
Epigenetische Organisation des Cytomegalievirus-Genoms



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT III - BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG

vorgelegt von
ALEXANDRA NITZSCHE
aus Regensburg

im Januar 2010

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Regensburg, im Januar 2010

.....

Alexandra Nitzsche

Promotionsgesuch eingereicht am: 12.01.2010

Datum der mündlichen Prüfung: 06.05.2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Dr. Christina Paulus und Dr. Michael Nevels

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Armin Kurtz (Vorsitzender)
Prof. Dr. Gernot Längst (1. Prüfer, Erstgutachten)
PD Dr. Michael Nevels (2. Prüfer, Zweitgutachten)
Prof. Dr. Gunter Meister (3. Prüfer)

Für meine Eltern
und Benedikt

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	2
1.1 Das humane Cytomegalievirus	2
1.2 Epigenetik bei Eukaryoten	3
1.3 Epigenetik bei Herpesviren	16
1.4 Zielsetzung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Antikörper	23
2.1.2 Oligonukleotide	24
2.1.3 Zellen	25
2.1.4 Viren	25
2.2 Nukleinsäure-Methoden	25
2.2.1 Agarosegelelektrophorese	25
2.2.2 Southern Blot	25
2.2.3 Mikrokokken-Nuklease (MNase)-Verdau	29
2.2.4 <i>Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements</i> (FAIRE)	31
2.2.5 Psoralen-Quervernetzungsanalyse	33
2.2.6 Quantitative <i>real time</i> -PCR	35
2.3 Proteinbiochemische Methoden	37
2.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten	37
2.3.2 SDS-PAGE und Western Blot	37
2.3.3 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)	38
2.3.4 Immunfluoreszenzfärbung	41
2.4 Zellkulturverfahren	42
2.4.1 Kultivierung humaner Zellen	42
2.4.2 Herstellung von Virus- <i>stocks</i>	43
2.4.3 Infektion	43
2.4.4 Plaque-Test	44
2.4.5 Cytotoxizitätstest	45
2.4.6 Einsatz von Enzyminhibitoren	45

3 Ergebnisse	47
3.1 Chromatinisierung des HCMV-Genoms während der lytischen Infektion	47
3.1.1 Assoziation des HCMV-Genoms mit allen fünf Histontypen	47
3.1.2 Nukleosomale Struktur des HCMV-Genoms	49
3.1.3 Zeitliche und räumliche Unterschiede in der Chromatinisierung	53
3.1.4 Detaillierte Analyse der H3-Besetzung verschiedener viraler Loci im Infektionsverlauf	57
3.1.5 DNA-Replikations-(un)abhängige Chromatinisierungsphasen	60
3.1.6 Assoziation viraler Replikationszentren mit Komponenten der zellulären Chromatinisierungsmaschinerie	63
3.1.7 Zusammenfassung	65
3.2 Histon-Modifikationen am HCMV-Genom während der lytischen Infektion	66
3.2.1 Histon-Modifikationsmuster am HCMV-Genom	66
3.2.2 Replikationsunabhängigkeit des Anstiegs der untersuchten H3-Modifikationen ...	71
3.2.3 Antivirale Effekte von Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme	73
3.2.4 Einfluss der untersuchten Inhibitoren auf das Histon H3-Modifikationsmuster	79
3.2.5 Zusammenfassung	84
4 Diskussion	85
4.1 Chromatinisierung des HCMV-Genoms	85
4.2 Histon-Modifikationsmuster am HCMV-Genom	91
4.3 Modell für die epigenetische Regulation der lytischen HCMV-Infektion	97
4.4 Ausblick	99
5 Anhang	101
5.1 Literaturverzeichnis	101
5.2 Abkürzungsverzeichnis	112
5.3 Veröffentlichungen	113
Danksagung	114

Zusammenfassung

Eukaryotische DNA wird durch epigenetische Mechanismen weitreichend reguliert. So werden alle DNA-abhängigen Prozesse von DNA-Methylierung, Chromatinisierungsdichte, Histon-Varianten und posttranslationalen Histon-Modifikationen beeinflusst. Auch das humane Cytomegalievirus (HCMV) unterliegt als nukleär replizierendes DNA-Virus dem Zugriff der epigenetischen Maschinerien der Wirtszelle, so dass eine Modulation des Infektionszyklus auf dieser Ebene naheliegt. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit so gut wie keine Daten zu epigenetischen Effekten während der lytischen HCMV-Infektion vorlagen, sollten die Chromatinisierung und das Histon-Modifikationsmuster am viralen Genom systematisch im Infektionsverlauf analysiert werden.

Dazu wurde mittels verschiedener Techniken wie Chromatinimmunpräzipitation (ChIP), MNase-Verdau, Psoralen-Quervernetzungsanalyse und *formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements* (FAIRE) ein Profil der Chromatinisierung des viralen Genoms im Verlauf der lytischen Infektion erstellt, das sich in vier Phasen einteilen lässt: Sofort nach Eintritt des Genoms in den Wirtszellkern beginnt die DNA-Replikations-unabhängige Besetzung mit Nukleosomen (I), wobei die Besetzungsdichte weit unter der zellulärer DNA bleibt. Nach einer Phase geringer Veränderungen (II) steigt mit Fortschreiten der Infektion die Histonmenge DNA-Replikations-abhängig an weiten Teilen des HCMV-Genoms noch einmal stark an (III), bevor sie gegen Ende des Infektionszyklus wieder merklich absinkt (IV). Durch Kolokalisationsstudien konnten Hinweise auf die Beteiligung der zellulären Chromatinisierungsmaschinerie an der Nukleosomenbesetzung in Phase III erbracht werden. Bezüglich des Histon H3-Modifikationsmusters am HCMV-Genom wurde ein sukzessiver Wandel von einem frühen Heterochromatin-ähnlichen zu einem späten Euchromatin-ähnlichen Zustand ermittelt, wobei die Aktivierungszeitpunkte der verschiedenen viralen Gene sich im Modifikationsmuster widerspiegeln. Daraufhin wurde untersucht, ob sich die Manipulation dieses Musters als Basis einer antiviralen Strategie eignet. Dazu wurden vier Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme eingesetzt, die starke antivirale Effekte zeigten – zumindest die Wirkung von MTA ließ sich auch mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Veränderungen im Histon-Modifikationsmuster zurückführen. Die antiviralen Effekte von Curcumin, Chaetocin und Anacardinsäure scheinen hingegen teilweise bzw. größtenteils auf nicht-epigenetischen Wirkmechanismen zu beruhen. Aufgrund der ermittelten Daten konnte schließlich ein vorläufiges Modell zur epigenetischen Regulation der lytischen HCMV-Infektion entwickelt werden.

1 Einleitung

1.1 Das humane Cytomegalievirus

Das humane Cytomegalievirus ist einer von acht humanpathogenen Vertretern der Familie der Herpesviren und gehört zur Unterfamilie der β -Herpesviren, die sich durch strikten Wirtstropismus sowie vergleichsweise langsame Replikation in Zellkultur auszeichnen (Modrow *et al.*, 2002). In Abhängigkeit von Alter und sozioökonomischem Status beträgt die Seroprävalenz in Industriestaaten zwischen 30% und 70%, in Schwellenländern kann sie gegen 100% gehen. Die Übertragung findet durch Körpersekrete statt, wobei vor allem Kleinkinder eine bedeutende Infektionsquelle darstellen (Ludwig & Hengel, 2009). In immunkompetenten Individuen verläuft die Infektion meist symptomlos, schwerwiegende Erkrankungen können allerdings bei Transplantations- und AIDS-Patienten sowie bei während der Schwangerschaft über die Mutter infizierten Föten auftreten (Crough & Khanna, 2009). Vor allem der letzte Punkt ist von epidemiologischer Bedeutung, da je nach Land 0,15% bis 2% aller Neugeborenen betroffen sind (Malm & Engman, 2007). Die kongenitale HCMV-Infektion stellt in Europa die Hauptursache für neurologische Schäden bei Kindern dar, Spätfolgen umfassen darüber hinaus vor allem Gehör- und Augenschäden (Ludwig & Hengel, 2009; Pass *et al.*, 1980; Damato & Winnen, 2002). Die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes scheiterte bisher (Schleiss, 2008; Steininger, 2007), zur Therapie stehen nur wenige Medikamente zur Verfügung (Gandhi & Khanna, 2004).

Das HCMV-Genom gehört mit über 230 000 bp doppelsträngiger DNA zu den größten Virusgenomen und codiert für etwa 165 Gene (Davison *et al.*, 2003). Die Nomenklatur der Gene richtet sich nach ihrer Position in der *unique long-* (U_L) oder *unique short-* (U_S) Region bzw. in den *terminal repeat-* (TR_L , TR_S) oder *internal repeat-* (IR_L , IR_S) Bereichen (jeweils *long* oder *short*). Die DNA befindet sich in Virionen im Inneren eines ikosaedrischen Kapsids, das wiederum von einer als Tegumentschicht bezeichneten Proteinmatrix und einer Membranhülle mit eingelagerten viralen Glykoproteinen umgeben ist. Das gesamte Viruspartikel hat einen Durchmesser von ca. 200 nm (Knipe *et al.*, 2006).

Während der Infektion kommt es nach Anheftung des Virions an die Zelloberfläche je nach Zelltyp sofort oder erst nach Rezeptor-vermittelter Endozytose zu einer Membranfusion, so dass Kapsid und Tegumentproteine ins Cytoplasma der Wirtszelle entlassen werden. Der Transport des Kapsids zum Kern erfolgt mit Hilfe des Mikrotubuli-Netzwerkes, auch Aktin- und Intermediärfilamente scheinen beteiligt zu sein (Miller & Hertel, 2009). Durch eine Kernpore wird das HCMV-Genom in den Kern eingeschleust, wo es etwa 4 h p.i. zirkularisiert

(McVoy & Adler, 1994). Im lytischen Infektionszyklus erfolgt die Expression der viralen Gene gemäß der drei kinetischen Klassen *immediate early* (IE), *early* (E) und *late* (L) kaskadenartig gestaffelt. Die IE-Proteine werden sofort nach Eintritt des Genoms in den Wirtszellkern unabhängig von *de novo*-Proteinsynthese exprimiert und wirken unter anderem als Transaktivatoren auf die Expression der E- und L-Gene. Die E-Proteine sind notwendig zur Durchführung der viralen DNA-Replikation ab ca. 24h p.i., während die L-Gene, deren Expression von der viralen DNA-Replikation abhängt, hauptsächlich Strukturkomponenten des Viruspartikels codieren. Die Freisetzung der neu assemblierten Tochter-Virionen beginnt etwa 48h p.i.. Wie alle Herpesviren kann HCMV zudem eine lebenslange Latenz mit stark eingeschränktem Transkriptionsprofil und ohne Virionenproduktion etablieren (Kondo & Mocarski, 1995; Sinclair, 2008).

1.2 Epigenetik bei Eukaryoten

"*Epigenetics is a useful word if you don't know what's going on – if you do, you use something else.*" (Adrian Bird, zitiert in Ledford, 2008) – lange wurde der Begriff 'Epigenetik' auch als Sammelbezeichnung für unerklärte genetische Phänomene benutzt. Eine einheitliche **Definition** konnte noch immer nicht festgelegt werden, als epigenetisch im weiteren Sinne lassen sich jedoch Mechanismen beschreiben, die – ob vererbbar oder nicht – zur Änderung der Aktivität eines Genlocus führen, ohne dass die DNA-Sequenz verändert wird (Goldberg *et al.*, 2007; Ledford, 2008). Epigenetische Regulationsmöglichkeiten für DNA-abhängige

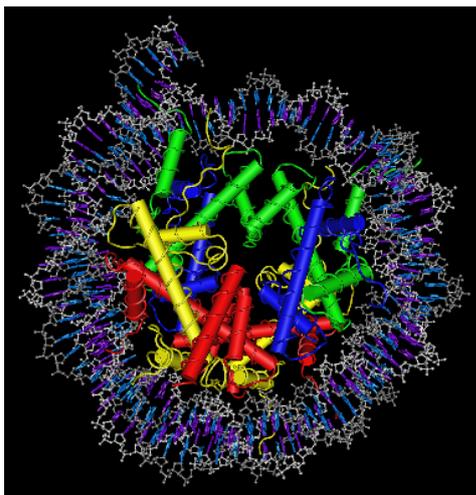


Abb. 1.1 Das Nukleosom

Kristallstruktur eines Nukleosoms – die DNA ist grau/blau dargestellt, die Histone H2A, H2B, H3 und H4 in gelb, rot, grün und blau. PDB-ID 2CV5

Prozesse wie Genexpression, DNA-Replikation und DNA-Reparatur bieten die DNA-Methylierung, die Nukleosomen-Positionierung, der Einbau von Histon-Varianten sowie die posttranslationale Modifikation von Histonen. Bis auf die DNA-Methylierung basieren diese Mechanismen auf der Nukleosomen-Struktur des Chromatins, die also nicht nur die Notwendigkeit der Verpackung der stark geladenen DNA auf engstem Raum erfüllt.

