-3346.
- Geballe, A. P. & Mocarski, E. S. (1988).** Translational control of cytomegalovirus gene expression is mediated by upstream AUG codons. *Journal of virology* **62**, 3334-3340.
- Goodbourn, S., Didcock, L. & Randall, R. E. (2000).** Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *The Journal of general virology* **81**, 2341-2364.
- Grainger, L., Cicchini, L., Rak, M., Petrucelli, A., Fitzgerald, K. D., Semler, B. L. & Goodrum, F. (2010).** Stress-inducible alternative translation initiation of human cytomegalovirus latency protein pUL138. *Journal of virology* **84**, 9472-9486.
- Greaves, R. F., Brown, J. M., Vieira, J. & Mocarski, E. S. (1995).** Selectable insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome using the *Escherichia coli* guanosine phosphoribosyl transferase (gpt) gene. *The Journal of general virology* **76** (Pt 9), 2151-2160.
- Greenaway, P. J. & Wilkinson, G. W. (1987).** Nucleotide sequence of the most abundantly transcribed early gene of human cytomegalovirus strain AD169. *Virus research* **7**, 17-31.
- Griffiths, P. D. & Baboonian, C. (1984).** Intra-uterine transmission of cytomegalovirus in women known to be immune before conception. *The Journal of hygiene* **92**, 89-95.
- Grundhoff, A. & Ganem, D. (2001).** Mechanisms governing expression of the v-FLIP gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology* **75**, 1857-1863.
- Guo, Y. W. & Huang, E. S. (1993).** Characterization of a structurally tricistronic gene of human cytomegalovirus composed of U(s)18, U(s)19, and U(s)20. *Journal of virology* **67**, 2043-2054.

- Guttman, M., Russell, P., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. & Lander, E. S. (2013).** Ribosome profiling provides evidence that large noncoding RNAs do not encode proteins. *Cell* **154**, 240-251.
- Haarr, L., Marsden, H. S., Preston, C. M., Smiley, J. R., Summers, W. C. & Summers, W. P. (1985).** Utilization of internal AUG codons for initiation of protein synthesis directed by mRNAs from normal and mutant genes encoding herpes simplex virus-specified thymidine kinase. *Journal of virology* **56**, 512-519.
- Halenius, A., Gerke, C. & Hengel, H. (2015).** Classical and non-classical MHC I molecule manipulation by human cytomegalovirus: so many targets-but how many arrows in the quiver? *Cellular & molecular immunology* **12**, 139-153.
- Hanash, S. M., Strahler, J. R., Kuick, R., Chu, E. H. & Nichols, D. (1988).** Identification of a polypeptide associated with the malignant phenotype in acute leukemia. *The Journal of biological chemistry* **263**, 12813-12815.
- Hartley, J. L., Temple, G. F. & Brasch, M. A. (2000).** DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research* **10**, 1788-1795.
- Hegde, N. R., Tomazin, R. A., Wisner, T. W., Dunn, C., Boname, J. M., Lewinsohn, D. M. & Johnson, D. C. (2002).** Inhibition of HLA-DR assembly, transport, and loading by human cytomegalovirus glycoprotein US3: a novel mechanism for evading major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Journal of virology* **76**, 10929-10941.
- Hengel, H., Koopmann, J. O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hammerling, G. J., Koszinowski, U. H. & Momburg, F. (1997).** A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* **6**, 623-632.
- Hook, L., Hancock, M., Landais, I., Grabski, R., Britt, W. & Nelson, J. A. (2014).** Cytomegalovirus microRNAs. *Current opinion in virology* **7**, 40-46.
- Horvath, C. M. (2004).** Weapons of STAT destruction. Interferon evasion by paramyxovirus V protein. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**, 4621-4628.
- Houseley, J. & Tollervey, D. (2010).** Apparent non-canonical trans-splicing is generated by reverse transcriptase in vitro. *PloS one* **5**, e12271.
- Howell, B., Larsson, N., Gullberg, M. & Cassimeris, L. (1999).** Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Molecular biology of the cell* **10**, 105-118.
- Huang, L., Zhu, Y. & Anders, D. G. (1996).** The variable 3' ends of a human cytomegalovirus oriLyt transcript (SRT) overlap an essential, conserved replicator element. *Journal of virology* **70**, 5272-5281.
- Hutchinson, N. I. & Tocci, M. J. (1986).** Characterization of a major early gene from the human cytomegalovirus long inverted repeat; predicted amino acid sequence of a 30-kDa protein encoded by the 1.2-kb mRNA. *Virology* **155**, 172-182.
- Ingolia, N. T., Brar, G. A., Stern-Ginossar, N., Harris, M. S., Talhouarne, G. J., Jackson, S. E., Wills, M. R. & Weissman, J. S. (2014).** Ribosome profiling reveals pervasive translation outside of annotated protein-coding genes. *Cell reports* **8**, 1365-1379.
- Isaacs, A. & Lindenmann, J. (1957).** Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **147**, 258-267.
- Isaksson, A., Berggren, M. & Ricksten, A. (2003).** Epstein-Barr virus U leader exon contains an internal ribosome entry site. *Oncogene* **22**, 572-581.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. & Pestova, T. V. (2012).** Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Advances in protein chemistry and structural biology* **86**, 45-93.

- Jeha, S., Luo, X. N., Beran, M., Kantarjian, H. & Atweh, G. F. (1996).** Antisense RNA inhibition of phosphoprotein p18 expression abrogates the transformed phenotype of leukemic cells. *Cancer research* **56**, 1445-1450.
- Jezegou, A., Llinares, E., Anne, C., Kieffer-Jaquinod, S., O'Regan, S., Aupetit, J., Chabli, A., Sagne, C., Debacker, C., Chadefaux-Vekemans, B., Journet, A., Andre, B. & Gasnier, B. (2012).** Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of cysteamine in cystinosis therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, E3434-3443.
- Jia, H., Osak, M., Bogu, G. K., Stanton, L. W., Johnson, R. & Lipovich, L. (2010).** Genome-wide computational identification and manual annotation of human long noncoding RNA genes. *RNA (New York, NY)* **16**, 1478-1487.
- Jones, T. R. & Sun, L. (1997).** Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *Journal of virology* **71**, 2970-2979.
- Jones, T. R., Wiertz, E. J., Sun, L., Fish, K. N., Nelson, J. A. & 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 of the United States of America* **93**, 11327-11333.
- Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C. & Gasnier, B. (2001).** Cystinosis, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *The EMBO journal* **20**, 5940-5949.
- Kang, W., Tong, J. H., Chan, A. W., Lung, R. W., Chau, S. L., Wong, Q. W., Wong, N., Yu, J., Cheng, A. S. & To, K. F. (2012).** Stathmin1 plays oncogenic role and is a target of microRNA-223 in gastric cancer. *PloS one* **7**, e33919.
- Keyes, L. R., Hargett, D., Soland, M., Bego, M. G., Rossetto, C. C., Almeida-Porada, G. & St Jeor, S. (2012).** HCMV protein LUNA is required for viral reactivation from latently infected primary CD14(+) cells. *PloS one* **7**, e52827.
- Khan, S., Zimmermann, A., Basler, M., Groettrup, M. & Hengel, H. (2004).** A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. *Journal of virology* **78**, 1831-1842.
- Kim, H. S. & Lee, M. S. (2007).** STAT1 as a key modulator of cell death. *Cellular signalling* **19**, 454-465.
- Kim, S., Lee, S., Shin, J., Kim, Y., Evnouchidou, I., Kim, D., Kim, Y. K., Kim, Y. E., Ahn, J. H., Riddell, S. R., Stratikos, E., Kim, V. N. & Ahn, K. (2011).** Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1. *Nature immunology* **12**, 984-991.
- Kimura, T., Jiang, S., Nishizawa, M., Yoshigai, E., Hashimoto, I., Nishikawa, M., Okumura, T. & Yamada, H. (2013).** Stabilization of human interferon-alpha1 mRNA by its antisense RNA. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **70**, 1451-1467.
- Kiyosawa, H., Mise, N., Iwase, S., Hayashizaki, Y. & Abe, K. (2005).** Disclosing hidden transcripts: mouse natural sense-antisense transcripts tend to be poly(A) negative and nuclear localized. *Genome research* **15**, 463-474.
- Klemola, E. & Kaariainen, L. (1965).** Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *British medical journal* **2**, 1099-1102.
- Knoblach, T., Grandel, B., Seiler, J., Nevels, M. & Paulus, C. (2011).** Human cytomegalovirus IE1 protein elicits a type II interferon-like host cell response that depends on activated STAT1 but not interferon-gamma. *PLoS pathogens* **7**, e1002016.