Ein **Nukleosom** besteht aus einem Oktamer der *core*-Histone H2A, H2B, H3 und H4, das von 145 bp bis 147 bp DNA 1,65-mal linksgängig umwunden wird (siehe Abb. 1.1). Jedes der evolutionär stark kon-

servierten *core*-Histone enthält einen Sequenzabschnitt für ein definiertes Faltungsmuster aus zwei kurzen und einer zentralen langen α -Helix, die sogenannte Histon-Faltung, welche die Dimerisierung der Histone erlaubt. Jeweils zwei H3/H4-Dimere lagern sich durch Bildung eines 4-Helix-Bündels zu einem Tetramer zusammen, welches über zwei weitere 4-Helix-Bündel mit den beiden H2A/H2B-Dimeren in Kontakt tritt. Die N-terminalen Histon-Schwänze ragen dabei teilweise aus der kompakten Nukleosomenstruktur heraus. Die äußerst stabile Wechselwirkung des Histon-Oktamers mit der DNA-Helix basiert auf Wasserstoffbrücken und ionischen Wechselwirkungen, wobei an den 14 Punkten des Nukleosoms, an denen die kleine Furche zur Innenseite ausgerichtet ist, jeweils eine Arginin-Seitenkette in die Furche eintritt (Luger *et al.*, 1997). Aufgrund der Biegung der DNA entsteht eine Präferenz für GC-Basenpaare an Stellen, wo die große Furche zur Innenseite orientiert und damit verengt ist, während AT-Basenpaare bevorzugt werden, sobald die kleine Furche innen zu liegen kommt. Daraus ergibt sich eine für die Nukleosomen-Bildung optimale Sequenz mit regelmäßig alle 10 bp wiederkehrenden AT-Dinukleotiden und einem um 5 bp versetzten GC-Dinukleotid-Muster (Cairns, 2009; Jiang & Pugh, 2009). Die gleichmäßige Aufreihung der einzelnen Nukleosomen entlang der DNA wird als Perlenketten-Struktur beschrieben; eine weitere Verdichtung zur kompakteren 30 nm-Struktur erfährt die DNA durch die Bindung der zentralen globulären Domäne des *linker*-Histons H1 an 15 bp bis 20 bp der die Nukleosomen verbindenden *linker*-DNA sowie an die um das *core*-Histon-Oktamer gewundene DNA (Happel & Doenecke, 2009). Die weitere Komprimierung etwa durch Schlaufenbildung des Chromatins mithilfe von Gerüst-Proteinen erzeugt schließlich die Metaphase-Chromosomen als maximal verdichtete Form der DNA (Luijsterburg *et al.*, 2008).

Die kompakte Struktur des Chromatins macht im Gegenzug Mechanismen notwendig, welche die **Zugänglichkeit** von DNA-Sequenzen für DNA-abhängige Prozesse wie die Transkription gewährleisten. Dichte Besetzung der codierenden Bereiche mit Nukleosomen stellt ein starkes Hindernis für RNA-Polymerase II-abhängige Transkription dar (Wasylyk & Chambon, 1979), da diese Polymerase ein komplettes Nukleosom nicht selbstständig mobilisieren kann und daher auf die Aktivität von Histon-Chaperonen, Chromatin-Umstrukturierungs-Komplexen (*remodeler*) bzw. des Transkriptions-Elongationsfaktors TFIIS in Kombination mit Histon-Acetyltransferasen angewiesen ist, welche die Transkription Nukleosomen-besetzter DNA-Bereiche erleichtern (Reinberg & Sims, 2006; Carey *et al.*, 2006; Guermah *et al.*, 2009). Dies ist mit der Destabilisierung und zumindest teilweisen Entfernung der Nukleosomen

verbunden, wobei die Histon-Dimere von Histon-Chaperonen zwischenzeitlich gebunden und nach der Passage der Transkriptions-Maschinerie wieder zu Nucleosomen assembliert und deacetyliert werden, um die Verpackung der DNA aufrechtzuerhalten und die Aktivierung kryptischer Promotoren zu verhindern (Workman, 2006; Li *et al.*, 2007a).

Neben der Barriere für die Transkriptionsmaschinerie spielt auch die Abdeckung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen durch Nucleosomen eine Rolle. So liegt an inaktiven Promotoren, deren Nucleosomen-Besetzung generell dichter ist als die der aktiven Promotoren (Hogan *et al.*, 2006), oft nur die Bindestelle für einen "Pionier-Transkriptionsfaktor" frei zugänglich vor, erst durch Chromatin-Umstrukturierung können weitere Bindestellen von Nucleosomen befreit und so zugänglich gemacht werden (Cairns, 2009). Die Exposition von chromatinisierten DNA-Sequenzen etwa an Promotoren kann durch die Entfernung oder Verschiebung der Nucleosomen oder durch Schlaufenbildung der DNA an

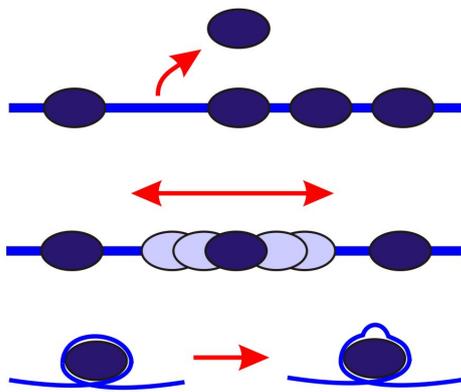


Abb. 1.2 Möglichkeiten der DNA-Exposition:

Entfernung oder Verschiebung von Nucleosomen, Schlaufenbildung der DNA

der Nucleosomen-Außenseite erreicht werden (Jiang & Pugh, 2009; siehe Abb. 1.2). Diese Umstrukturierung des Chromatins erfolgt mit Hilfe von ATP-abhängigen Komplexen, die aufgrund von Sequenzübereinstimmungen in vier Familien eingeteilt werden: SWI/SNF, ISWI, CHD und INO80. Sie katalysieren die Verschiebung von Nucleosomen durch Translokation einer DNA-Schlaufe rund um das Histon-Oktamer. Die unterschiedlichen Komplexe haben teils überlappende, teils abweichende Funktionen bei der

Aktivierung oder Reprimierung der Transkription durch Nucleosomen-Verschiebung oder -Entfernung (SWI/SNF, CHD, INO80), bei der DNA-Replikation oder -Reparatur sowie bei der Abstands-Ausrichtung einer Nucleosomenabfolge (ISWI). Vor allem bei der Entfernung von Nucleosomen arbeiten die Umstrukturierungs-Komplexe mit Histon-Chaperonen zusammen, welche die freiwerdenden H2A/H2B- und H3/H4-Dimere binden (Clapier & Cairns, 2009; Strohner *et al.*, 2005).

Neben der Positionierung auf der DNA ist auch die Zusammensetzung der Nucleosomen eine regulierbare Größe: Von den Histonen H1, H2A, H2B und H3 existieren jeweils mehrere verschiedene Isoformen oder **Varianten**, wobei die kanonischen Varianten H2A, H2B und H3.1 nur während der S-Phase von jeweils über zehn Genkopien aus abgelesen werden,

während die übrigen Varianten (*replacement*-Histone) meist über den gesamten Zellzyklus hinweg exprimiert werden und jeweils nur eine oder zwei Genkopien besitzen. H4 wird ebenfalls von mehr als zehn Genkopien exprimiert, Varianten sind bisher nicht bekannt (Bernstein & Hake, 2006). Von H1 existieren 11 Isoformen, die ebenfalls teilweise DNA-Replikations-abhängig, teilweise -unabhängig exprimiert werden und neben der allgemein Chromatin-kompaktierenden auch individuelle regulatorische Funktionen wahrnehmen, eine kanonische Variante lässt sich jedoch nicht eindeutig bestimmen (Izzo *et al.*, 2008). Die Unterschiede der *replacement*-Varianten zu den kanonischen Histonen reichen von einer Aminosäure bei H3.2 bis zu einer großen Zusatz-Domäne bei macroH2A, wobei die Positionen für posttranslationale Modifikationen (siehe unten) meist konserviert sind (Bernstein & Hake, 2006; McKittrick *et al.*, 2004). Die kanonischen Varianten werden während der DNA-Replikation zu Nukleosomen assembliert und können danach gegen eine der anderen Isoformen ausgetauscht werden, um spezielle Funktionen zu erfüllen. So findet man z. B. H3.3 bevorzugt an aktiv transkribierten Genen, in den Nukleosomen nahe der Transkriptions-Initiationsstelle oft auch gemeinsam mit H2A.Z – eine Kombination, die das Nukleosom destabilisiert und so seine Entfernung oder Verschiebung durch Chromatin-Umstrukturierungs-Komplexe erleichtert (Jin *et al.*, 2009). MacroH2A findet sich gemeinsam mit anderen Merkmalen für stillgelegte DNA-Bereiche im Chromatin des inaktivierten X-Chromosoms (Brown & Grealley, 2003), die H3-Variante CenH3 ist ausschließlich an Centromeren lokalisiert, wo sie essentiell für die korrekte Ausbildung der Kinetochor-Struktur während der Mitose ist (Torrás-Llort *et al.*, 2009). Der Austausch von kanonischen gegen *replacement*-Histone erfolgt durch Histon-Chaperone – saure Proteine, die Histon-Dimere binden können und ATP-unabhängig an der Assemblierung und Disassemblierung von Nukleosomen, dem Austausch von Histon-Varianten, dem Transport sowie der transienten Lagerung von Histonen beteiligt sind. Chaperone bevorzugen jeweils H2A/H2B- oder H3/H4-Dimere, manche auch spezielle Histon-Varianten. Während der Transkription bindet etwa der FACT-Komplex vorübergehend abgelöste H2A/H2B-Dimere, die hinter der Transkriptionsmaschinerie erneut auf der DNA abgesetzt werden – diese transiente Nukleosomendisassemblierung während der Transkription trägt wohl auch zur erhöhten Mobilität vor allem von H2A/H2B-Dimeren an aktiv transkribierten Genen bei (Kimura & Cook, 2001). Während der DNA-Replikation erfolgt die Assemblierung kanonischer Histone zu neuen Nukleosomen großteils unter Beteiligung des H3.1/H4-Dimere bindenden CAF-1-Komplexes, der durch Wechselwirkung mit PCNA, dem ringförmigen Prozessivitätsfaktor für DNA-Polymerasen, zu den Replikationsgabeln rekrutiert wird (Shibahara & Stillman, 1999).