- Kondo, T., Hashimoto, Y., Kato, K., Inagaki, S., Hayashi, S. & Kageyama, Y. (2007).** Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA. *Nature cell biology* **9**, 660-665.
- Kotenko, S. V., Saccani, S., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V. & Pestka, S. (2000).** Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 1695-1700.
- Kothari, A., Ramachandran, V. G., Gupta, P., Singh, B. & Talwar, V. (2002).** Seroprevalence of cytomegalovirus among voluntary blood donors in Delhi, India. *Journal of health, population, and nutrition* **20**, 348-351.
- Kouzarides, T., Bankier, A. T., Satchwell, S. C., Preddy, E. & Barrell, B. G. (1988).** An immediate early gene of human cytomegalovirus encodes a potential membrane glycoprotein. *Virology* **165**, 151-164.
- Kozak, M. & Roizman, B. (1975).** RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. IX. Evidence for accumulation of abundant symmetric transcripts in nuclei. *Journal of virology* **15**, 36-40.
- Kraiba, R., Loiseau, P., Faille, A., Poirier, O., Piatier-Tonneau, D., Degos, L., Abita, J. P. & Charron, D. (1989).** HLA-DR and DQ antigens in chronic lymphocytic leukemia: dissociation of expression revealed by cell surface, protein, and mRNA studies. *Leukemia* **3**, 386-393.
- Kronstad, L. M., Brulois, K. F., Jung, J. U. & Glaunsinger, B. A. (2013).** Dual short upstream open reading frames control translation of a herpesviral polycistronic mRNA. *PLoS pathogens* **9**, e1003156.
- Kronstad, L. M., Brulois, K. F., Jung, J. U. & Glaunsinger, B. A. (2014).** Reinitiation after translation of two upstream open reading frames (ORF) governs expression of the ORF35-37 Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus polycistronic mRNA. *Journal of virology* **88**, 6512-6518.
- Kulesza, C. A. & Shenk, T. (2004).** Human cytomegalovirus 5-kilobase immediate-early RNA is a stable intron. *Journal of virology* **78**, 13182-13189.
- Kumar, A. & Herbein, G. (2014).** Epigenetic regulation of human cytomegalovirus latency: an update. *Epigenomics* **6**, 533-546.
- Kumar, M., Keller, B., Makalou, N. & Sutton, R. E. (2001).** Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Human gene therapy* **12**, 1893-1905.
- Lacotte, S., Brun, S., Muller, S. & Dumortier, H. (2009).** CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1173**, 310-317.
- Ladoukakis, E., Pereira, V., Magny, E. G., Eyre-Walker, A. & Couso, J. P. (2011).** Hundreds of putatively functional small open reading frames in *Drosophila*. *Genome biology* **12**, R118.
- Lajo, A., Borque, C., Del Castillo, F. & Martin-Ancel, A. (1994).** Mononucleosis caused by Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in children: a comparative study of 124 cases. *The Pediatric infectious disease journal* **13**, 56-60.
- Landy, A. (1989).** Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual review of biochemistry* **58**, 913-949.
- Le Roy, E., Muhlethaler-Mottet, A., Davrinche, C., Mach, B. & Davignon, J. L. (1999).** Escape of human cytomegalovirus from HLA-DR-restricted CD4(+) T-cell response is mediated by repression of gamma interferon-induced class II transactivator expression. *Journal of virology* **73**, 6582-6589.
- Le, V. T., Trilling, M., Wilborn, M., Hengel, H. & Zimmermann, A. (2008).** Human cytomegalovirus interferes with signal transducer and activator of transcription

- (STAT) 2 protein stability and tyrosine phosphorylation. *The Journal of general virology* **89**, 2416-2426.
- Leach, F. S. & Mocarski, E. S. (1989).** Regulation of cytomegalovirus late-gene expression: differential use of three start sites in the transcriptional activation of ICP36 gene expression. *Journal of virology* **63**, 1783-1791.
- Leatham, M. P., Witte, P. R. & Stinski, M. F. (1991).** Alternate promoter selection within a human cytomegalovirus immediate-early and early transcription unit (UL119-115) defines true late transcripts containing open reading frames for putative viral glycoproteins. *Journal of virology* **65**, 6144-6153.
- Lee, S., Song, J., Kim, S., Kim, J., Hong, Y., Kim, Y., Kim, D., Baek, D. & Ahn, K. (2013).** Selective degradation of host MicroRNAs by an intergenic HCMV noncoding RNA accelerates virus production. *Cell host & microbe* **13**, 678-690.
- Leis, M., Marschall, M. & Stamminger, T. (2004).** Downregulation of the cellular adhesion molecule Thy-1 (CD90) by cytomegalovirus infection of human fibroblasts. *The Journal of general virology* **85**, 1995-2000.
- Libri, V., Helwak, A., Miesen, P., Santhakumar, D., Borger, J. G., Kudla, G., Grey, F., Tollervey, D. & Buck, A. H. (2012).** Murine cytomegalovirus encodes a miR-27 inhibitor disguised as a target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 279-284.
- Liedtke, W., Leman, E. E., Fyffe, R. E., Raine, C. S. & Schubart, U. K. (2002).** Stathmin-deficient mice develop an age-dependent axonopathy of the central and peripheral nervous systems. *The American journal of pathology* **160**, 469-480.
- Lilley, B. N., Ploegh, H. L. & Tirabassi, R. S. (2001).** Human cytomegalovirus open reading frame TRL11/IRL11 encodes an immunoglobulin G Fc-binding protein. *Journal of virology* **75**, 11218-11221.
- Liu, B., Du, H., Rutkowski, R., Gartner, A. & Wang, X. (2012).** LAAT-1 is the lysosomal lysine/arginine transporter that maintains amino acid homeostasis. *Science* **337**, 351-354.
- Liu, J., Prolla, G., Rostagno, A., Chiarle, R., Feiner, H. & Inghirami, G. (2000).** Initiation of translation from a downstream in-frame AUG codon on BRCA1 can generate the novel isoform protein DeltaBRCA1(17aa). *Oncogene* **19**, 2767-2773.
- Liu, Y. & Biegelke, B. J. (2002).** The human cytomegalovirus UL35 gene encodes two proteins with different functions. *Journal of virology* **76**, 2460-2468.
- Lopusna, K., Rezuchova, I., Betakova, T., Skovranova, L., Tomaskova, J., Lukacikova, L. & Kabat, P. (2013).** Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. *Acta virologica* **57**, 171-179.
- Lord, P. C., Rothschild, C. B., DeRose, R. T. & Kilpatrick, B. A. (1989).** Human cytomegalovirus RNAs immunoprecipitated by multiple systemic lupus erythematosus antisera. *The Journal of general virology* **70** (Pt 9), 2383-2396.
- Low, W., Harries, M., Ye, H., Du, M. Q., Boshoff, C. & Collins, M. (2001).** Internal ribosome entry site regulates translation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus FLICE inhibitory protein. *Journal of virology* **75**, 2938-2945.
- Lurain, N. S., Fox, A. M., Lichy, H. M., Bhorade, S. M., Ware, C. F., Huang, D. D., Kwan, S. P., Garrity, E. R. & Chou, S. (2006).** Analysis of the human cytomegalovirus genomic region from UL146 through UL147A reveals sequence hypervariability, genotypic stability, and overlapping transcripts. *Virology journal* **3**, 4.

- Ma, Y., Gao, S., Wang, L., Wang, N., Li, M., Zheng, B., Qi, Y., Sun, Z., Liu, W. & Ruan, Q. (2013).** Analysis and mapping of a 3' coterminal transcription unit derived from human cytomegalovirus open reading frames UL30-UL32. *Virology journal* **10**, 65.
- Ma, Y., Wang, N., Li, M., Gao, S., Wang, L., Zheng, B., Qi, Y. & Ruan, Q. (2012).** Human CMV transcripts: an overview. *Future microbiology* **7**, 577-593.
- Ma, Y. P., Ruan, Q., Ji, Y. H., Wang, N., Li, M. L., Qi, Y., He, R., Sun, Z. R. & Ren, G. W. (2011).** Novel transcripts of human cytomegalovirus clinical strain found by cDNA library screening. *Genetics and molecular research : GMR* **10**, 566-575.
- MacKenzie, C. R., Heseler, K., Muller, A. & Daubener, W. (2007).** Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Current drug metabolism* **8**, 237-244.
- Magny, E. G., Pueyo, J. I., Pearl, F. M., Cespedes, M. A., Niven, J. E., Bishop, S. A. & Couso, J. P. (2013).** Conserved regulation of cardiac calcium uptake by peptides encoded in small open reading frames. *Science* **341**, 1116-1120.
- Majerciak, V., Ni, T., Yang, W., Meng, B., Zhu, J. & Zheng, Z. M. (2013).** A viral genome landscape of RNA polyadenylation from KSHV latent to lytic infection. *PLoS pathogens* **9**, e1003749.
- Mallick, B., Ghosh, Z. & Chakrabarti, J. (2009).** MicroRNome analysis unravels the molecular basis of SARS infection in bronchoalveolar stem cells. *PloS one* **4**, e7837.
- Mao, G., Marotta, F., Yu, J., Zhou, L., Yu, Y., Wang, L. & Chui, D. (2008).** DNA context and promoter activity affect gene expression in lentiviral vectors. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis* **79**, 192-196.
- Mao, Y. S., Sunwoo, H., Zhang, B. & Spector, D. L. (2011).** Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs. *Nature cell biology* **13**, 95-101.
- Marcinowski, L., Tanguy, M., Krmpotic, A., Radle, B., Lisnic, V. J., Tuddenham, L., Chane-Woon-Ming, B., Ruzsics, Z., Erhard, F., Benkartek, C., Babic, M., Zimmer, R., Trgovcich, J., Koszinowski, U. H., Jonjic, S., Pfeffer, S. & Dolken, L. (2012).** Degradation of cellular mir-27 by a novel, highly abundant viral transcript is important for efficient virus replication in vivo. *PLoS pathogens* **8**, e1002510.
- Martel, G., Hevi, C., Wong, A., Zushida, K., Uchida, S. & Shumyatsky, G. P. (2012).** Murine GRPR and stathmin control in opposite directions both cued fear extinction and neural activities of the amygdala and prefrontal cortex. *PloS one* **7**, e30942.
- Martianov, I., Ramadass, A., Serra Barros, A., Chow, N. & Akoulitchev, A. (2007).** Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* **445**, 666-670.
- Matrai, J., Chuah, M. K. & VandenDriessche, T. (2010).** Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **18**, 477-490.
- Maywald, M. (2009).** Untersuchungen zur Expression Interferon-antagonistischer Gene durch das humane Cytomegalovirus. Diplomarbeit an der HHU Düsseldorf.
- McCarthy, M. K. & Weinberg, J. B. (2015).** The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Frontiers in microbiology* **6**, 21.
- McCartney, E. M., Helbig, K. J., Narayana, S. K., Eyre, N. S., Aloia, A. L. & Beard, M. R. (2013).** Signal transducer and activator of transcription 3 is a proviral host factor for hepatitis C virus. *Hepatology (Baltimore, Md)* **58**, 1558-1568.

- McDonough, S. H., Staprans, S. I. & Spector, D. H. (1985).** Analysis of the major transcripts encoded by the long repeat of human cytomegalovirus strain AD169. *Journal of virology* **53**, 711-718.
- McSharry, B. P., Tomasec, P., Neale, M. L. & Wilkinson, G. W. (2003).** The most abundantly transcribed human cytomegalovirus gene (beta 2.7) is non-essential for growth in vitro. *The Journal of general virology* **84**, 2511-2516.
- Mellor, A. L. & Munn, D. H. (2004).** IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews Immunology* **4**, 762-774.
- Miceli, M. V., Newsome, D. A., Novak, L. C. & Beuerman, R. W. (1989).** Cytomegalovirus replication in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Current eye research* **8**, 835-839.
- Miller, D. M., Rahill, B. M., Boss, J. M., Lairmore, M. D., Durbin, J. E., Waldman, J. W. & Sedmak, D. D. (1998).** Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *The Journal of experimental medicine* **187**, 675-683.
- Miller, D. M., Zhang, Y., Rahill, B. M., Waldman, W. J. & Sedmak, D. D. (1999).** Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **162**, 6107-6113.
- Morimoto, Y., Toyota, M., Satoh, A., Murai, M., Mita, H., Suzuki, H., Takamura, Y., Ikeda, H., Ishida, T., Sato, N., Tokino, T. & Imai, K. (2004).** Inactivation of class II transactivator by DNA methylation and histone deacetylation associated with absence of HLA-DR induction by interferon-gamma in haematopoietic tumour cells. *British journal of cancer* **90**, 844-852.
- Müller, N. (2015).** Expressionsanalyse HCMV-codierter polyadenylierter mRNAs. Bachelorarbeit an der HHU Düsseldorf.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M. & Aguet, M. (1994).** Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**, 1918-1921.
- Murphy, E., Rigoutsos, I., Shibuya, T. & Shenk, T. E. (2003a).** Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13585-13590.
- Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M. A., Hahn, G., Nelson, J. A., Myers, R. M. & Shenk, T. E. (2003b).** Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 14976-14981.
- Ng, D. C., Lin, B. H., Lim, C. P., Huang, G., Zhang, T., Poli, V. & Cao, X. (2006).** Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. *The Journal of cell biology* **172**, 245-257.
- O'Donovan, K. J. & Baraban, J. M. (1999).** Major Egr3 isoforms are generated via alternate translation start sites and differ in their abilities to activate transcription. *Molecular and cellular biology* **19**, 4711-4718.
- Odeberg, J., Plachter, B., Branden, L. & Soderberg-Naucler, C. (2003).** Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR alpha-chain. *Blood* **101**, 4870-4877.
- Othman, Z., Sulaiman, M. K., Willcocks, M. M., Ulryck, N., Blackbourn, D. J., Sargueil, B., Roberts, L. O. & Locker, N. (2014).** Functional analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vFLIP expression reveals a new mode of IRES-mediated translation. *RNA (New York, NY)* **20**, 1803-1814.

- Ozon, S., Maucuer, A. & Sobel, A. (1997).** The stathmin family -- molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system. *European journal of biochemistry / FEBS* **248**, 794-806.
- Pallotta, M. T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Bicciato, S., Mazza, E. M., Boon, L., Grassi, F., Fioretti, M. C., Fallarino, F., Puccetti, P. & Grohmann, U. (2011).** Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature immunology* **12**, 870-878.
- Park, B., Kim, Y., Shin, J., Lee, S., Cho, K., Fruh, K., Lee, S. & Ahn, K. (2004).** Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent peptide loading and optimization of the MHC class I peptide cargo for immune evasion. *Immunity* **20**, 71-85.
- Pass, R. F., Fowler, K. B., Boppana, S. B., Britt, W. J. & Stagno, S. (2006).** Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **35**, 216-220.
- Paulus, C., Krauss, S. & Nevels, M. (2006).** A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 3840-3845.
- Peng, X., Gralinski, L., Armour, C. D., Ferris, M. T., Thomas, M. J., Proll, S., Bradel-Tretheway, B. G., Korth, M. J., Castle, J. C., Biery, M. C., Bouzek, H. K., Haynor, D. R., Frieman, M. B., Heise, M., Raymond, C. K., Baric, R. S. & Katze, M. G. (2010).** Unique signatures of long noncoding RNA expression in response to virus infection and altered innate immune signaling. *mBio* **1**.
- Perng, G. C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S. M., Hofman, F. M., Ghiasi, H., Nesburn, A. B. & Wechsler, S. L. (2000).** Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* **287**, 1500-1503.
- Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. (2004).** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological reviews* **202**, 8-32.
- Phillips, A. J., Tomasec, P., Wang, E. C., Wilkinson, G. W. & Borysiewicz, L. K. (1998).** Human cytomegalovirus infection downregulates expression of the cellular aminopeptidases CD10 and CD13. *Virology* **250**, 350-358.
- Platanias, L. C. (2005).** Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews Immunology* **5**, 375-386.
- Ponjavic, J., Ponting, C. P. & Lunter, G. (2007).** Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs. *Genome research* **17**, 556-565.
- Poole, E., King, C. A., Sinclair, J. H. & Alcami, A. (2006).** The UL144 gene product of human cytomegalovirus activates NFkappaB via a TRAF6-dependent mechanism. *The EMBO journal* **25**, 4390-4399.
- Preuten, M. (2011).** Sequenzanalyse HCMV-kodierter Transkripte einer cDNA-Bank. Bachelorarbeit an der HHU Düsseldorf.
- Preuten, M. (2013).** Expressionskinetik und immunevasives Potential nicht-kodierender *TRL*-Transkripte des Humanen Cytomegalovirus. Masterarbeit an der HHU Düsseldorf.
- Prichard, M. N., Jairath, S., Penfold, M. E., St Jeor, S., Bohlman, M. C. & Pari, G. S. (1998).** Identification of persistent RNA-DNA hybrid structures within the origin of replication of human cytomegalovirus. *Journal of virology* **72**, 6997-7004.
- Prod'homme, V., Tomasec, P., Cunningham, C., Lemberg, M. K., Stanton, R. J., McSharry, B. P., Wang, E. C., Cuff, S., Martoglio, B., Davison, A. J., Braud, V. M. & Wilkinson, G. W. (2012).** Human cytomegalovirus UL40 signal peptide

- regulates cell surface expression of the NK cell ligands HLA-E and gpUL18. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **188**, 2794-2804.
- Qi, Y., Ma, Y., He, R., Wang, N., Ruan, Q., Ji, Y., Li, M., Sun, Z. & Ren, G. (2011).** Characterization of 3' termini of human cytomegalovirus UL138-UL145 transcripts in a clinical strain. *Microbiology and immunology* **55**, 95-99.
- Qian, Z., Xuan, B., Hong, T. T. & 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**, 3452-3465.
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hulur, I., Xiang, A. P., Ren, B. Z. & Lahn, B. T. (2010).** Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PloS one* **5**, e10611.
- Rawlinson, W. D. & Barrell, B. G. (1993).** Spliced transcripts of human cytomegalovirus. *Journal of virology* **67**, 5502-5513.
- Reeves, M. B., Davies, A. A., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W. & Sinclair, J. H. (2007).** Complex I binding by a virally encoded RNA regulates mitochondria-induced cell death. *Science* **316**, 1345-1348.
- Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E. & Chang, H. Y. (2007).** Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**, 1311-1323.
- Rogozin, I. B., Kochetov, A. V., Kondrashov, F. A., Koonin, E. V. & Milanesi, L. (2001).** Presence of ATG triplets in 5' untranslated regions of eukaryotic cDNAs correlates with a 'weak' context of the start codon. *Bioinformatics (Oxford, England)* **17**, 890-900.
- Romanowski, M. J. & Shenk, T. (1997).** Characterization of the human cytomegalovirus irs1 and trs1 genes: a second immediate-early transcription unit within irs1 whose product antagonizes transcriptional activation. *Journal of virology* **71**, 1485-1496.
- Ross, S. A. & Boppana, S. B. (2005).** Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Seminars in pediatric infectious diseases* **16**, 44-49.
- Rossetto, C. C. & Pari, G. S. (2014).** PAN's Labyrinth: Molecular biology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) PAN RNA, a multifunctional long noncoding RNA. *Viruses* **6**, 4212-4226.
- Rossetto, C. C., Tarrant-Elorza, M. & Pari, G. S. (2013).** Cis and trans acting factors involved in human cytomegalovirus experimental and natural latent infection of CD14 (+) monocytes and CD34 (+) cells. *PLoS pathogens* **9**, e1003366.
- Rowlands, D. C., Williams, A., Jones, N. A., Guest, S. S., Reynolds, G. M., Barber, P. C. & Brown, G. (1995).** Stathmin expression is a feature of proliferating cells of most, if not all, cell lineages. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **72**, 100-113.
- Ruger, B., Klages, S., Walla, B., Albrecht, J., Fleckenstein, B., Tomlinson, P. & Barrell, B. (1987).** Primary structure and transcription of the genes coding for the two virion phosphoproteins pp65 and pp71 of human cytomegalovirus. *Journal of virology* **61**, 446-453.
- Ruivo, R., Belenchi, G. C., Chen, X., Zifarelli, G., Sagne, C., Debacker, C., Pusch, M., Supplisson, S. & Gasnier, B. (2012).** Mechanism of proton/substrate coupling in the heptahelical lysosomal transporter cystinosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, E210-217.