Das Hinzufügen von H2A/H2B-Dimeren, z. B. durch NAP-1, vervollständigt das Nukleosom (Corpet & Almouzni, 2009). Das Chaperon HIRA hingegen bindet an H3.3/H4-Dimere und kann sie DNA-Replikations-unabhängig im Austausch gegen die kanonischen H3.1/H4-Dimere in bestehende Nukleosomen einfügen. Als Donor von H3.1/H4- bzw. H3.3/H4-Dimeren sowohl für den CAF-1-Komplex als auch für HIRA fungiert das Histon-Chaperon ASF1a, das möglicherweise auch ähnlich wie NAP-1 am Transport von neusynthetisierten Histonen aus dem Cytoplasma in den Kern beteiligt ist (Groth *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 1996). Zudem kann ASF1a durch seine Interaktion das H3/H4-Tetramer destabilisieren und es möglicherweise während der Nukleosomendisassemblierung bei der DNA-Replikation in zwei Dimere aufspalten (Park & Luger, 2008; De Koning *et al.*, 2007; Eitoku *et al.*, 2008; Corpet & Almouzni, 2009).

Sehr weitreichende Regulationsmöglichkeiten bieten auch **posttranslationale Modifikationen** der Histone, vor allem im Bereich der N-terminalen Schwanzregionen. Die Modifikationen umfassen z. B. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, SUMOylierung, poly(ADP)ribosylierung, Deiminierung und Prolin-

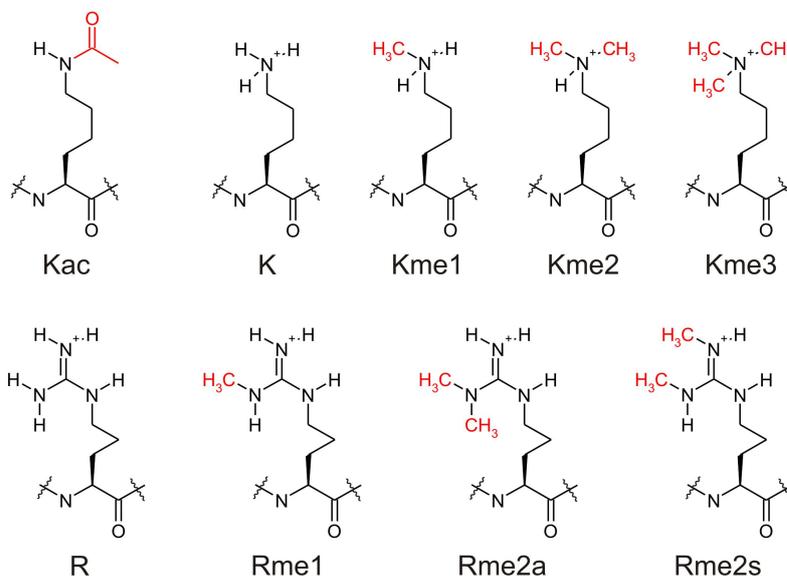


Abb. 1.3 Posttranslationale Modifikationen von Lysin und Arginin

Dimethyliertes Arginin kann in symmetrischer (s) und asymmetrischer (a) Form vorliegen.

Isomerisierung, wobei die ersten drei die am besten untersuchten darstellen (Kouzarides, 2007). Die kovalenten Modifikationen an verschiedenen Aminosäure-Seitenketten werden von zahlreichen Enzymen vermittelt, auch die enzymatische Entfernung von Modifikationen ist von regulatorischer Bedeutung (siehe unten) (Smith & Denu, 2009).

Die Wirkung der Histon-Modifikationen basiert auf zwei grundlegenden Mechanismen:

1) Die Acetylierung von Lysin-Resten führt zum Verlust einer positiven Ladung (vgl. Abb. 1.3), was sich ungünstig auf die Stabilität der Wechselwirkung zur negativ geladenen DNA auswirkt. Auch stört etwa die Acetylierung von Histon H4 an Lysin 16 (H4K16ac) die

Kondensation des Chromatins zur 30 nm-Faser (Shogren-Knaak *et al.*, 2006), eventuell durch Zerstörung der Wechselwirkung des positiv geladenen Lysin-Rests im H4-Schwanz mit dem H2A/H2B-Dimer des benachbarten Nukleosoms (Luger *et al.*, 1997). Daher lockert die Acetylierung von Histonen die Chromatinstruktur auf, was beispielsweise die Transkription der entsprechenden Bereiche begünstigt. Außerdem scheint die Acetylierung die Ablösung von H2A/H2B-Dimeren durch das Chaperon NAP-1 zu erleichtern – vermutlich ein analoger Mechanismus zur Erleichterung der Transkription wie oben für den FACT-Komplex beschrieben (Ito *et al.*, 2000).

2) Der zweite, bei weitem vielschichtigere Mechanismus ist die Erkennung bestimmter Histon-Modifikations-Muster durch Proteine, die wiederum spezifische nachgeschaltete Effekte hervorrufen – ein System, das als "Histon-Code" bezeichnet wird (Strahl & Allis, 2000). Tabelle 1.1 liefert eine Übersicht der Modifikationen nach Histonen geordnet. Die drei am besten erforschten Typen posttranslationaler Modifikation werden im Folgenden ausführlicher dargestellt.

Tabelle 1.1 Bekannte Histon-Modifikationen und ihre Wirkung

Modifikation	Funktion	Referenz
H1K26me	Transkriptions-Reprimierung	Happel & Doenecke, 2009
H2AK5ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H2AK9ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H2AK119ub	Transkriptions-Reprimierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H2A.XS139ph	DNA-Reparatur	Ito, 2007
H2BK5ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H2BK5me1	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H2BK11/16ac	Transkriptions-Reprimierung	Smith, 2008
H2BK12ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H2BK20ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H2BK120ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H2BK120ub	Transkriptions-Aktivierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H3R2me1/2	Transkriptions-Aktivierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H3T3ph	Transkriptions-Aktivierung	Kouzarides, 2007
H3K4ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H3K4me1/2/3	Transkriptions-Aktivierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H3K9ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H3K9me1	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H3K9me2/3	Transkriptions-Reprimierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H3K9/14ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2009
H3S10ph	mitotische Chromatin-Kondensation	Nowak & Corces, 2004
H3S10ph/H3K14ac	Transkriptions-Aktivierung	Walter <i>et al.</i> , 2008
H3R17me	Transkriptions-Aktivierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H3K18ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H3K23ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008

H3R26me	Transkriptions-Aktivierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H3K27ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H3K27me1	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H3K27me2/3	Transkriptions-Reprimierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H3K36ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H3K36me1/3	Transkriptions-Aktivierung	Bernstein <i>et al.</i> , 2007
H3K56ac	Transkriptions-Aktivierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H3K79me1/2/3	Transkriptions-Aktivierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H4R3me2a	Transkriptions-Aktivierung	Strahl <i>et al.</i> , 2001
H4R3me2s	Transkriptions-Reprimierung	Pal <i>et al.</i> , 2004
H4K5ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H4K8ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H4K12ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H4K16ac	Transkriptions-Aktivierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H4K20me1	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008
H4K20me3	Transkriptions-Reprimierung	Li <i>et al.</i> , 2007a
H4K91ac	Transkriptions-Aktivierung	Wang <i>et al.</i> , 2008

• Lysin-Acetylierung

Die Acetylierung von Lysin-Resten (siehe Abb. 1.3) kann sich neben der vorherrschenden Transkriptions-aktivierenden Funktion (z. B. H3K9ac, H3K14ac) in seltenen Fällen auch Transkriptions-reprimierend (H2BK11/16ac) auswirken, so dass die Effekte des Histon-Codes gelegentlich der physikalischen Wirkung der Ladungsänderung entgegenarbeiten (Smith, 2008). Neben der Transkriptionsaktivierung spielt die Acetylierung eine wichtige Rolle beim Einbau neusynthetisierter Histone während der DNA-Replikation. So ist etwa neues Histon H4 an den Lysin-Resten 5 und 12 acetyliert, für Histon H3 variiert die Position je nach Spezies und Histon-Variante (Benson *et al.*, 2006). Das Chaperon CAF-1 bindet spezifisch H3/H4-Dimere mit diesem Acetylierungsmuster, so dass sie bevorzugt während der DNA-Replikation eingebaut werden. Möglicherweise begünstigen die entsprechend acetylierten Histone DNA-Reparaturen und die Auflösung festgefahrener Replikationsgabeln – 20 min bis 60 min nach dem Einbau und damit nach Ende der DNA-Replikation werden die Acetylierungsmuster wieder entfernt (Shahbazian & Grunstein, 2007; Groth *et al.*, 2007).

Die Übertragung der Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Rests erfolgt durch die in die drei Familien GNAT, MYST und p300/CBP eingeteilten Histon-Acetyltransferasen (HATs). Die Acetylierung von H3K14 und H3K18 wird beispielsweise von CBP*, p300, Gcn5 und PCAF katalysiert, wobei die beiden letzteren zusätzlich auch H3K9 acetylieren können (Kouzarides, 2007). Acetylierte Lysin-Reste werden über Bromo-

* Im Rahmen dieser Arbeit wird die etablierte Nomenklatur für Histon-modifizierende Enzyme benutzt, zum Abgleich mit der neuen systematischen Nomenklatur siehe Allis *et al.*, 2007.

Domänen erkannt (Dhalluin *et al.*, 1999). Die Histon-Deacetylasen (HDACs) sind in die Klassen I bis IV eingeteilt (Smith & Denu, 2009).

- **Lysin- und Arginin-Methylierung**

Während die Histon-Acetylierung in den meisten Fällen die Transkription aktiviert, kann die Methylierung von Lysin- und Arginin-Resten (siehe Abb. 1.3) je nach Position und Anzahl der Methyl-Gruppen sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken. So rekrutiert etwa H3K4me3 den Transkriptionsfaktor TFIID und trägt so zur Initiation der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription bei (Vermeulen *et al.*, 2007). Zudem wird es vom Chromatin-Umstrukturierungs-Komplex NURF (ISWI-Familie) erkannt und übt so Einfluss auf die Chromatin-Struktur aus (Kouzarides, 2007). Ein klassisches Beispiel für die reprimierende Wirkung der Histon-Methylierung ist die Rekrutierung des HP1-Proteins durch H3K9me_{2/3}, die zur Abschaltung aktiver Gene und zur Etablierung von Heterochromatin beiträgt (Bernstein *et al.*, 2007) – allerdings gibt es auch Hinweise auf die Assoziation von H3K9me₃ und der γ -Form von HP1 mit aktiv transkribierender RNA-Polymerase II (Vakoc *et al.*, 2005). Auch die Anzahl der angehängten Methylgruppen ist von Bedeutung – so wirken etwa die monomethylierten Formen der drei Modifikationen H3K9me, H3K27me und H4K20me Transkriptions-aktivierend, die di- und trimethylierten Formen jedoch Transkriptions-reprimierend, weil die Bindung durch entsprechende Effektor-Proteine sich unterscheidet (Wang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006). Die verschiedenen Methylierungsgrade werden auch von unterschiedlichen Histon-Methyltransferasen (HMTs) generiert: Set7/9 katalysiert z. B. die Monomethylierung, die MLL-Komplexe die Trimethylierung von H3K4, G9a die Dimethylierung und SUV39H1/2 die Trimethylierung von H3K9 (Smith & Denu, 2009; Shilatifard, 2006). Die HMTs teilen sich in zwei Familien von Lysin-Methyltransferasen, die SET-Domänen- und die DOT1-Familie, sowie eine Familie der Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) auf, als Methylgruppen-Donor dient in allen Fällen S-Adenosyl-Methionin. Die Arginin-Dimethylierung durch verschiedene Mitglieder der PRMT-Familie kann sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch verlaufen (siehe Abb. 1.3), wobei die symmetrische Methylierung Transkriptions-reprimierend und die asymmetrische aktivierend wirkt (Wysocka *et al.*, 2006). Die Erkennung methylierter Lysin- und auch Arginin-Reste erfolgt unter anderem über Chromo-Domänen (Eissenberg, 2001), Tudor-Domänen, MBT-*repeats* (Kim *et al.*, 2006), PHD-Finger-Motive (Shi *et al.*, 2007) und WD40-*repeat*-Proteine (Wysocka *et al.*, 2005). Sowohl für Lysin- als auch Arginin-Reste existieren Histon-Demethylasen (HDMs): LSD1 aus der gleichnamigen Familie entfernt beispielsweise die Methylreste von H3K4me_{1/2}, aufgrund eines abweichenden Reaktionsmechanismus können

Enzyme aus der JHDM-Familie auch Dreifach-Methylierungen abspalten, etwa JMJD2A, eine Demethylase für H3K9me_{2/3} und H3K36me₃. Auch Demethylasen für Arginin-Reste sind mittlerweile bekannt, etwa JMJD6, ein Homolog zur JHDM-Familie mit Spezifität für H3R2me₂ und H4R3me₂ (Smith & Denu, 2009).