- Salsman, J., Zimmerman, N., Chen, T., Domagala, M. & Frappier, L. (2008).** Genome-wide screen of three herpesviruses for protein subcellular localization and alteration of PML nuclear bodies. *PLoS pathogens* **4**, e1000100.
- Schoenberg, D. R. & Maquat, L. E. (2012).** Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature reviews Genetics* **13**, 246-259.
- Schubart, U. K., Yu, J., Amat, J. A., Wang, Z., Hoffmann, M. K. & Edelmann, W. (1996).** Normal development of mice lacking metablastin (P19), a phosphoprotein implicated in cell cycle regulation. *The Journal of biological chemistry* **271**, 14062-14066.
- Sheth, N., Roca, X., Hastings, M. L., Roeder, T., Krainer, A. R. & Sachidanandam, R. (2006).** Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics. *Nucleic acids research* **34**, 3955-3967.
- Shevtsov, S. P. & Dundr, M. (2011).** Nucleation of nuclear bodies by RNA. *Nature cell biology* **13**, 167-173.
- Shumyatsky, G. P., Malleret, G., Shin, R. M., Takizawa, S., Tully, K., Tsvetkov, E., Zakharenko, S. S., Joseph, J., Vronskaya, S., Yin, D., Schubart, U. K., Kandel, E. R. & Bolshakov, V. Y. (2005).** stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear. *Cell* **123**, 697-709.
- Sinzger, C., Hahn, G., Digel, M., Katona, R., Sampaio, K. L., Messerle, M., Hengel, H., Koszinowski, U., Brune, W. & Adler, B. (2008).** Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *The Journal of general virology* **89**, 359-368.
- Sinzger, C., Schmidt, K., Knapp, J., Kahl, M., Beck, R., Waldman, J., Hebart, H., Einsele, H. & Jahn, G. (1999).** Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *The Journal of general virology* **80** (Pt 11), 2867-2877.
- Skalamera, D., Dahmer, M., Purdon, A. S., Wilson, B. M., Ranall, M. V., Blumenthal, A., Gabrielli, B. & Gonda, T. J. (2012).** Generation of a genome scale lentiviral vector library for EF1alpha promoter-driven expression of human ORFs and identification of human genes affecting viral titer. *PloS one* **7**, e51733.
- Skalamera, D., Ranall, M. V., Wilson, B. M., Leo, P., Purdon, A. S., Hyde, C., Nourbakhsh, E., Grimmond, S. M., Barry, S. C., Gabrielli, B. & Gonda, T. J. (2011).** A high-throughput platform for lentiviral overexpression screening of the human ORFeome. *PloS one* **6**, e20057.
- Skaletskaya, A., Bartle, L. M., Chittenden, T., McCormick, A. L., Mocarski, E. S. & Goldmacher, V. S. (2001).** A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7829-7834.
- Smuda, C., Bogner, E. & Radsak, K. (1997).** The human cytomegalovirus glycoprotein B gene (ORF UL55) is expressed early in the infectious cycle. *The Journal of general virology* **78** (Pt 8), 1981-1992.
- Sobel, A. & Tashjian, A. H., Jr. (1983).** Distinct patterns of cytoplasmic protein phosphorylation related to regulation of synthesis and release of prolactin by GH cells. *The Journal of biological chemistry* **258**, 10312-10324.
- Spector, D. H. (1996).** Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* **39**, 361-377.
- Spiller, O. B., Morgan, B. P., Tufaro, F. & Devine, D. V. (1996).** Altered expression of host-encoded complement regulators on human cytomegalovirus-infected cells. *European journal of immunology* **26**, 1532-1538.

- Stagno, S., Pass, R. F., Dworsky, M. E., Henderson, R. E., Moore, E. G., Walton, P. D. & Alford, C. A. (1982).** Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *The New England journal of medicine* **306**, 945-949.
- Stamminger, T., Gstaiger, M., Weinzierl, K., Lorz, K., Winkler, M. & 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**, 4836-4847.
- Staras, S. A., Dollard, S. C., Radford, K. W., Flanders, W. D., Pass, R. F. & Cannon, M. J. (2006).** Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **43**, 1143-1151.
- Stenberg, R. M., Witte, P. R. & Stinski, M. F. (1985).** Multiple spliced and unspliced transcripts from human cytomegalovirus immediate-early region 2 and evidence for a common initiation site within immediate-early region 1. *Journal of virology* **56**, 665-675.
- Stephan, T. (2014).** Vergleichende Sequenzanalyse HCMV-kodierter Transkripte aus cDNA-Banken nach Isolierung von 5'-capped mRNA. Bachelorarbeit an der HHU Düsseldorf.
- Stern-Ginossar, N., Weisburd, B., Michalski, A., Le, V. T., Hein, M. Y., Huang, S. X., Ma, M., Shen, B., Qian, S. B., Hengel, H., Mann, M., Ingolia, N. T. & Weissman, J. S. (2012).** Decoding human cytomegalovirus. *Science* **338**, 1088-1093.
- Sun, Z., Ren, G., Ma, Y., Wang, N., Ji, Y., Qi, Y., Li, M., He, R. & Ruan, Q. (2010).** Transcription pattern of UL131A-128 mRNA in clinical strains of human cytomegalovirus. *Journal of biosciences* **35**, 365-370.
- Tahiri-Alaoui, A., Matsuda, D., Xu, H., Panagiotis, P., Burman, L., Lambeth, L. S., Petherbridge, L., James, W., Mauro, V. & Nair, V. (2009a).** The 5' leader of the mRNA encoding the maret's disease virus serotype 1 pp14 protein contains an intronic internal ribosome entry site with allosteric properties. *Journal of virology* **83**, 12769-12778.
- Tahiri-Alaoui, A., Smith, L. P., Baigent, S., Kgosana, L., Petherbridge, L. J., Lambeth, L. S., James, W. & Nair, V. (2009b).** Identification of an intercistronic internal ribosome entry site in a Marek's disease virus immediate-early gene. *Journal of virology* **83**, 5846-5853.
- Taylor, G. A., Feng, C. G. & Sher, A. (2004).** p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nature reviews Immunology* **4**, 100-109.
- Taylor, R. T. & Bresnahan, W. A. (2006a).** Human cytomegalovirus IE86 attenuates virus- and tumor necrosis factor alpha-induced NFkappaB-dependent gene expression. *Journal of virology* **80**, 10763-10771.
- Taylor, R. T. & Bresnahan, W. A. (2006b).** Human cytomegalovirus immediate-early 2 protein IE86 blocks virus-induced chemokine expression. *Journal of virology* **80**, 920-928.
- Temin, H. M. (1993).** Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6900-6903.
- Tenney, D. J. & Colberg-Poley, A. M. (1991).** Expression of the human cytomegalovirus UL36-38 immediate early region during permissive infection. *Virology* **182**, 199-210.
- Tian, B., Hu, J., Zhang, H. & Lutz, C. S. (2005).** A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic acids research* **33**, 201-212.

- Tomasec, P., Braud, V. M., Rickards, C., Powell, M. B., McSharry, B. P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L. K., McMichael, A. J. & Wilkinson, G. W. (2000).** Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* **287**, 1031.
- Tomasec, P., Wang, E. C., Davison, A. J., Vojtesek, B., Armstrong, M., Griffin, C., McSharry, B. P., Morris, R. J., Llewellyn-Lacey, S., Rickards, C., Nomoto, A., Sinzger, C. & Wilkinson, G. W. (2005).** Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nature immunology* **6**, 181-188.
- Tomazin, R., Boname, J., Hegde, N. R., Lewinsohn, D. M., Altschuler, Y., Jones, T. R., Cresswell, P., Nelson, J. A., Riddell, S. R. & Johnson, D. C. (1999).** Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nature medicine* **5**, 1039-1043.
- Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S. A., Callen, D. F., Gribouval, O., Broyer, M., Bates, G. P., van't Hoff, W. & Antignac, C. (1998).** A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nature genetics* **18**, 319-324.
- Trgovcich, J., Cebulla, C., Zimmerman, P. & Sedmak, D. D. (2006).** Human cytomegalovirus protein pp71 disrupts major histocompatibility complex class I cell surface expression. *Journal of virology* **80**, 951-963.
- Trilling, M., Le, V. T. & Hengel, H. (2012).** Interplay between CMVs and interferon signaling: implications for pathogenesis and therapeutic intervention. *Future microbiology* **7**, 1269-1282.
- Ulbrecht, M., Martinozzi, S., Grzeschik, M., Hengel, H., Ellwart, J. W., Pla, M. & Weiss, E. H. (2000).** Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **164**, 5019-5022.
- Van Damme, E. & Van Loock, M. (2014).** Functional annotation of human cytomegalovirus gene products: an update. *Frontiers in microbiology* **5**, 218.
- Varnum, S. M., Streblow, D. N., Monroe, M. E., Smith, P., Auberry, K. J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D. G., 2nd, Rodland, K., Wiley, S., Britt, W., Shenk, T., Smith, R. D. & Nelson, J. A. (2004).** Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *Journal of virology* **78**, 10960-10966.
- Vattem, K. M. & Wek, R. C. (2004).** Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 11269-11274.
- Vavouri, T., Semple, J. I., Garcia-Verdugo, R. & Lehner, B. (2009).** Intrinsic protein disorder and interaction promiscuity are widely associated with dosage sensitivity. *Cell* **138**, 198-208.
- Verma, N. K., Doulat, J., Davies, A. M., Long, A., Liu, W. Q., Garbay, C., Kelleher, D. & Volkov, Y. (2009).** STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells. *The Journal of biological chemistry* **284**, 12349-12362.
- Wang, S. K., Hu, C. H., Lu, M. C., Duh, C. Y., Liao, P. C. & Tyan, Y. C. (2009a).** Novel virus-associated proteins encoded by UL112-113 of human cytomegalovirus. *The Journal of general virology* **90**, 2840-2848.
- Wang, X., Ye, L., Hou, W., Zhou, Y., Wang, Y. J., Metzger, D. S. & Ho, W. Z. (2009b).** Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection. *Blood* **113**, 671-674.

- Wang, X. Q. & Rothnagel, J. A. (2004).** 5'-untranslated regions with multiple upstream AUG codons can support low-level translation via leaky scanning and reinitiation. *Nucleic acids research* **32**, 1382-1391.
- Welch, A. R., McGregor, L. M. & Gibson, W. (1991).** Cytomegalovirus homologs of cellular G protein-coupled receptor genes are transcribed. *Journal of virology* **65**, 3915-3918.
- Wen, Z. & Darnell, J. E., Jr. (1997).** Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic acids research* **25**, 2062-2067.
- Wen, Z., Zhong, Z. & Darnell, J. E., Jr. (1995).** Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**, 241-250.
- Wetzler, M., McElwain, B. K., Stewart, C. C., Blumenson, L., Mortazavi, A., Ford, L. A., Slack, J. L., Barcos, M., Ferrone, S. & Baer, M. R. (2003).** HLA-DR antigen-negative acute myeloid leukemia. *Leukemia* **17**, 707-715.
- Wiertz, E. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H. J. & Ploegh, H. L. (1996a).** The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* **84**, 769-779.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A. & Ploegh, H. L. (1996b).** Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**, 432-438.
- Wight, M. & Werner, A. (2013).** The functions of natural antisense transcripts. *Essays in biochemistry* **54**, 91-101.
- Wilkinson, G. W., Tomasec, P., Stanton, R. J., Armstrong, M., Prod'homme, V., Aicheler, R., McSharry, B. P., Rickards, C. R., Cochrane, D., Llewellyn-Lacey, S., Wang, E. C., Griffin, C. A. & Davison, A. J. (2008).** Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **41**, 206-212.
- Wing, B. A. & Huang, E. S. (1995).** Analysis and mapping of a family of 3'-coterminal transcripts containing coding sequences for human cytomegalovirus open reading frames UL93 through UL99. *Journal of virology* **69**, 1521-1531.
- Wong, Q. W., Lung, R. W., Law, P. T., Lai, P. B., Chan, K. Y., To, K. F. & Wong, N. (2008).** MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology* **135**, 257-269.
- Wright, D. A. & Spector, D. H. (1989).** Posttranscriptional regulation of a class of human cytomegalovirus phosphoproteins encoded by an early transcription unit. *Journal of virology* **63**, 3117-3127.
- Wu, N., Gao, N., Fan, D., Wei, J., Zhang, J. & An, J. (2014).** miR-223 inhibits dengue virus replication by negatively regulating the microtubule-destabilizing protein STMN1 in EAhy926 cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **16**, 911-922.
- Xu, Y. & Ganem, D. (2010).** Making sense of antisense: seemingly noncoding RNAs antisense to the master regulator of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication do not regulate that transcript but serve as mRNAs encoding small peptides. *Journal of virology* **84**, 5465-5475.
- Yaman, I., Fernandez, J., Liu, H., Caprara, M., Komar, A. A., Koromilas, A. E., Zhou, L., Snider, M. D., Scheuner, D., Kaufman, R. J. & Hatzoglou, M. (2003).** The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* **113**, 519-531.
- Yewdell, J. W. (2011).** DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends in immunology* **32**, 548-558.

- Zandi, F., Eslami, N., Soheili, M., Fayaz, A., Gholami, A. & Vaziri, B. (2009).** Proteomics analysis of BHK-21 cells infected with a fixed strain of rabies virus. *Proteomics* **9**, 2399-2407.
- Zhang, G., Raghavan, B., Kotur, M., Cheatham, J., Sedmak, D., Cook, C., Waldman, J. & Trgovcich, J. (2007).** Antisense transcription in the human cytomegalovirus transcriptome. *Journal of virology* **81**, 11267-11281.
- Zhang, Y., Liu, X. S., Liu, Q. R. & Wei, L. (2006).** Genome-wide in silico identification and analysis of cis natural antisense transcripts (cis-NATs) in ten species. *Nucleic acids research* **34**, 3465-3475.
- Zimmermann, A., Hauka, S., Maywald, M., Le, V. T., Schmidt, S. K., Daubener, W. & Hengel, H. (2014).** Checks and balances between human cytomegalovirus replication and indoleamine-2,3-dioxygenase. *The Journal of general virology* **95**, 659-670.
- Zimmermann, A., Trilling, M., Wagner, M., Wilborn, M., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U. & Hengel, H. (2005).** A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1543-1553.

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin bzw. Ampere
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazol
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Ak	Antikörper
<i>AmpR</i>	Ampicillin-Resistenz-Gen
AP	alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i> bzw. Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
as	<i>antisense</i>
ATCC	<i>american type culture collection</i>
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>att</i>	<i>attachment</i> , Rekombinationsstellen des Bakteriophagen λ
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
β 2m	β 2-Microglobulin
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CIITA	<i>class II transactivator</i>
<i>ccdB</i>	<i>control of cell death B</i>
CCMV	Cytomegalovirus der Schimpansen
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDP-Star	Chemilumineszenzsubstrat der alkalischen Phosphatase: $C_{18}H_{19}Cl_2O_7Na_2P$
CLIP	<i>class II associated invariant chain peptide</i>
<i>CmR</i>	Chloramphenicol-Resistenz-Gen
CPE	Cytopathischer Effekt infizierter Zellen
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ctrl	Kontrolle
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2-Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	alle vier 2-Desoxy-Nukleotide (A, T, C, G)
ds	Doppelstrang/doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	<i>early</i>
EBER	<i>EBV-encoded small RNA</i>
EBNA1	<i>EBV nuclear antigen 1</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus

ABKÜRZUNGEN

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	cDNA-Klon im pENTR Vektor, isoliert 24 hpi
EF1 α	<i>elongation factor 1α</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eIF	eukaryotischer Translations-Initiations-Faktor
EL	cDNA-Klon im pENTR Vektor, isoliert 72 hpi
<i>env</i>	<i>envelope</i> , Gen der HIV Glykoproteine
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAP1	<i>endoplasmic reticulum aminopeptidase 1</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
fwd	<i>forward</i>
G	Guanin
GAF	<i>gamma activated factor</i>
<i>gag</i>	<i>group-specific antigen</i> , Gen der HIV Strukturproteine
GAS	<i>gamma activated sequence</i>
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HHV	humanes Herpesvirus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
hpi	Stunden <i>post infection</i>
HSUR	Herpesvirus saimiri U RNA
HSV	Herpes simplex Virus
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
IFNAR	IFN α -Rezeptorkette
IFNGR	IFN γ -Rezeptorkette
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
iORF	interner ORF
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
IRL	<i>internal repeat long</i>
IRS	<i>internal repeat short</i>
ISG	<i>interferon stimulated gene</i>
ISGF3	<i>interferon stimulated gene factor 3</i>
ISRE	<i>interferon stimulated response element</i>
IU	<i>infectious units</i>
Jak	Janus-Kinase
k	Kilo (1000)
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton

ABKÜRZUNGEN

KSHV	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus
l	Liter
L	<i>late</i>
LAT	HSV-1 <i>latency-associated transcript</i>
LB	Luria-Bertani
LEMD2	<i>lamina-associated polypeptide 2/emerin/Man1 domain containing 2</i>
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
LTR	HIV <i>long terminal repeat</i>
LUNA	<i>latency unique natural antigen</i>
m	Milli (1/1000)
M	molare Masse
μ	Mikro (1/10 ⁶)
MIIC	<i>MHC class II containing compartment</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCMV	murines Cytomegalovirus
MDV	<i>Marek's disease virus</i>
ME	cDNA-Klon im pMACE Vektor, isoliert 24 hpi
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIEP	<i>major immediate early promoter</i>
min	Minute
miRDE	<i>miRNA decay element</i>
miRNA	microRNA
ML	cDNA-Klon im pMACE Vektor, isoliert 72 hpi
mock	uninfiziert, aber gleich behandelt
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRPS17	<i>mitochondrial ribosomal protein S17</i>
n	nano (1/10 ⁹)
NCBI	<i>national center for biotechnology information</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NP-40	Nonidet P-40 Detergenz
N-Terminus	Amino-Terminus
OAS	2'-5'-Oligoadenylatsynthetase
OD	optische Dichte
Op18	Onkoprotein 18
ORF	<i>open reading frame</i>
oriLyt	<i>origin of lytic DNA replication</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PAN RNA	KSHV <i>polyadenylated nuclear RNA</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PEI	Polyethylenimin
pfu	<i>plaque forming units</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKA	Proteinkinase A
PKR	Proteinkinase R

ABKÜRZUNGEN

PLC	<i>peptide loading complex</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
<i>pol</i>	<i>polymerase</i> , Gen der HIV reversen Transkriptase, Integrase und Protease
pp	Phosphoprotein
PQLC2	<i>PQ loop repeat containing 2</i>
PRC2	<i>polycomb repression complex 2</i>
rev	<i>reverse</i>
RhCMV	Cytomegalovirus der Rhesus-Makaken
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rORF	ORF, der für weniger als 20 Aminosäuren kodiert
RPE	<i>retinal pigment epithelium</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RRE	<i>rev responsive element</i>
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>
RT	reverse Transkriptase
RTA	<i>KSHV replication and transcription activator</i>
S	Svedberg
SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i>
SCG10	<i>superior cervical ganglion-10</i>
SCLIP	<i>SCG-10 like protein</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde
Ser	Serin
SeV C	C-Protein des Sendaivirus
SHP2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2</i>
SLD	<i>stathmin-like domain</i>
SMART	<i>switching mechanism at 5' end of RNA template</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
SPA	<i>sequential peptide affinity</i>
SRT	<i>smallest replicator transcript</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
<i>STMN1</i>	Stathmin-1 Gen
T	Thymin
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	<i>tris buffered saline + Tween-20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thy1	<i>thymocyte differentiation antigen 1</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TRL	<i>terminal repeat long</i>
tRNA	<i>transfer RNA</i>
TRS	<i>terminal repeat short</i>
<i>TSSC4</i>	<i>tumor suppressing subtransferable candidate 4</i>
Tyk	Tyrosin-Kinase

Tyr	Tyrosin
U	Uracil bzw. spezifische Aktivität in <i>units</i>
üN	über Nacht
<i>UL</i>	<i>unique long</i>
uORF	<i>upstream</i> ORF
<i>US</i>	<i>unique short</i>
USA	<i>United States of America</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VA RNA	Adenovirus <i>viral associated</i> RNA
vFLIP	<i>viral FLICE inhibitory protein</i>
vICA	<i>viral inhibitor of caspase-8-induced apoptosis</i>
vRNA	HCMV <i>viral</i> RNA
VSV-G	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus
v/v	<i>volume per volume</i>
WB	Western Blot
w/o	<i>without</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
wt	Wildtyp
<i>YBX3</i>	<i>Y box binding protein 3</i>
z.B.	zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Jak/STAT Signaltransduktion 11

Abb. 2.1: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese 22

Abb. 2.2: Klonierung der cDNAs mittels homologer Rekombination 23

Abb. 2.3: 5'-Cap Selektion erhöht die cDNA-Insertgröße 24

Abb. 2.4: 5'-Cap Selektion reichert *full length* cDNAs an 25

Abb. 2.5: cDNA-Bank enthält HCMV Transkripte geringer Abundanz 26

Abb. 2.6: Selektion HCMV-kodierender cDNAs 27

Abb. 2.7: Insertgrößen viraler Transkripte der cDNA-Bank 28

Abb. 2.8: Gleichmäßige Verteilung der cDNAs im HCMV Genom 30

Abb. 2.9: HCMV cDNA-Bank deckt 83% des viralen Transkriptoms ab 31

Abb. 2.10: Die meisten cDNAs besitzen Kodierungspotential 33

Abb. 2.11: Polycistronische mRNAs überwiegen im HCMV Transkriptom 34

Abb. 2.12: Monocistronische HCMV mRNAs 35

Abb. 2.13: Coterminale 3'-Enden sind verbreitet in HCMV Transkripten 36

Abb. 2.14: Neu identifizierte ORFs an der 5'-nächstliegenden Position der cDNAs 37