- **Serin- und Threonin-Phosphorylierung**

Die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten ist meist mit transkriptioneller Aktivierung verknüpft, etwa am *linker*-Histon H1 (Chadée *et al.*, 1995) oder an H3S10, letzteres im Zusammenhang mit der Aktivierung von c-fos und c-jun (Kouzarides, 2007). Sowohl die zellzyklusabhängige Phosphorylierung von H1 als auch H3S10ph und H3S28ph sind außerdem mit der Chromatin-Kondensation während der Mitose verknüpft (Happel & Doenecke, 2009; Prigent & Dimitrov, 2003). Eine weitere Funktion der Histon-Phosphorylierung liegt in der Erkennung von DNA-Schäden – das Auftreten von H2A.XS139ph (auch als γ H2A.X bezeichnet) stellt ein Schlüsselereignis bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen dar und führt zur Rekrutierung von Signalmolekülen und Chromatin-Umstrukturierungs-Komplexen (Ito, 2007). Die an der Histon-Phosphorylierung beteiligten Kinasen und Phosphatasen sind oft unbekannt oder nicht eindeutig zugeordnet, z. B. wird H3S10ph je nach Zusammenhang mit MSK1/2, der Aurora-B-Kinase, IKK- α oder Snf1 in Verbindung gebracht (Prigent & Dimitrov, 2003). Die Erkennung phosphorylierter Serin-Reste erfolgt über sogenannte 14-3-3-Proteine (Walter *et al.*, 2008).

- **Andere Histon-Modifikationen**

Die exotischeren Histon-Modifikationen wie SUMOylierung, Ubiquitinierung, ADP-Ribosylierung, Arginin-Deiminierung oder Prolin-Isomerisierung sind noch nicht umfassend erforscht, es gibt jedoch Hinweise auf Effekte etwa in der Transkriptionsregulation – z. B. wirkt SUMOylierung in der Hefe Transkriptions-reprimierend, indem es die Acetylierung bzw. Ubiquitinierung von Lysin-Resten blockiert, während H2BK123ub (entspricht H2BK120ub im Menschen) durch Rekrutierung eines zusätzlichen Proteins einen HMT-Komplex dazu befähigt, statt der Monomethylierung von H3K4 auch die noch stärker Transkriptions-aktivierende Di- und Trimethylierung zu katalysieren (Kouzarides, 2007; Shukla *et al.*, 2009).

Die **Verteilung** der verschiedenen posttranslationalen Histon-Modifikationen entlang eines Gens korreliert mit den funktionellen Regionen *Enhancer*, Promotor (mit Transkriptions-Startstelle) und transkribierter Region (siehe Abb. 1.4). Bei transkriptionell aktiven Genen findet man am *Enhancer* bevorzugt H3K4me_{1/2/3}, H3K9me₁, H3K18ac sowie die Variante

H2A.Z. Im Promotor-Bereich treten die gleichen Aktivitäts-Marker sowie H3K9ac und H2BK12ac in verstärktem Maße auf, wobei vor allem H3K4me1/2/3 und H2A.Z eine zweigipfelige Verteilung aufweisen, die wohl auf die beiden der Transkriptions-Startstelle benachbarten strikt positionierten Nukleosomen zurückgeht (Jiang & Pugh, 2009). In der Promotor-Region befinden sich damit diejenigen Histon-Modifikationen bzw. -Varianten,

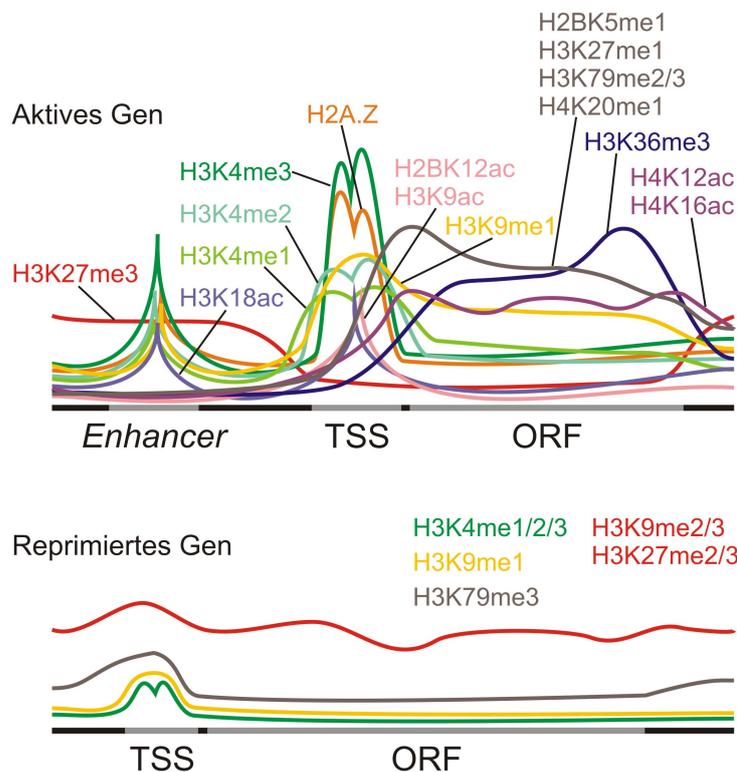


Abb. 1.4 Verteilung von Histonmodifikationen über ein Gen

zusammengestellt aus Barski *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; TSS = Transkriptions-Startstelle

welche die Transkriptions-Initiation erleichtern. Zusätzlich steigen ab der Transkriptions-Startstelle bis in die transkribierte Region hinein die Mengen an H3K79me2/3, H3K27me1, H4K20me1 und H2BK5me1 an, in den weiter Richtung 3'-Ende gelegenen Regionen des transkribierten Bereichs findet man H3K36me3, das an der Transkriptions-Elongation beteiligt ist und durch Rekrutierung der HDAC Rpd3S die Aktivierung kryptischer Initiations-Stellen unterdrückt (Kouzarides, 2007; Lee &

Shilatifard, 2007). Über das gesamte Gen verteilt sind hingegen H4K12ac und H4K16ac, während die Transkriptions-reprimierende Modifikation H3K27me3 deutlich unterrepräsentiert ist.

An transkriptionell inaktiven Genen sind im Gegenzug H3K9me2/3 und H3K27me2/3 über weite Bereiche vertreten, die Aktivierungs-Marker H3K4me1/2/3, H3K9me1 und H3K79me3 finden sich nur in geringem Umfang in der Promotor-Region (Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008; Barski *et al.*, 2007).

Neben der **Bindung** und Rekrutierung von Effektorproteinen wie Transkriptionsfaktoren, Histon-modifizierenden Enzymen und Chromatin-Umstrukturierungs-Komplexen durch bestimmte posttranslationale Histon-Modifikationen gehört umgekehrt auch die Störung solcher Bindungen durch Modifikationen zum Histon-Code. So wird etwa die Bindung

einiger PHD-Domänen-Proteine an H3K4me durch gleichzeitig vorhandenes H3R2me2a deutlich geschwächt (Iberg *et al.*, 2008), ebenso unterbindet H3S10ph die Wechselwirkung von H3K9me3 mit HP1 (Fischle *et al.*, 2005). Im Gegenzug kann das Zusammenspiel mehrerer Modifikationen auch Bindungen stärken, so dass die beobachtete Häufung mehrerer Histon-Modifikationen gleicher Wirkung die Regulation robuster macht (Wang *et al.*, 2008). Die Wechselwirkung von TFIID mit H3K4me3 wird z. B. durch die zusätzliche Acetylierung von H3K9/14 deutlich verstärkt (Cler *et al.*, 2009).

Das **Zusammenspiel** verschiedener Faktoren ist auch der Schlüssel zur Spezifität des Histon-Codes. Da die meisten Histon-Modifikationen sowohl von mehreren Enzymen generiert als auch von verschiedenen Effektor-Proteinen erkannt werden können, lässt sich in den seltensten Fällen einer einzelnen Modifikation ein spezifischer Effekt zuordnen. Erst die Kombination verschiedener Modifikationen sowie die Erkennung durch Kontext-spezifische Protein-Komplexe ermöglicht die komplexe Regulation, die der Histon-Code bietet. So kann etwa H3S10ph in Kombination mit H3K14ac die Transkription bestimmter Gene aktivieren, während in Kombination mit H3T3ph und H3K9me die mitotische Chromatin-Kondensation stattfindet (Walter *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2005). Sowohl Histon-modifizierende Enzyme als auch Modifikationen-erkennende Effektorproteine treten oft als Komplexe auf, was ihre Spezifität ebenfalls erhöht. So kann etwa LSD1 sowohl H3K9 als auch H3K4 demethylieren, je nachdem, ob es mit dem Androgen-Rezeptor in Wechselwirkung tritt oder nicht (Kouzarides, 2007). Desweiteren findet man beispielsweise die Eaf3-Untereinheit, die alleine sowohl H3K4me als auch H3K36me binden kann, sowohl im H3K4me-bindenden NuA4-HAT-Komplex als auch im H3K36me-bindenden Rpd3S-HDAC-Komplex – dieselbe Komponente ist also in Komplexen mit gegenläufiger Wirkung vertreten (Li *et al.*, 2007b; Xu *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass viele am Histon-Code beteiligte Effektor-Proteine Teil von Multiproteinkomplexen sind, erhöht damit die Spezifität, die Affinität und auch die Regulierbarkeit der Bindung an posttranslationale Histon-Modifikationen (Ruthenburg *et al.*, 2007).

Direkt an der DNA spielt sich im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen epigenetischen

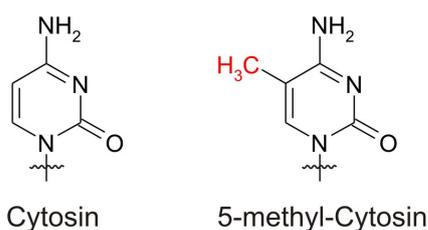


Abb. 1.5 Cytosin und Methyl-Cytosin

Mechanismen die an der Stilllegung von Genen beteiligte **Methylierung von Cytosinen** ab, die quasi ausschließlich an CG-Dinukleotiden, unter Andeutung des Phosphodiesters auch CpG-Motive genannt, stattfindet (siehe Abb. 1.5). CpG-Motive sind in