Abb. 2.15: uORFs *upstream* von klassischen HCMV ORFs 38

Abb. 2.16: cDNAs mit ausschließlichem Kodierungspotential für neu identifizierte ORFs 39

Abb. 2.17: Potentielle neue HCMV ORFs 40

Abb. 2.18: Nicht kodierende cDNAs – lncRNAs und *antisense* Transkripte 42

Abb. 2.19: HCMV *antisense* Transkripte 42

Abb. 2.20: lncRNA2.7 im Überstand der 5'-Cap Aufreinigung 44

Abb. 2.21: Klonierung des lentiviralen Expressionsvektors pMACE 47

Abb. 2.22: Funktionelle Elemente von pMACE 48

Abb. 2.23: Überführung der cDNA-Bank in den Expressionsvektor pMACE 49

Abb. 2.24: Inserts der cDNA-Bank nach Rekombination in pMACE 50

Abb. 2.25: Titerbestimmung der lentiviralen Partikel.....	51
Abb. 2.26: Anreicherung transduzierter Zellen im FACS-Sorter.....	52
Abb. 2.27: Expressionsnachweis einer transduzierten viralen cDNA.....	53
Abb. 2.28: Inhibition der IFN- γ Signaltransduktion durch HCMV	54
Abb. 2.29: Prinzip des FACS-Screenings	55
Abb. 2.30: HLA-DR als eindeutiger FACS-Marker IFN- γ -sensitiver RPE Zellen.....	57
Abb. 2.31: SeV C-Protein als Modell-IFN-Antagonist	58
Abb. 2.32: Anreicherung SeV C transduzierter Zellen durch FACS Sortierung.....	59
Abb. 2.33: Sortierungsschema in Abhängigkeit von der HLA-DR Expression.....	60
Abb. 2.34: Erhöhte HLA-DR Expression in HLA-DR ^{hoch} Subpopulation	61
Abb. 2.35: Anreicherung einer HLA-DR ^{niedrig} Subpopulation.....	63
Abb. 2.36: Einzelzellsortierungen der HLA-DR ^{niedrig} Subpopulation.....	64
Abb. 2.37: Inhibition des IFN- γ Signalwegs in der HLA-DR ^{niedrig} Subpopulation	66
Abb. 2.38: Stathmin-1 cDNA integriert in HLA-DR ^{niedrig} Subpopulation.....	67
Abb. 2.39: Stathmin-1 Transkriptvarianten.....	68
Abb. 2.40: Stathmin-1 Überexpression nach Transfektion	68
Abb. 2.41: Stathmin-1 reduziert IFN- γ induzierte HLA-DR Expression.....	69
Abb. S1: Sequenz der isolierten Stathmin-1 cDNA	137

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: Anteile HCMV kodierter Transkripte der cDNA-Bank	27
Tab. 2.2: Spleißstellen der viralen Transkripte	45
Tab. 2.3: Expression von <i>ccdB</i> verhindert Wachstum nicht-rekombinierter Klone.....	49
Tab. 4.1: Klonierungsprimer	93
Tab. 4.2: HCMV PCR-Kontrollprimer.....	94
Tab. 4.3: Standard-Sequenzierprimer.....	94
Tab. 4.4: Sequenzierprimer von viralen Klonen	95
Tab. 4.5: WB und FACS Antikörper.....	96
Tab. 4.6: Zusammensetzung der SDS-Gele	107
Tab. S1: Zelluläre Transkripte der cDNA-Bank	138
Tab. S2: HCMV Transkripte der cDNA-Bank und deren Kodierungspotential	140

ANHANG

Zusätzliche Abbildungen und Tabellen

5'-

agagtgtggtcagggcgctcggactgagcaggacttccctatcccagttgattgtgcagaatacactgcctgtcgcttgtcttctattcac
 catggcttctctgatatccaggtgaaagaactggagaagcgtgcctcaggccaggctttgagctgattctcagccctcggtcaaaaga
 atctgtccagaattcccccttccctccaaagaagaaggatcttccctggaggaaattcagaagaattagaagctgcagaagaag
 acgcaagtcccatgaagctgaggtcttgaagcagctggctgagaaacgagagcacgagaaagaagtgttcagaaggcaatagaag
 agaacaacaactcagtaaaatggcagaagagaactgaccacaaaatggaaagctataaagagaaccgagaggcacaatggct
 gccaaactggaacgtttgcgagagaaggataagcacattgaagaagtgcggaagaacaagaatccaaagaccctgctgacgagac
 tgaagctgactaattgttctgagaactgactttcctccatccctcctaaatccaaagactgtactggccagtgtcatttttttccc
 tctgacaaatattttagaagctaatgtaggactgtataggtatccagatccagactgtaagatggtgttttaggggctaaaggggaga
 aactgaaagtgtttactcttttctaaagtgttggtctttctaatgtagctattttctgttgcacttttctacttcagtacacttggtgactggg
 ttaatggctagtagtattggctctgtgaaaacatattgtgaaaagagtatgtagtggctcttttgaactgtagatgctgaatatctgttca
 ctttcaatccaattctgtccaatctaccagatgctactggactgaaatggttaataaaaactgcacagtgtgttggtggc-Poly(a)-
 3'

Abb. S1: Sequenz der isolierten Stathmin-1 cDNA

Stathmin-1 cDNA aus Präparationen genomischer DNA der HLA-DR^{niedrig} Subpopulation wurde per PCR amplifiziert (Abb. 2.38) und sequenziert.

ANHANG

Gen	Abstand [bp]	Gen	Abstand [bp]
ADDA	-148	MEAF6	-25
ARPC3	-92	MICA	-36
ATP6AP1	-56	MRPS17	25
ATP6V1C1	-83	NDFIP1	-29
B2M	-27	NDUFAF1	0
CAP	-191	NDUFV2	-83
CASP6	-29	NEMF	0
CCNB1	-140	OTULIN	0
CHD1L	-41	PFN1	-526
CHST2	-31	PLEKHB2	-483
COPRS	-108	PNRC2	-18
COPS6	-24	RPL15	-346
CUL3	-16	SCAMP4	-3
DYNC112	-94	SEC61B	-19
DYNLL1	-57	SKP1	-83
EIF4A1	-120	SMARCA1	-14
EIF4G2	-112	SNX2	-97
EWSR1	-284	STUB1	-294
HIF1AN	-51	SUCLG1	-177
HSP90AA1	-47	TM9SF4	-225
HSPA5	-45	TSSC4	48
ISG15	-76	UBE2V2	-7
LAPTM4A	-384	UCHL1	-47
LEMD2	7	VIM	-268
MCM7	-573	YBX3	16

Tab. S1: Zelluläre Transkripte der cDNA-Bank

Aufgelistet sind 50 zufällig gewählte zelluläre Transkripte der cDNA-Bank, deren 5'-Enden sequenziert wurden. Im Vergleich mit mRNA-Sequenzanalysen der NCBI-BLAST-Datenbank ergeben sich variierende 5'-UTRs. Die Unterschiede der 5'-UTRs abgeglichen mit der jeweils längsten publizierten Transkriptvariante sind in bp angegeben.

ANHANG

Klon	Genregion	Genomposition [bp]	Größe [bp]	Orientierung	ORFs [bp] auf der RNA von 5' nach 3'
EE57	lncRNA2.7	[2116-3681]	1566	-	ORFL4C [120] ORFL3C [78] ORFL2C [219]
EE285	lncRNA2.7	[2117-3681]	1565	-	ORFL4C [120] ORFL3C [78] ORFL2C [219]
EE301	lncRNA2.7	[2867-4598]	1732	-	ORFL8C [105] ORFL7C [252] ORFL7C.iORF1 [117] ORFL6C [258] ORFL5C [81]
EE510	lncRNA2.7	[2867-4285] [4353-4598]	1665	-	ORFL8C [105] ORFL6C [258] ORFL5C [81]
EE1540	lncRNA2.7	[2117-3681]	1565	-	ORFL4C [120] ORFL3C [78] ORFL2C [219]
EE991	lncRNA2.7	[2471-4162]	1692	-	ORFL6C [258] ORFL5C [81] ORFL4C [120] ORFL3C [78] ORFL2C [219]
EE1171	lncRNA2.7	[2116-4601]	2486	-	ORFL8C [105] ORFL7C [252] ORFL7C.iORF1 [117] ORFL6C [258] ORFL5C [81] ORFL4C [120] ORFL3C [78] ORFL2C [219]
EE154	lncRNA1.2	[6365-7388]	1024	-	ORFL16C [276] ORFL16C.iORF1 [129] ORFL15C [69]
EE581	lncRNA1.2	[6365-7389]	1025	-	ORFL16C [276] ORFL16C.iORF1 [129] ORFL15C [69]
EE725	lncRNA1.2	[6365-7388]	1024	-	ORFL16C [276] ORFL16C.iORF1 [129] ORFL15C [69]
EE852	lncRNA1.2	[6366-7388]	1023	-	ORFL16C [276] ORFL16C.iORF1 [129] ORFL15C [69]
EE1123	lncRNA1.2	[6365-7388]	1024	-	ORFL16C [276] ORFL16C.iORF1 [129] ORFL15C [69]
EL82	lncRNA1.2	[7079-8102]	1024	-	ORFL16C [276] ORFL16C.iORF1 [129] ORFL15C [69]
EL127	lncRNA1.2	[7079-8102]	1024	-	ORFL16C [276] ORFL16C.iORF1 [129] ORFL15C [69]
EL194	lncRNA1.2	[7079-8104]	1026	-	ORFL16C [276] ORFL16C.iORF1 [129] ORFL15C [69]
ML19	lncRNA1.2	[7077-8103]	1027	-	ORFL16C [276] ORFL16C.iORF1 [129] ORFL15C [69]
ML49	lncRNA1.2	[7079-8103]	1025	-	ORFL16C [276] ORFL16C.iORF1 [129] ORFL15C [69]
EE1266	UL4-5	[13274-14793]	1520	+	ORFL33W [66] UL4 [456] UL5 [498] ORFL35W.iORF1 [240]
ME106	UL4-5	[13275-14794]	1520	+	ORFL33W [66] UL4 [456] UL5 [498] ORFL35W.iORF1 [240]
EE1043	UL5	[14245-14791]	547	+	ORFL35W.iORF1 [240]
EE81	UL16-17	[22415-23671]	1257	+	UL16 [690] ORFL49W.iORF1 [147] UL17 [312]
EE374	UL16-17	[22915-23671]	757	+	ORFL49W.iORF1 [147] UL17 [312]
EE792	UL16-17	[22417-23671]	1255	+	UL16 [690] ORFL49W.iORF1 [147] UL17 [312]
ML7	UL16-17	[23638-24415]	778	+	ORFL49W.iORF1 [147] UL17 [312]
EE42	UL21A	[26471-26888]	418	-	UL21A [369]
EE1120	UL21A	[26469-26889]	421	-	UL21A [369]
EE960	UL21A	[26475-27810]	1336	-	UL21A [369]
ME130	UL21A	[26475-27810]	1336	-	UL21A [369]
EL152	UL22A	[27547-27963] [28048-28345]	715	+	ORFL56W [105] UL22A [309]
EE1280	UL23	[27812-28889]	1078	-	ORFL65C [81bp] UL23 [852] ORFL64C.iORF1 [396]
EL97	UL23as/lncRNA2.7	[3179-3679] [28616-29135]	1019	+/-	ORFL60W [75] ORFL61W [66] ORFL2C [219]
EE1401	UL24-23	[27810-30065]	2256	-	ORFL71C.iORF1 [1074] UL24 [900] ORFL65C [81] UL23 [852] ORFL64C.iORF1 [396]
ME138	UL24-23	[27812-30065]	2254	-	ORFL71C.iORF1 [1074] UL24 [900] ORFL65C [81] UL23 [852] ORFL64C.iORF1 [396]
EE788	UL34	[44816-46076]	1261	+	UL34 [1224] ORFL96W.iORF2 [1161]
EE51	UL36	[48127-48991]	865	-	potentielle UL36 nested ORFs [621] [237]
EE857	UL36	[48126-49498] [49602-49883]	1655	-	ORFL101C [1476] UL36 [1428]
EE247	UL36	[48126-49498] [49602-49883]	1655	-	ORFL101C [1476] UL36 [1428]
EE706	UL40	[53170-53867]	698	-	UL40short [618]
EE249	UL41A-40	[53167-54329]	1163	-	UL41A [234] ORFL106C [357] UL40long [663] UL40short [618]
EE282	UL41A-40	[53163-54414]	1252	-	ORFL108C [93] UL41A [234] ORFL106C [357] UL40long [663] UL40short [618]
EE1414	UL41A-40	[53164-54415]	1252	-	ORFL108C [93] UL41A [234] ORFL106C [357] UL40long [663] UL40short [618]
EE1428	UL44-40	[53165-57494]	4330	-	UL44 [1299] UL43 [1269] ORFL110C.iORF2 [963] ORFL110C.iORF1 [81] UL42 [375] ORFL108C [93] UL41A [234] ORFL106C [357] UL40long [663] UL40short [618]
EE704	UL48as	[67019-68325]	587	-	keine kanonischen ORFs
EE478	UL49-48A	[71038-73159]	2122	-	UL49 [1710] ORFL129C [348] ORFL128C [306] ORFL129C.iORF1 [78] UL48A [225] ORFL126C [120] ORFL125C [150]
EE1223	UL51-48A	[70087-74960]	4874	-	ORFL139C [96] ORFL138C [183] UL51 [471] ORFL136C.iORF1 [69] UL50 [1191] UL49 [1710] ORFL129C [348] ORFL128C [306] ORFL129C.iORF1 [78] UL48A [225] ORFL126C [120] ORFL125C [150]
ME73	UL51-48A	[70087-74959]	4873	-	ORFL139C [96] ORFL138C [183] UL51 [471] ORFL136C.iORF1 [69] UL50 [1191] UL49 [1710] ORFL129C [348] ORFL128C [306] ORFL129C.iORF1 [78] UL48A [225] ORFL126C [120] ORFL125C [150]
EE103	UL52as/UL92-94	[75064-75275] [134903-138878]	4188	+/-	potentieller 5'-ORF [228] UL92 [603] UL93 [1782] ORFL221W [1266] ORFL221W.iORF1 [414] UL94 [1035] ORFL222W.iORF1 [159]
EE1096	UL55	[81349-84810]	3462	-	UL55 [2718] ORFL145C.iORF2 [159] ORFL145C.iORF1 [180] ORFL144C [75]
EE1292	UL55	[81349-84811]	3463	-	UL55 [2718] ORFL145C.iORF2 [159] ORFL145C.iORF1 [180] ORFL144C [75]
EL189	UL72as-UL74A	[106426-107899] [109233-109467]	1709	+	ORFL173W [114] UL73 [405]
EL14	UL73-74A	[107375-107899] [109233-109467]	760	+	UL73 [405]
EL63	UL73-74A	[107375-107899] [109233-109467]	760	+	UL73 [405]
EL135	UL73-74A	[107376-107899] [109233-109461]	753	+	UL73 [405]
EL145	UL73-74A	[107376-107899] [109233-109467]	759	+	UL73 [405]
EL173	UL73-74A	[107375-107918] [109233-109466]	778	+	UL73 [405]
EE1458	UL77-78	[113003-115437]	2435	+	ORFL195W [111] UL78 [1293] ORFL196W.iORF1 [1248] ORFL196W.iORF2 [66]
EL19	UL78	[114471-116149]	1679	+	ORFL195W [111] UL78 [1293] ORFL196W.iORF1 [1248] ORFL196W.iORF2 [66]
EL224	UL78	[114472-116149]	1678	+	ORFL195W [111] UL78 [1293] ORFL196W.iORF1 [1248] ORFL196W.iORF2 [66]
EE89	UL84	[122120-124038]	1919	-	UL84 [1758] ORFL208C.iORF1 [369]
EE294	UL84	[122120-124039]	1920	-	UL84 [1758] ORFL208C.iORF1 [369]
EE734	UL84	[122120-124039]	1920	-	UL84 [1758] ORFL208C.iORF1 [369]
EE773	UL84	[122120-124038]	1919	-	UL84 [1758] ORFL208C.iORF1 [369]
EE1039	UL84	[122118-124038]	1921	-	UL84 [1758] ORFL208C.iORF1 [369]
EE1212	UL84	[122118-124038]	1921	-	UL84 [1758] ORFL208C.iORF1 [369]
ME119	UL84	[122116-124037]	1924	-	UL84 [1758] ORFL208C.iORF1 [369]
ML45	UL84	[122829-124505]	1677	-	ORFL208C.iORF1 [369]
ME104	UL92-94	[134057-134650] [134903-138879]	4571	+	potentieller 5'-erweiterter UL92-ORF durch Spleißen [1080] UL92 [603] UL93 [1782] ORFL221W [1266] ORFL221W.iORF1 [414] UL94 [1035] ORFL222W.iORF1 [159]
EE558	UL94	[137354-138880]	1527	+	ORFL221W.iORF2 [75] ORFL222W.iORF1 [141]
EE824	UL95	[138868-140354]	1487	+	ORFL223W [270] ORFL223W.iORF1 [63]
EE1265	UL95	[138868-140354]	1487	+	ORFL223W [270] ORFL223W.iORF1 [63]
ME17	UL102as	[148887-149453]	567	-	ORFL237C [357]
ML13	RNA1.3	[156473-156769] [161301-162262]	1259	-	ORFL249C [111] weitere potentielle ORFs [192] [234]
EE834	lncRNA5as	[157319-160528]	3210	+	potentielle ORFs [312] [153]
EE835	lncRNA5as	[157319-160528]	3210	+	potentielle ORFs [312] [153]
EE487	UL111A	[160603-160812] [160889-161381]	703	+	UL111A [417] ORFL248W.iORF2 [93]
EE746	UL111A	[160602-160812] [160889-161381]	704	+	UL111A [417] ORFL248W.iORF2 [93]
EL51	UL111A	[161309-161529] [161606-162104]	720	+	UL111A [417] ORFL248W.iORF2 [93]
EL85	UL111A	[161324-161529] [161606-162102]	703	+	UL111A [417] ORFL248W.iORF2 [93]