Vertebratengenomen mit einem Vorkommen von 25 % bis 30 % der statistisch erwarteten Menge deutlich unterrepräsentiert, eine der Ursachen ist die spontane Desaminierung von methyl-Cytosin zu Thymin, die im Gegensatz zur Desaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil nicht von den DNA-Reparatursystemen erkannt wird. Daraus lässt sich schließen, dass die im Genom verbliebenen Bereiche mit hoher CpG-Dichte, als CpG-Inseln bezeichnete Regionen von mindestens 500bp Länge, zumindest in der Keimbahn unmethyliert sind. CpG-Inseln finden sich in 60 % der humanen Promotoren, häufig in unmethylierter Form bei konstitutiv aktiven Haushalts-Genen, es gibt jedoch auch zahlreiche Beispiele für die gewebsspezifische Methylierung von CpG-Inseln, die während der Zelldifferenzierung zur Stilllegung der entsprechenden Gene führt (Hoelzer *et al.*, 2008; Bernstein *et al.*, 2007). Weitere Bereiche mit ausgedehnter CpG-Methylierung stellen Transposons und repetitive Sequenzen dar, die bis zu 50 % des Humangenoms ausmachen und deren Ruhigstellung neben anderen Heterochromatin-typischen Modifikationen durch DNA-Methylierung gewährleistet wird (Cordaux & Batzer, 2009; Ikegami *et al.*, 2009). Auch während der Keimzellbildung und der Embryonalentwicklung finden weitreichende De- und Remethylierungen statt, die z. B. – bekannt als *genomic imprinting* – die Expression von maternalen und paternalen Kopien bestimmter Gene unterschiedlich regulieren (Reik & Walter, 2001). Die Entstehung mancher Tumorzellen wird ebenfalls mit Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster in Verbindung gebracht, die zur Stilllegung von Tumorsuppressorgenen führen, während das restliche Genom weitreichend demethyliert wird (Jones & Baylin, 2002). Auch Promotoren ohne CpG-Inseln können einzelne CpG-Motive beinhalten, die über ihre Methylierung die Transkription negativ beeinflussen. Dies geschieht durch die Bindung von methyliertem CpG durch Proteine mit Methyl-Bindedomänen (MBD) wie MBD1/2 und MeCP2, die reprimierende Komplexe rekrutieren. Zudem werden manche Transkriptionsfaktoren durch DNA-Methylierung von der Bindung an ihre Zielsequenzen abgehalten. Die Methylierung von CpG-Motiven erfolgt mittels S-Adenosyl-Methionin durch die DNA-Methyltransferasen Dnmt1 und Dnmt3a/b, wobei erstere in frisch replizierter DNA das Methylierungsmuster auf den neuen Strang überträgt, während letztere *de novo*-Methylierungen durchführen (Bernstein *et al.*, 2007; Bird, 2002; Luijsterburg *et al.*, 2008). Obwohl Mechanismen zur Entfernung der Methylierung durch *base-excision*-Reparatur existieren, ist die CpG-Methylierung eine äußerst stabile Modifikation, welche die Stilllegung von Genen über lange Zeit aufrechterhalten kann und so die leichter reversible Inaktivierung durch Histon-Modifikationen zementiert (Niehrs, 2009; Szyf, 2009).

Ebenfalls zu den epigenetischen Regulationsmechanismen gezählt werden manche **RNA**-basierten Phänomene wie RNA-Interferenz (RNAi) oder die von der XIST-RNA induzierte Stilllegung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Embryos (Goldberg *et al.*, 2007; Chow & Heard, 2009).

Die verschiedenen Ebenen der epigenetischen Regulation stehen untereinander in Verbindung und bilden auf diese Weise ein **komplexes Netzwerk**. So wird etwa die Bindung des Transkriptionsfaktors TFIID an H3K4me3 wie schon erwähnt durch gleichzeitige Acetylierung von H3K9 und H3K14 verstärkt, während H3R2me2a die Wechselwirkung schwächt (Vermeulen *et al.*, 2007). Zudem wird die Bindung und Aktivität vieler Histon-modifizierender Enzyme ihrerseits durch bestimmte Histon-Modifikations-Muster verändert. Doch die verschiedenen Histon-Modifikationen beeinflussen sich nicht nur wechselseitig, ebenso sind sie an der Rekrutierung von Chromatin-Umstrukturierungs-Komplexen beteiligt, die häufig Bromo-, Chromo- oder PHD-Domänen aufweisen. Auch die Aktivität dieser Komplexe kann durch Histon-Modifikationen variiert werden, z. B. erhöht Histon-Acetylierung die Umstrukturierungs-Effizienz von SWI/SNF-Komplexen (Clapier & Cairns, 2009). Auch zwischen DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen gibt es ein Zusammenspiel in beide Richtungen. So ist ein G9a enthaltender Komplex bei der Stilllegung von Genen sowohl zur Methylierung von H3K9 als auch zur Rekrutierung von Dnmt3a/b für die DNA-Methylierung in der Lage. Umgekehrt können Methyl-CpG-Bindeproteine wie MeCP2 HDACs und wohl auch G9a rekrutieren, um nach der DNA-Replikation die Heterochromatin-typischen Histon-Modifikationen in CpG-methylierten Bereichen wiederherzustellen (Cedar & Bergman, 2009).

Die **Aufrechterhaltung** des epigenetischen Modifikationsmusters während der DNA-Replikation ist von immenser Wichtigkeit, etwa um den Differenzierungsstatus bestimmter Zelltypen zu erhalten. Das Kopieren der DNA-Methylierung erfolgt durch Dnmt1, die über PCNA zur Replikationsgabel rekrutiert wird und passend zum Muster auf den alten Strängen die CpG-Methylierung auf den neusynthetisierten Strängen ergänzt. Für die Histon-modifikationen fehlt eine derartige Matrize, da die Nukleosomen während der DNA-Replikation disassembliert werden. Wie eben beschrieben kann allerdings die DNA-Methylierung als Hinweis auf die Heterochromatin-Natur der DNA dienen, indem HMTs rekrutiert werden. Zudem bildet das Histon-Chaperon CAF-1 einen Komplex mit einer HMT und dem Methyl-CpG-bindenden MBD1, der eventuell die H3/H4-Dimere schon vor ihrem Einbau in Nukleosomen mit reprimierenden Modifikationen versieht. Andere Hinweise

deuten auf eine Spaltung der alten Nukleosomen durch ASF1a und eine zufällige Verteilung der H3/H4-Dimere auf die Tochterstränge hin. Die Modifikationen auf den neu hinzugekommenen Histonen müssten daraufhin passend ergänzt werden. Histon-Varianten werden während der DNA-Replikation mit kanonischen Histonen "verdünnt" und können erst später wieder durch die entsprechenden Chaperone eingebaut werden, wofür die umgebende Chromatin-Struktur den Anstoß liefert (Corpet & Almouzni, 2009; Probst *et al.*, 2009).

Der Begriff 'Epigenetik' wird also im Rahmen dieser Arbeit dahingehend verwendet, dass er die vier bedeutenden regulatorischen Mechanismen Chromatin-Umstrukturierung, Histon-Varianten, posttranslationale Histon-Modifikationen und DNA-Methylierung umfasst.

1.3 Epigenetik bei Herpesviren

Als im Kern replizierende DNA-Viren erfüllen Herpesviren die Voraussetzungen für eine epigenetische Regulation des Infektionsverlaufs. Grundsätzlich sind drei verschiedene Zustände des Virusgenoms zu unterscheiden: die enkapsidierte DNA im Virion sowie das im Wirtszellkern lokalisierte Genom während der Latenz oder der lytischen Infektion.

• Virion

Obwohl z. B. Papillom- und Polyomaviren-Genome in Nukleosomen verpackt in den Kapsiden vorliegen (Favre *et al.*, 1977; Ponder *et al.*, 1978), wurden weder in HCMV-Virionen noch in den Partikeln der humanen γ -Herpesviren EBV oder KSHV relevante Mengen an Histonen gefunden (zusammengefasst in Maxwell & Frappier, 2007), was den Schluss nahelegt, dass Herpesviren die Verdichtung ihrer Genome in den beengten Kapsiden nicht durch Proteine bewerkstelligen. Die Ladungsneutralisation der DNA scheint in Virionen des humanen α -Herpesvirus HSV-1 zumindest teilweise durch das Polyamin Spermin geleistet zu werden (Gibson & Roizman, 1971). Auch in HCMV-infizierten Zellen steigt die Produktion von Polyaminen an, Spermin wird ebenfalls in die Kapside verpackt (Clarke & Tys, 1991). Somit gelangt zu Beginn der Infektion Nukleosomen-freie DNA in den Kern der Wirtszelle.

• Latenz

Während der Latenz, die bei HSV-1 in Neuronen stattfindet, bei HCMV in CD34-positiven myeloiden Vorläuferzellen und bei EBV und KSHV in B-Lymphozyten, liegen Herpesvirusgenome normalerweise als zirkuläre Episomen vor. Für HSV-1, EBV und KSHV wurde gezeigt, dass ihre Genome im latenten Zustand eine reguläre Nukleosomenanordnung ähnlich der im zellulären Genom aufweisen (Deshmane & Fraser, 1989; Shaw *et al.*, 1979; Stedman

et al., 2004). Die Verpackung der viralen Genome in Nukleosomen erfolgt höchstwahrscheinlich durch Mechanismen der Wirtszelle, möglicherweise unter Beteiligung der DNA-Replikations-abhängigen Maschinerie in einer einzelnen Replikationsrunde vor Eintritt in die Latenz (Paulus *et al.*, 2010). Im Stadium der Latenz werden nur einzelne Proteine und/oder RNAs abgelesen, die z. B. für die Vermeidung von Apoptose oder die Erhaltung des viralen Episoms während der Teilung der Wirtszelle notwendig sind: das *latency-associated transcript* (LAT) bei HSV-1, die CMV *latency-associated transcripts* (CLTs), das *latency-associated nuclear antigen* (LUNA) und UL138 bei HCMV, die EBV *nuclear antigens* 1-6 (EBNA1-6), EBV-*encoded RNAs* 1-2 (EBER1-2) und die *latent membrane proteins* (LMPs) bei EBV sowie das *latency-associated nuclear antigen* (LANA) bei KSHV.

Diese Gene sind folglich während der Latenz durch Transkriptions-aktivierende epigenetische Markierungen gekennzeichnet. So weist etwa der LAT-Promotor erhöhte Mengen an H3K9/14ac auf (Kubat *et al.*, 2004). Bei EBV findet man H3K4me entsprechend der jeweiligen Aktivität bei Latenztyp I auf den EBER-Sequenzen und dem Latenz-Replikationsursprung oriP, bei Latenztyp III zusätzlich am LMP1-Promotor und dem EBNA-Cp-Promotor – umgekehrt sind die im jeweiligen Latenztyp inaktiven DNA-Sequenzen mit H3K9me versehen (Day *et al.*, 2007; Minarovits, 2006; Fejer *et al.*, 2008). Zudem ist die Nukleosomen-Besetzung im Bereich der EBER- und oriP-Region deutlich aufgelockert (Wensing *et al.*, 2001). Außerdem müssen während der Latenz die lytischen Gene, vor allem die mit starken Promotoren versehenen IE-Gene, transkriptionell inaktiv gehalten werden, um die Latenz aufrechtzuerhalten. Entsprechend findet sich an lytischen HSV-Promotoren ein Transkriptions-reprimierendes Modifikationsmuster mit geringen Mengen an H3K9/14ac und H3K4me₂ sowie hohen Mengen an H3K9me_{2/3}, H3K27me₃ und der Histon-Variante macroH2A (Kubat *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Kwiatkowski *et al.*, 2009). Ebenso ist der HCMV *major immediate early* Promotor (MIE P) während der Latenz mit dem H3K9me-bindenden HP1 β besetzt, während acetylierte Histone unterrepräsentiert sind (Sinclair, 2009). Am Promotor des für das KSHV-IE-Protein Rta codierenden ORF50 findet CpG-Methylierung statt, zusätzlich wird die Transkriptions-Startstelle durch ein Nukleosom verdeckt (Lu *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2001). DNA-Methylierung kommt bei KSHV sowie bei den meisten α - und β -Herpesviren, die keine genomweite CpG-Supprimierung aufweisen, nur lokal begrenzt – etwa am ORF50-Promotor – zum Einsatz (Pantry & Medveczky, 2009; Honess *et al.*, 1989). Das EBV-Genom hingegen ist wie die meisten γ -Herpesvirengnome

CpG-supprimiert und DNA-Methylierung spielt bei der Regulation der Latenz eine bedeutende Rolle: Je nach Latenztyp sind z. B. verschiedene alternative EBNA-Promotoren aktiv – hier findet man keine CpG-Methylierung, während die jeweils inaktiven Promotoren ebenso wie der Großteil des EBV-Genoms deutlich methyliert sind (Minarovits, 2006; Hoelzer *et al.*, 2008). Die epigenetische Stilllegung der lytischen Gene während der Latenz wird von viralen Genprodukten durch Manipulation der zellulären Histon-Modifikations-Maschinerie herbeigeführt, um die Latenz aufrechtzuerhalten. So führt etwa das HSV-1-LAT durch einen noch nicht komplett aufgeklärten Mechanismus zu erhöhten Mengen an H3K9me3 und H3K27me3 an lytischen Genen (Cliffe *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005).