Tab. S2 wird fortgesetzt

ANHANG

Klon	Genregion	Genomposition [bp]	Größe [bp]	Orientierung	ORFs [bp] auf der RNA von 5' nach 3'
EE10	UL112-111Aas	[155750-156058] [160587-163812]	3535	-	ORFL249C [111] weitere potentielle ORFs [183] [1173] [408] [288] [249] [234]
EE14	UL112-111Aas	[155750-156058] [160587-163812]	3535	-	ORFL249C [111] weitere potentielle ORFs [183] [1173] [408] [288] [249] [234]
EL3	UL112	[162126-164605]	2480	+	UL112 p34 [804] ORFL253W.iORF3 [225] ORFL253W.iORF4 [108]
EL24	UL112	[162126-164605]	2480	+	UL112 p34 [804] ORFL253W.iORF3 [225] ORFL253W.iORF4 [108]
EL34	UL112	[162126-163017] [163175-164605]	2323	+	UL112 p84 [2049] ORFL253W.iORF3 [225] ORFL253W.iORF4 [108]
EL59	UL112	[162126-163017] [163175-164605]	2323	+	UL112 p84 [2049] ORFL253W.iORF3 [225] ORFL253W.iORF4 [108]
EL143	UL112	[162126-163338] [164231-164608]	1591	+	UL112 p34 [804] ORFL253W.iORF3 [225]
ML53	UL112	[162126-163017] [163175-164605]	2323	+	UL112 p84 [2049] ORFL253W.iORF3 [225] ORFL253W.iORF4 [108]
ML28	UL115-121as	[165490-165938] [166041-166165] [166304-166406] [166505-166781] [166867-169219] [169353-169479] [170634-170968]	3845	+	potentielle ORFs [171] [180] [438] [207] [252] [216] [402] [264]
EE1516	UL122	[170213-171259]	1047	-	potentieller UL122 nested ORF [906]
ME81	UL122	[170213-171264]	1052	-	potentieller UL122 nested ORF [906]
EE1525	UL123-122	[170213-171805] [173351-173535] [173650-173737] [174565-174683]	1959	-	UL122 [1740] ORFL265C.iORF3 [1206] ORFL265C.iORF2 [1182] ORFL265C.iORF1 [1017]
EE64	UL126(ehem.)	[174629-175216]	588	-	ORFL270C [165] ORFL269C [135] ORFL268C [72]
EE74	UL126(ehem.)	[174629-175216]	588	-	ORFL270C [165] ORFL269C [135] ORFL268C [72]
EL163	UL126(ehem.)	[175345-175933]	589	-	ORFL270C [165] ORFL269C [135] ORFL268C [72]
EL164	UL126(ehem.)	[175345-175933]	589	-	ORFL270C [165] ORFL269C [135] ORFL268C [72]
ME127	UL130-128	[175797-177335]	1539	-	UL130 [642]
EL200	UL139-141	[184678-187036]	2361	-	UL140 [573] ORFL306C.iORF1 [78] ORFL301C [312] UL141 [816]
EL209	UL139-141	[184678-187036]	2361	-	UL140 [573] ORFL306C.iORF1 [78] ORFL301C [312] UL141 [816]
EL211	UL141	[184670-185586]	919	-	UL141 [816]
EL197	UL145-132	[178498-179511] [181908-182491]	1598	-	UL145 [390] ORFL287C.iORF1 [339] UL132 [810] ORFL276C.iORF1 [627]
ML1	UL148-132	[178498-180461]	1964	-	UL148 [948] ORFL278C.iORF1 [69] UL132 [810] ORFL276C.iORF1 [627]
EE690	US2	[195504-196165]	662	-	US2 [597]
EE76	US11-10	[201505-202828]	1324	-	US11 [645] US10 [555]
ML3	US11-10	[207357-208580]	1224	-	US10 [555]
ML22	US18	[214514-215506]	993	-	US18 [822] ORFS346C.iORF1 [111]
EE578	US20-18	[208654-211326]	2673	-	US20 [762] US19 [720] US18 [822] ORFS346C.iORF1 [111]
EE1497	US24	[215991-217812]	1822	-	ORFS357C [156] US24 [1506] ORFS355C.iORF1 [597]

Tab. S2: HCMV Transkripte der cDNA-Bank und deren Kodierungspotential

Die Liste enthält alle per Slot Blot isolierten Einzelklone mit integrierten cDNAs viralen Ursprungs. Dargestellt sind die Genregion des Transkripts, dessen Größe ohne Polyadenylierung, Position und Orientierung im HCMV-Genom (Bradley *et al.*, 2009; Tomasec *et al.*, 2005). Ausgehend vom 5'-Ende des Transkripts sind alle in der Sequenz enthaltenen ORFs und deren Größe unabhängig von deren potentiellen Translation aufgelistet. Weitere rORFs (<20 Aminosäuren; Stern-Ginossar *et al.*, 2012) sind nicht aufgeführt. Bei geringem Kodierungspotential einiger Transkripte sind potentielle kanonische ORFs aufgelistet.

Lebenslauf

Name: Marco Maywald

Wohnort: Lambarenestr. 26
47249 Duisburg

Geburtsdatum: 19.04.1983

Geburtsort: Duisburg

Eltern: Peter Maywald, Beamter, in Pension
Heidemarie Maywald, geb. Kunzendorf, Hausfrau

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1989-1993 Städt. Gemeinschaftsgrundschule Lüderitzallee Duisburg

1993-2002 Steinbart-Gymnasium Duisburg

18.6. 2002 Abitur (Gesamtnote: 2,9)

Zivildienst:

2002-2003 Theodor Fliedner Stiftung, Altenwohnanlage Duisburg-Großenbaum

ANHANG

Hochschulausbildung:

- 2003-2008 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Vordiplom Gesamtnote: sehr gut
- 2008-2009 Diplomarbeit am Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Hengel)
Thema: Untersuchungen zur Expression Interferon-antagonistischer
Gene durch das humane Cytomegalovirus
- 1.7.2009 graduiert zum Dipl. Biol., Gesamtnote: ausgezeichnet
- seit 2009 Promotionsstudium am Institut für Virologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Hengel; seit
2014 Prof. Dr. med. Jörg Timm)

Wissenschaftlicher Werdegang:

- 2008-2009 studentische Hilfskraft am Institut für Virologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf
- 2008-2010 Mitarbeit am Forschungsprojekt „Bewertung von Messenger RNA
(mRNA)- basierenden Impfstoffen gegen CMV“ mit der Firma
CureVac, Tübingen
- 2009-2011 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Virologie der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf
- 23.9.10 Fortbildung am BD Biosciences Training Center, Heidelberg
Thema: Intrazelluläre Proteine/Bead Technologie
- 2011-2013 assoziiertes Mitglied des DFG-Graduiertenkollegs 1045 „Modulation of
host cell functions to treat viral and bacterial infections“ an den
Universitäten Duisburg-Essen, Bochum und Düsseldorf
- 11.2011-04.2013 Promotionsstipendium der Jürgen Manchot Stiftung
- 05.2013-06.2013 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf
- 10.2013-02.2014 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Virologie der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf
- seit 03.2014 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf

Vorträge

- 7.-9.10.2009 Setup of a screening to identify HCMV encoded IFN- γ antagonists
Maywald, M., Zimmermann, A., and Hengel, H.
8. Workshop des GfV-Arbeitskreises „Immunbiology of viral infections“, Deidesheim
- 6.-8.10.2010 HCMV cDNA library generation to set up a screening for viral IFN- γ antagonists
Maywald, M., Hauka, S., Dölken, L., Hanenberg, H., Zimmermann, A., and Hengel, H.
9. Workshop des GfV-Arbeitskreises „Immunbiology of viral infections“, Deidesheim
- 12.-14.10.2011 FACS-screening of transduced viral cDNA libraries to identify HCMV encoded IFN- γ antagonists
Maywald, M., Hauka, S., Dölken, L., Hanenberg, H., Zimmermann, A., and Hengel, H.
10. Workshop des GfV-Arbeitskreises „Immunbiology of viral infections“, Deidesheim
- 18.-21.03.2015 Analysis of polyadenylated HCMV RNAs
Maywald, M., Stephan, T., Müller, N., Hengel, H., and Zimmermann, A.
25th Annual Meeting of the Society for Virology, Bochum

Poster

- 6.-9.03.2013 FACS-screening of transduced viral cDNA libraries to identify HCMV encoded IFN- γ antagonists
Maywald, M., Hanenberg, H., Hengel, H., and Zimmermann, A.
23rd Annual Meeting of the Society for Virology, Kiel
- 26.-29.03.2014 Functional genomics of human cytomegalovirus by analysis of viral cell surface modulation
Maywald, M., Halenius, A., Hengel, H., and Zimmermann, A.
24th Annual Meeting of the Society for Virology, Alpbach

Publikationen

Zimmermann, A., Hauka, S., **Maywald, M.**, Le, V. T., Schmidt, S. K., Daubener, W. & Hengel, H. (2014). Checks and balances between human cytomegalovirus replication and indoleamine-2,3-dioxygenase. *The Journal of general virology* 95, 659-670.

Howe, S., Le-Trilling, V. T., **Maywald, M.**, Zimmermann, A., Hengel, H. & Trilling, M. A novel gain-of-function screening approach identifies the human Cytomegalovirus-encoded protein pUL42 as Jak1-degrading interferon antagonist. Manuskript in Vorbereitung.

DANKSAGUNG

DANKSAGUNG

Herzlich danken möchte ich an dieser Stelle:

Herrn Prof. Dr. Hartmut Hengel für die Aufnahme am Institut für Virologie, die Möglichkeit meine Doktorarbeit durchführen zu können und die Unterstützung auch aus der Ferne.

Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann für die freundliche Übernahme des Gutachtens seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

PD Dr. Albert Zimmermann für die Bereitschaft jederzeit weiterzuhelfen, viele Ideen, Ratschläge und das entgegengebrachte Vertrauen. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer vorstellen können.

Prof. Dr. Ingo Drexler und Prof. Dr. Jörg Timm für die Möglichkeit meine Doktorarbeit weiterhin am Institut für Virologie durchführen bzw. abschließen zu können und das Interesse an dieser Arbeit.

der CMV-Gruppe: Albert Zimmermann, Stephanie Rattay, Anja Voges, Nadine Müller, Tatjana Schwarz, die die CMV-Flagge in Düsseldorf weiter hochhalten.

meinen Bachelor-Studenten/innen bzw. Praktikantinnen Meike Rückborn, Britta Kühne, Mona Neukirchen und Tobi Stephan, die das Projekt weiter vorwärts gebracht haben.

Steffen Erkelenz, Jule Noffke, Albert Zimmermann, Jens Bauer, Frank Hillebrand, Tomek Ochmann, Sebastian Howe, Claus Lenski und Jan Otto Peter für die großartigen Tage und Nächte innerhalb und außerhalb des Instituts.

allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts für Virologie und des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene für die Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre.

der Core Flow Cytometry Facility des Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, insbesondere Katharina Raba für die vielen Stunden am Sorter.

dem DFG-Graduiertenkolleg 1045 „Modulation of host cell functions to treat viral and bacterial infections“ für die Möglichkeit meine Daten präsentieren und diskutieren zu können.

der Jürgen Manchot Stiftung, CureVac, und der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät für die finanzielle Unterstützung.

meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung und den immensen Rückhalt.

ERKLÄRUNG

ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe bisher keine erfolglosen oder erfolgreichen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 28.5.2015

Marco Maywald