- **Lytischer Zyklus**

Im lytischen Zyklus kehren sich einige der während der Latenz beobachteten epigenetischen Effekte um, so dass die Latenz-spezifischen Gene reprimiert, die lytischen Gene hingegen aktiviert werden, um die Infektion voranzutreiben. Generell ist die Nukleosomen-Besetzung etwa bei HSV-1 und EBV im Vergleich zur Latenz deutlich geringer (Muggeridge & Fraser, 1986; Shaw *et al.*, 1979). Die Nukleosomen auf dem HSV-1-Genom sind nach wie vor aus allen vier *core*-Histonen aufgebaut, ihre Menge ist jedoch im Vergleich zum zellulären Genom deutlich geringer und die Abfolge ist eher unregelmäßig mit variierenden Abständen zwischen den einzelnen Nukleosomen (Kutluay & Triezenberg, 2009; Herrera & Triezenberg, 2004; Kent *et al.*, 2004). Diese Auflockerung der Chromatinstruktur während der lytischen Infektion erleichtert wahrscheinlich die Transkription der zahlreichen herpesviralen Gene.

Aktuelle Experimente mit HSV-1 zeigen, dass das nackte Virusgenom zu Beginn der Infektion vorwiegend mit der Transkriptions-aktivierenden Variante H3.3 besetzt wird, später kommt Replikations-abhängig eingebautes kanonisches H3.1 hinzu. Es ist unklar, ob die HIRA-abhängige Besetzung mit H3.3 vom Virus gesteuert wird oder nur die Reaktion der zellulären Besetzungsmaschinerie auf das neu auftauchende Substrat ist; die Histon-Variante fördert aber in jedem Fall die Infektion, ein zu vermindertem H3.3-Einbau führender HIRA-*knockdown* resultiert in gestörter viraler Genexpression und DNA-Replikation (Placek *et al.*, 2009).

Auch auf die Beteiligung posttranslationaler Histonmodifikationen an der Regulation der lytischen Infektion gibt es zahlreiche Hinweise. So findet man an lytischen HSV-1-Genen ein Modifikationsmuster ähnlich dem an aktiven zellulären Loci. Der Zeitpunkt des Anstiegs der Mengen an H3K9ac und vor allem H3K4me3 an verschiedenen viralen Genen korrespondiert mit deren kinetischen Klassen: IE-Gene zeigen schon vor E-Genen Transkriptions-aktivierende Modifikationen. Auch der Anstieg des ansonsten konstanten H3K9me2-Niveaus

am IE-Gen ICP0 spät in der Infektion passt zur Abschaltung dieses Gens zu diesem Zeitpunkt (Kent *et al.*, 2004). Versuche mit HDAC-Inhibitoren legen nahe, dass auch die Aktivierung des lytischen Zyklus bei EBV mit Histon-Acetylierung einhergeht (Countryman *et al.*, 2008). Ebenfalls durch Histon-Acetylierung gesteuert wird die Aktivierung des ORF50-Promotors bei KSHV, indem ein Chromatin-Umstrukturierungs-Komplex der SWI/SNF-Familie rekrutiert wird, der das Nukleosom von der Transkriptions-Startstelle entfernt (Lu *et al.*, 2003).

Auch die inhibierende DNA-Methylierung am ORF50-Promotor wird bei dessen Aktivierung entfernt (Chen *et al.*, 2001). Das während der Latenz weitreichend mit CpG-Methylierung versehene EBV-Genom erfährt im lytischen Infektionszyklus zumindest abschnittsweise eine Demethylierung (Szyf *et al.*, 1985). Das Umschalten zum lytischen Zustand erfolgt durch das von BZLF1 codierte Zta-Protein, einen IE-Transaktivator, der bevorzugt an CpG-methylierte lytische Promotoren bindet und sie über eine Wechselwirkung mit der HAT CBP durch Histon-Acetylierung aktiviert – auf diese Weise ist trotz ausgedehnter DNA-Methylierung die Beendigung des Latenz-Zustandes möglich (Bhende *et al.*, 2004).

Die epigenetische Regulation der Infektion wird zu einem großen Teil von den Viren selbst bestimmt, die über zahlreiche Wechselwirkungen mit viralen Proteinen die zellulären Maschinerien für ihre Zwecke ausnutzen (zur Übersicht siehe Tabelle 1.2). So wird z. B. die Nukleosomenbesetzung während der lytischen Phase aktiv gering gehalten: Das HSV-1-Protein VP16 verringert die Histon-Besetzung an viralen IE-Promotoren und interagiert ebenso wie ICP8 mit Komponenten eines Chromatin-Umstrukturierungs-Komplexes der SWI/SNF-Familie, VP22 übt eventuell eine ähnliche Funktion durch Bindung an das Histon-Chaperon TAF-I aus (Knipe & Cliffe, 2008; Herrera & Triezenberg, 2004; Taylor & Knipe, 2004; van Leeuwen *et al.*, 2003). Auch das IE-Protein ICP0 führt zu einem Rückgang der Chromatinisierung von lytischen Promotoren aller kinetischen Klassen (Cliffe & Knipe, 2008; Ferenczy & DeLuca, 2009), als Mechanismen wurden sowohl die von ICP0 induzierte Histon-Acetylierung und die daraus folgende Chromatin-Auflockerung als auch der proteasomale Abbau von Histonen, gezeigt etwa für die Histon-Variante CENP-A, vorgeschlagen (Cliffe & Knipe, 2008; Lomonte *et al.*, 2001). Auch für HCMV- (pUL38), EBV- (EBNA2) und KSHV-Proteine (Rta) wurden Wechselwirkungen mit Chromatin-Umstrukturierungs-Komplexen der CHD- bzw. SWI/SNF-Familie nachgewiesen (Moorman *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 1996; Gwack *et al.*, 2003). Zudem hat das EBV-Latenzprotein EBNA1 die Fähigkeit, Nukleosomen am latenten Replikationsursprung oriP zu destabilisieren und ihn

so zugänglich zu machen (Avolio-Hunter *et al.*, 2001), das KSHV-Protein LANA kann mit Histon H2A/H2B-Dimeren und dem *linker*-Histon H1 interagieren (Barbera *et al.*, 2006; Cotter & Robertson, 1999).

Tabelle 1.2 Herpesvirale Proteine und ihr Einfluss auf virales Chromatin

Virus	Protein	Wirkung auf virales Chromatin	Mechanismus
HSV-1	ICP0	verringerte Histon-Besetzung an lytischen Promotoren; erhöhte Histon-Acetylierung und geringe Mengen an H2Aub, H3K9me und HP1 an viraler DNA	evtl. Chromatin-Auflockerung durch Histon-Acetylierung oder proteasomalen Abbau von Histonen; vermutete HDAC-Inhibition
	ICP8		Interaktion mit Komponenten eines SWI/SNF-Komplexes; HDAC-Bindung
	VP16	verringerte Histon-Besetzung an IE-Promotoren; erhöhte Histon-Acetylierung	Interaktion mit Komponenten eines SWI/SNF-Komplexes; Rekrutierung von HATs und der HMT Set1
	VP22	verringerte Histon-Besetzung	Interaktion mit dem Histon-Chaperon TAF-I
HCMV	IE1	erhöhte Histon-Acetylierung	HDAC-Inhibition
	pUL38		Interaktion mit Umstrukturierungskomplexen der CHD-Familie
EBV	EBNA1	erhöhte Zugänglichkeit des oriP durch Nukleosomen-Destabilisierung	
	EBNA2		Interaktion mit Umstrukturierungskomplexen der SWI/SNF-Familie
KSHV	LANA		Interaktion mit H2A/H2B und H1; Rekrutierung der HMT SUV39H1; Bindung von HATs
	Rta		Interaktion mit Umstrukturierungskomplexen der SWI/SNF-Familie sowie mit HAT und HDAC

In der Tabelle sind nur die im Text erwähnten viralen Proteine aufgelistet, für einen umfassenden Überblick siehe Paulus *et al.*, 2010

Auch im Bereich der Histon-Modifikationen gibt es Beispiele für die Regulation durch virale Proteine: So rekrutiert etwa das HSV-1-Protein VP16 zahlreiche HATs sowie die HMT Set1, welche für die Trimethylierung von H3K4 an IE-Genen verantwortlich ist (Knipe & Cliffe, 2008; Herrera & Triezenberg, 2004; Lieberman, 2008). Auch das IE-Protein ICP0 erzeugt ein Transkriptions-aktivierendes Modifikationsmuster an E- und L-Genen: geringe Mengen an

H2Aub, H3K9me und HP1 sowie erhöhte H3-Acetylierung (Lilley *et al.*, 2009; Ferenczy & DeLuca, 2009). ICP0 erhöht die Acetylierung von Histonen vermutlich indirekt, indem es – wie auch ICP8 – an HDACs bindet und dann ihre Funktion hemmt (Cliffe & Knipe, 2008; Lomonte *et al.*, 2004; Taylor & Knipe, 2004). Auch HCMV verfügt mit dem IE1-Protein über einen potenten HDAC-Inhibitor zur Aktivierung der viralen Genexpression (Nevels *et al.*, 2004). Die transaktivierende Funktion des ORF50-codierten Rta-Proteins (KSHV) kann durch die Bindung an die HAT CBP oder an HDAC1 positiv oder negativ reguliert werden (Gwack *et al.*, 2001). Auch andere KSHV-Proteine können mit CBP oder p300 interagieren (Pantry & Medveczky, 2009), außerdem rekrutiert das Latenz-Protein LANA die HMT SUV39H1 und HP1 zum viralen Genom und erhält auf diesem Weg wahrscheinlich den reprimierten Chromatin-Status der lytischen Gene während der Latenz aufrecht (Sakakibara *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2003).

Herpesviren nutzen also die epigenetischen Regulationsmechanismen der Wirtszelle aus, um ihre Genexpression den verschiedenen Phasen ihres Replikationszyklus während der latenten oder lytischen Infektion anzupassen. Höchstwahrscheinlich nutzen aber auch die Zellen epigenetische Mechanismen zur **Abwehr von Virusinfektionen**. Ein Beispiel hierfür stellen die **PML-Körper** dar, nukleäre Multiproteinkomplexe mit zahlreichen Funktionen (Bernardi & Pandolfi, 2007). Die PML-Körper werden als Bestandteil der antiviralen Antwort der Zelle angesehen – einige Hauptbestandteile sind durch infolge einer Virusinfektion ausgeschüttetes Interferon α/β induzierbar, am Eintrittsort viraler Genome in den Zellkern bilden sich PML-Körper und bleiben mit den Genomen assoziiert, und nicht zuletzt sind zahlreiche Viren, darunter HSV-1, HCMV und EBV, in der Lage, die PML-Körper im Zuge der lytischen Infektion z. B. durch Abbau des PML-Proteins zu zerstören. Die Komplexe beinhalten einige an epigenetischen Regulationsmechanismen beteiligte Proteine, etwa das Histon-Chaperon HIRA, das SWI/SNF-Protein ATRX, das HP1-Protein sowie HDACs und DNA-Methyltransferasen und kommen daher als Orte transkriptioneller Reprimierung in Betracht (Everett & Chelbi-Alix, 2007; Tavalai & Stamminger, 2008; Saffert & Kalejta, 2008). Der PML-Körper-Bestandteil Daxx interagiert mit den *core*-Histonen und erzeugt in Kombination mit HDACs einen Transkriptions-reprimierenden Chromatin-Status am MIE P (Hollenbach *et al.*, 2002; Puto & Reed, 2008; Woodhall *et al.*, 2006). Das Tegumentprotein pp71 induziert den proteasomalen Abbau von Daxx und hebt so die *Inhibition* des MIE P auf – das infolgedessen exprimierte IE1-Protein löst daraufhin die PML-Körper auf (Saffert & Kalejta, 2006; Tavalai & Stamminger, 2008). Während der Latenz scheint pp71 hingegen im

Cytoplasma zu bleiben, so dass die Daxx-vermittelte Reprimierung des MIE P aufrechterhalten wird (Saffert & Kalejta, 2007). Möglicherweise versucht die infizierte Zelle also mit Hilfe der PML-Körper, die eingedrungenen viralen Genome auf epigenetischem Weg stillzulegen. Allerdings haben Herpesviren aufgrund der langen Koevolution Möglichkeiten entwickelt, diesem Abwehrmechanismus entgegenzuwirken und ihn vielleicht sogar auszunutzen – so gibt es Hinweise darauf, dass mit PML-Körpern assoziierte virale Genome mit höherer Wahrscheinlichkeit transkribiert und repliziert werden (Ishov *et al.*, 1997; Sourvinos & Everett, 2002).

1.4 Zielsetzung

Das Interesse an epigenetischer Regulation hat in den Biowissenschaften vor allem im letzten Jahrzehnt nicht zuletzt aufgrund eines besseren Verständnisses der zugrundeliegenden Mechanismen stark zugenommen. Auch Virusinfektionen werden zunehmend auf ihre epigenetische Regulation hin untersucht.

Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur wenig über die Nukleosomen-Besetzung der viralen DNA geschweige denn über das Histon-Modifikationsmuster während der lytischen HCMV-Infektion bekannt war, sollte eine detaillierte und umfassende Analyse der Chromatinisierung des HCMV-Genoms im Verlauf der lytischen Infektion erstellt werden. Auch die mechanistischen Grundlagen der Chromatinisierung viraler DNA sollten dabei zumindest ansatzweise beleuchtet werden. Desweiteren sollte untersucht werden, wie das Histon-Modifikationsmuster am viralen Genom sich im Infektionsverlauf verändert und ob durch gezielte Manipulationen dieses Musters Auswirkungen auf die virale Replikation erzielt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zum immunologischen Nachweis von Proteinen durch Western Blot (WB, siehe 2.3.2) und Immunfluoreszenzverfahren (IF, siehe 2.3.4) sowie zur Chromatinimmunpräzipitation (ChIP, siehe 2.3.3) eingesetzt.

Tabelle 2.1 Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Quelle	Nr.*	eingesetzte Mengen
m-anti-Histon H1	abcam ab7789	39	5 µg (ChIP)
rb-anti-Histon H2A	abcam ab18255	41	4 µg (ChIP)
rb-anti-Histon H2B	abcam ab1790	42	10 µg (ChIP)
rb-anti-Histon H3	abcam ab1791	40	5 µg (ChIP)
rb-anti-Histon H4	Cell Signaling 2592	51	10 µl (ChIP)
rb-anti-Histon H2AK5ac	abcam ab1764	78	10 µl (ChIP)
rb-anti-Histon H2BK5/K12/K15/K20ac	upstate 07-373	88	10 µg (ChIP)
rb-anti-Histon H3K14ac	upstate 07-353	82	10 µl (ChIP)
rb-anti-Histon H3K9/K14ac	upstate 06-599	92	10 µg (ChIP)
rb-anti-Histon H3K4me2	upstate 07-030	93	10 µl (ChIP)
rb-anti-Histon H3K4me3	abcam ab8580	70	10 µl (ChIP)
rb-anti-Histon H3K9me2	upstate 07-441	94	10 µg (ChIP)
rb-anti-Histon H3K9me3	abcam ab8898	75	9 µl (ChIP)
rb-anti-Histon H4K5/K8/K12/K16ac	upstate 06-866	46	10 µl (ChIP)
rb-anti-GAPDH	abcam ab9485	-	1:2 000 (WB)
m-anti-α-Tubulin	Invitrogen A11126	-	1:2 000 (WB)
rb-anti-ASF1a 87	Zhang <i>et al.</i> , 2005	108	1:500 (IF), 1:4 000 (WB)
rb-anti-CAF-1 (p48)	abcam ab1765	113	1:500 (IF), 1:2 000 (IF, WB)
rb-anti-PCNA	abcam ab18197	110	1:2 000 (IF, WB)
m-anti-IE1 1B12	Zhu <i>et al.</i> , 1995	29	1:10 (WB)
m-anti-IE2 3A9	unveröffentlicht [#]	32	1:20 (IF)
m-anti-ppUL44	GeneTex GTX 26501	86	1:5 000, 1:10 000 (IF), 1:2 000 (WB)
m-anti-pp28 10B4-29	Silva <i>et al.</i> , 2003	71	1:10 (WB)
gt-anti-mIgG +HRP	Dianova 115-036-003	-	1:10 000 (WB)
gt-anti-rbIgG +HRP	Millipore AP156P	-	1:10 000 (WB)
gt-anti-mIgG +Alexa Fluor 594	Invitrogen A11032	-	1:1 000 (IF)
gt-anti-rbIgG +Alexa Fluor 488	Invitrogen A11008	-	1:1 000 (IF)
IgG aus rb-Serum	Sigma I5006	-	10 µg (ChIP)
IgG aus Humanserum	Sigma I2511	-	0,02 % [w/v] (IF)

* Nummer in der Antikörper-Datenbank der Arbeitsgruppe

[#] A. Marchini, H. Zhu und T. Shenk, unveröffentlicht

Speziesbezeichnungen: m = Maus, rb = Kaninchen, gt = Ziege

2.1.2 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion und Biomers in HPLC-gereinigter Form bezogen. Sie kamen in der quantitativen *real time*-PCR (siehe 2.2.6) und bei der Herstellung von Sonden für Southern Blots (siehe 2.2.2) zum Einsatz.

Tabelle 2.2 Verwendete Oligonukleotide

Amplikon	Sequenz in 5' → 3' Richtung	Nr.*
GAPDH T	CCTCACAGTTGCCATGTA	304
GAPDH T	GATGGTACATGACAAGGTG	305
GAPDH T (1.Exon)	TCGACAGTCAGCCGCATCT	492
GAPDH T (1.Exon)	CTAGCCTCCCGGGTTTCTCT	493
TUBB T	TATCAGCAGTACCAGGATGC	363
TUBB T	TGAGAAGCCTGAGGTGATG	364
RPL30 T	CAAGGCAAAGCGAAATTGGT	494
RPL30 T	GCCCGTTCAGTCTCTTCGATT	495
MyoD T	CCGCCTGAGCAAAGTAAATGA	496
MyoD T	GGCAACCGCTGGTTTGG	497
HBG P	GCCTTGACCAATAGCCTTGACA	409
HBG P	GAAATGACCCATGGCGTCTG	410
Sat2	ATCGAATGGAAATGAAAGGAGTCA	498
Sat2	GACCATTGGATGATTGCAGTCA	499
18S-rDNA	GCTCGTAGTTGGATCTTG	432
18S-rDNA	GGCATCACAGACCTGTTA	433
MIE P	CTTACGGGACTTTCCTACTTG	84
MIE P	CGATCTGACGGTTCCTAA	85
MIE P	GGTGTCTTCTATGGTCAA	427
MIE P	CCGATAGAGATGGCGATA	431
MIE T	CCTAGTGTGGATGACCTA	292
MIE T	GTGACACCAGAGAATCAG	293
MIE T	GACGAAGAGGAAGTATCT	429
MIE T	CTCACTACATGTGTGGAA	430
UL54 P	CACCAAAGACACGTCGTT	294
UL54 P	GTCCTTTGCGACCAGAAT	295
UL54 T	GTGTGCAACTACGAGGTA	296
UL54 T	GACAGCACGTTGGTTACA	297
UL32 P	ACTGGTACTGCGGTTCTA	298
UL32 P	TCCACAACACCACGGTGA	299
UL32 T	CCGATTACAACGACGTCA	300
UL32 T	GTGGATGTCGTCGTCATT	301
oriLyt	GAATACAGCGATCCCTAG	288
oriLyt	GGGTTCCACCTATCTGAA	289

* Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

2.1.3 Zellen

Sämtliche Versuche wurden mit primären humanen Lungenfibroblasten (MRC-5, Jacobs *et al.*, 1970) durchgeführt.

2.1.4 Viren

Für sämtliche Versuche wurde der laboradaptierte HCMV-Stamm Towne (CRQ208) eingesetzt (Plotkin *et al.*, 1975; Greaves & Mocarski, 1998).

2.2 Nukleinsäure-Methoden

2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese mit 150 ml Gelvolumen und ca. 830 ml Puffervolumen durchgeführt. Die Proben wurden zuvor mit 1/5 Volumen 6× DNA-Auftragspuffer versetzt, 5 µg eines geeigneten DNA-Größenstandards wurden mitgeführt. Sofern im Anschluss kein Southern Blot erfolgte, wurden Gel und Puffer (Zugabe in die Anoden-Pufferkammer wegen der Laufrichtung) jeweils mit 1/4 000 Volumen Ethidiumbromid-Stammlösung versetzt. Proben aus dem MNase-Verdau gereinigter DNA (siehe 2.2.3) wurden in 1,5%-igen Gelen mit 4°C-kaltem 1× TAE-Puffer für ca. 3 h bei 100 V aufgetrennt. Bei Proben aus dem MNase-Verdau intrazellulärer DNA (siehe 2.2.3) erfolgte die Auftrennung in 1,2%-igen Gelen mit 4°C-kaltem 1× TAE-Puffer für ca. 3 h bei 120 V. Proben aus Psoralen-Quervernetzungsanalysen (siehe 2.2.5) wurden in 1%-igen Gelen über Nacht (15 h 20 min) mit 21°C-warmem Puffer (1× TBE wegen der höheren Pufferkapazität) bei 55 V (18S-rDNA-Locus) bzw. 60 V (MIE P- und MIE T-Loci) aufgetrennt.

Gelapparatur	HE99X <i>Max Submarine Unit</i> GEHealthcare 80-6061-57
6× DNA-Auftragspuffer	0,25% [w/v] Orange G Sigma O3756 40% [w/v] Saccharose 6× TAE-Puffer
DNA-Größenstandard	100bp DNA <i>Ladder</i> NEB N3231 1 kb DNA <i>Ladder</i> NEB N3232
Ethidiumbromid-Stammlösung	1 mg/ml
50× TAE-Puffer	2M Tris, 1 M HOAc, 50mM EDTA
10× TBE-Puffer	89mM Tris, 89mM Borsäure, 20mM EDTA

2.2.2 Southern Blot

Nach Durchführung der Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1) wurde das Gel für 30 min in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid geschwenkt, auf einem UV-Durchlichtschirm photographiert, zweimal für je 30 min in Denaturierungslösung und einmal für 15 min in Transferlösung

geschwenkt. Die Spuren mit DNA-Größenstandard (führt zu unspezifischer Adsorption der Sonde) sowie der obere und untere Rand des Gels wurden mitsamt den apparaturbedingten Agarosestegen entfernt. Die Membran wurde für 5 min auf die Oberfläche von entionisiertem Wasser aufgelegt, danach untergetaucht und für mindestens 15 min gewässert und schließlich für mindestens 5 min in Transferlösung äquilibriert. Der DNA-Transfer auf die Membran erfolgte über Nacht im abwärtsgerichteten Kapillarblot-Verfahren mit 200 ml Transferlösung im TurboBlotter-System. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren; die Enden des Transferpapiers (*wick*) wurden mit zwei 25 ml-Plastikpipetten im Pufferreservoir fixiert, der gesamte Blotstapel wurde mit einem kleinformatigen leichten Buch beschwert, um ein Abreißen des Flüssigkeitsstroms zu verhindern. Nach Ende des Transfers wurde die Membran für 5 min in 1× Neutralisationspuffer gelegt, dann auf ein trockenes Whatman-Papier überführt und in feuchtem Zustand auf mittlerer Höhe im Stratalinker mit 240 mJ/cm² bei 254 nm bestrahlt (2× *auto-crosslink*), um die DNA auf der Membran zu fixieren; danach wurde die Membran trocken gelagert. Zur Wiederbefeuchtung wurde die Membran für 5 min auf die Oberfläche eines 6× SSC-Puffers aufgelegt, danach für 2 min untergetaucht und schließlich zusammen mit einem Hybridisierungs-Netz eingerollt und in eine Hybridisierungsröhre überführt. Unter ständigem Drehen (Achtung Drehrichtung!) in einem Hybridisierungsofen wurde die Membran mit 20 ml Vorhybridisierungslösung für mindestens 4 h inkubiert. Nach Abgießen der Vorhybridisierungslösung wurde die Membran über Nacht mit der Hybridisierungslösung (20 ml vorgewärmte Vorhybridisierungslösung mit frisch zugegebener Sonde) im Hybridisierungsofen weiterinkubiert. Nach Abgießen der Hybridisierungslösung erfolgten vier Waschschrte mit vorgewärmten Lösungen (je 50 ml): zweimal mit 2× SSC / 0,1 % [w/v] SDS und zweimal mit 0,2× SSC / 0,1 % [w/v] SDS. Danach wurde die Membran aus der Hybridisierungsröhre entnommen, kurz in 0,1× SSC gewaschen, in eine Klarsichtfolie eingelegt und in eine Filmkassette geklebt. Mit einer Silberfolie als Feuchtigkeitsschutz wurde ein frisch gelöschter PhosphoImager-Screen aufgelegt und je nach erwarteter Signalstärke nach Stunden bis Wochen ausgelesen. Die Temperaturen für Vorhybridisierung, Hybridisierung und Waschschrte unterschieden sich je nach Sonde:

Tabelle 2.3 Verwendete Hybridisierungstemperaturen

Versuch	Sonde	Temperatur
MNase-Verdau (siehe 2.2.3)	BAC-generiert	65°C
Psoralen- Quervernetzungsanalysen (siehe 2.2.5)	MIE P	65°C
	MIE T	65°C
	18S-rDNA	62°C

Herstellung der Sonden:

Die radioaktive Markierung der jeweiligen DNA-Fragmente erfolgte mittels einer Klenow-Fragment-basierten Reaktion mit α - ^{32}P -markiertem dCTP und mit Zufalls-Nonameren als *Primern*.

Für die Analyse der MNase-Verdau-Experimente (siehe 2.2.3) wurde eine BAC-generierte Sonde eingesetzt: 5 μg eines HCMV-Towne-BACs (#167) wurden in einem 50 μl -Ansatz mit 1 \times NEB-Puffer 1 und 20U RsaI für 2h bei 37°C inkubiert, um zahlreiche Fragmente der viralen DNA zu erhalten, so dass die damit generierte Sonde zur Detektion jeglicher HCMV-DNA geeignet war. Der Verdauansatz wurde mit H₂O auf 100 μl aufgefüllt, zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform extrahiert, über Nacht gefällt, gewaschen, in 50 μl H₂O gelöst und bei -20°C gelagert (vgl. 2.2.4). Die verdaute BAC-DNA wurde mit TE-Puffer auf 2 ng/ μl verdünnt (100 μl Endvolumen), für 3 min bei 95°C denaturiert und danach für 2 min in Eiswasser gekühlt. Je Ansatz wurden 45 μl (\cong 90 ng) zu einem Reaktionsansatz des *All-in-One Random-Primed Labeling Mix* hinzugefügt, mit 5 μl ^{32}P -markiertem dCTP (\cong 50 μCi) versetzt, für 30 min bei 37°C inkubiert und zum Abstoppen der Reaktion mit 2 μl 200 mM EDTA (pH 8) versetzt. Die Trennung der Reaktionsprodukte von den nicht verbrauchten Nukleotiden erfolgte mit *mini Quick Spin DNA Columns* nach Herstellerangaben. Die Sonde wurde vor Beginn der Hybridisierung für 3 min bei 95°C denaturiert, danach für 2 min in Eiswasser gekühlt.

Zur Analyse der Psoralen-Quervernetzungs-Experimente (siehe 2.2.5) kamen Locus-spezifische Sonden zum Einsatz, die durch Markierung von PCR-Produkten erzeugt wurden: Beginnend mit genomischer DNA aus MRC-5-Zellen bzw. einem Towne-BAC als Matrize wurden Bereiche des zellulären 18S-rDNA-Locus sowie der Promotor- und Transkriptregion des viralen MIE-Locus durch PCR amplifiziert, das gewünschte Produkt aus einem Agarosegel extrahiert und erneut als Matrize in eine PCR eingesetzt, um die Ausbeute zu maximieren, und über ein präparatives Agarosegel gereinigt. Die Extraktion von DNA aus Agarosegel-Banden erfolgte mit einem Gel-Extraktions-Kit nach Herstellerangaben, abweichend wurde der empfohlene Waschschrift mit Puffer QG zweimal durchgeführt, um die Reinheit der Probe zu erhöhen. Die PCR wurde in 50 μl -Ansätzen (1 \times ThermoPol-Puffer, 200 μM dNTPs, beide *Primer* je 1 μM , 1 ng Matrizen-DNA, 2,5U Taq-Polymerase) nach folgendem Programm durchgeführt:

1×	30s	98°C
9×	10s	98°C
	30s	x°C, pro Zyklus um 1°C abnehmend
	30s	72°C
26×	10s	98°C
	30s	y°C
	60s	72°C
1×	7 min	72°C

Tabelle 2.4 Verwendete PCR-Bedingungen

Sonde	Primer*	PCR-Temperatur x	PCR-Temperatur y	Produktgröße
MIE P	427/431	60°C	50°C	1 213 bp
MIE T	429/430	58°C	47°C	1 335 bp
18S-rDNA	432/433			830 bp

* Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

Die PCR-Produkte wurden mit H₂O auf 1,1 ng/μl verdünnt und genau wie oben in die Markierungsreaktion eingesetzt und aufgereinigt (50 ng DNA eingesetzt).

Ethidiumbromid-Stammlösung	1 mg/ml
Geldokumentationssystem	<i>Gel Doc 2000 Gel Documentation System</i> Bio-Rad
Denaturierungslösung	3 M NaCl, 400 mM NaOH
Transferlösung	3 M NaCl, 8 mM NaOH
Membran	Nytran SuPerCharge (SPC) Whatman 10416287
TurboBlotter	15 cm x 20 cm Whatman 10416316
TurboBlotter-Nachfüllpack	15 cm x 20 cm Whatman 10416318
5× Neutralisationspuffer	1 M Natriumphosphat, pH 6,8
Stratalinker	UV <i>Crosslinker</i> 1800 Stratagene, λ = 254 nm
20× SSC-Puffer	3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, pH 7,0
Hybridisierungs-Netz	23 cm x 23 cm VWR 732-1901
Hybridisierungsröhren	25 cm x 3,5 cm VWR 732-1823
Vorhybridisierungslösung	6× SSC, 5 x Denhardts Reagenz, 0,5% [w/v] SDS 100 μg/ml denaturierte Fischsperma-DNA
50× Denhardts Reagenz	1% [w/v] Ficoll 400, 1% [w/v] Polyvinylpyrrolidon 1% [w/v] BSA
BSA	Albumin Fraktion V Applichem A1391
denaturierte Fischsperma-DNA	10 mg/ml Roche 11467140001
Silberfolie	<i>Screen Guard Protective Film</i> Bio-Rad 170-7483
PhosphoImager-Screen	Imaging Screen-K (Kodak) Bio-Rad 170-7843
PhosphoImager-Gerät	Molecular Imager FX Bio-Rad
10× NEB-Puffer 1	NEB B7001
RsaI	10 U/μl NEB R0167
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,1, 1 mM EDTA
<i>All-in-One Random-Primed Labeling Mix</i>	Sigma R7522
α- ³² P-markiertes dCTP	Perkin Elmer NEG013H250UC, (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)
<i>mini Quick Spin DNA Columns</i>	Roche 11814419001
Gel-Extraktions-Kit	QIAEX II <i>Gel Extraction Kit</i> Qiagen 20021
10× ThermoPol-Puffer	NEB B9004
dNTPs	je 10 mM NEB N0477
Taq-Polymerase	5 U/μl NEB M0267

2.2.3 Mikrokokken-Nuklease (MNase)-Verdau

Verdau gereinigter DNA:

Die genomische DNA wurde aus wachstumsarretierten MRC-5-Zellen in 3 *wells* eines 12-*wells* extrahiert: Die Zellen jedes *wells* wurden mit je 500 µl der Permeabilisierungspuffer 1 und 2 gewaschen, sodann in 150 µl 2× TNESK-Puffer lysiert, mit 150 µl Lyse-Verdünnungslösung versetzt und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für 15 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde jede Probe mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, für 10 min schnell überkopfgeschüttelt und zentrifugiert (2 min / 21°C / 16 100 × g). Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol sowie einmal mit Chloroform extrahiert – die Zentrifugation nach dem letzten Extraktionsschritt wurde in *Phase Lock Gel*-Gefäßen durchgeführt (5 min / 21°C / 16 100 × g). Die komplette wässrige Phase wurde abgenommen, mit 0,3 µl RNase versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur DNA-Fällung wurden 40 µl NaOAc-Lösung, 1 µl Glykogen und 1,1 ml EtOH zugegeben und die ausfallende DNA mit einem Glasstab (Pasteurpipette im Bunsenbrenner passend schmelzen) herausgefischt, in 70% [v/v] EtOH geschwenkt, kurz luftgetrocknet und in 20 µl TE-Puffer gelöst. Die restliche Probe wurde über Nacht bei -20°C inkubiert. Die verbliebene gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (30 min / 4°C / 16 100 × g) pelletiert, nach Abgießen des Überstandes mit 1 ml 70% [v/v] EtOH durch 30-sekündiges Vortexen gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min / 21°C / 16 100 × g). Der Überstand wurde mit einer Pipette möglichst vollständig abgezogen, das Pellet luftgetrocknet, danach in 20 µl TE-Puffer gelöst und mit der zuvor gewonnenen DNA vereinigt.

Die HCMV-DNA wurde aus 20 ml Virus-*stock* isoliert: Je 10 ml wurden in einem Ultrazentrifugationsröhrchen auf 500 µl 30% [w/v] Saccharose aufgetragen und im Rotor SW40 Ti zentrifugiert (1 h / 4°C / 97 960 × g). Die pelletierten Virionen wurden in je 200 µl DMEM resuspendiert und mit dem *NucleoSpin Blood-Kit* aufgearbeitet: Beide 200 µl-Proben wurden mit 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer B3 versetzt, gevortext, für 10 min bei 70°C inkubiert, erneut gevortext, für 10 min bei 70°C inkubiert, mit 210 µl EtOH versetzt, gevortext und auf ein Säulchen geladen. Nach Zentrifugation (1 min / 21°C / 11 000 × g) wurde jedes Säulchen mit 500 µl Puffer BW und 600 µl Puffer B5 gewaschen und erneut zentrifugiert. Jede Probe wurde in drei Schritten mit je 25 µl 21°C-warmem Puffer BE eluiert: 5 min Inkubation, danach Zentrifugation; sämtliche Eluate wurden vereinigt.

Für den MNase-Verdau wurden mehrere Ansätze mit je 2 µg genomischer DNA bzw. 1,8 µg HCMV-DNA mit Kernpuffer C auf 300 µl aufgefüllt, mit je 1,8 µl 500 mM CaCl₂ und der

entsprechenden Menge an MNase-Verdünnung versetzt, gemischt, für exakt 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, zum Abstoppen des Verdaus zu je 50 µl 68°C-warmem 250 mM EGTA gegeben und für 10 min bei 68°C inkubiert. Nach einmaliger Chloroform-Extraktion wurde die DNA über Nacht gefällt (siehe oben), nach dem Waschen mit 70% [v/v] EtOH in je 10 µl TE-Puffer gelöst und für 1 h bei 60°C inkubiert. Sowohl mit genomischer als auch mit HCMV-DNA wurden Ansätze mit 0,2 U, 0,5 U, 1 U, 2 U, 5 U, 10 U und 20 U MNase erstellt, mit HCMV-DNA zusätzlich einer mit 50 U. Die Analyse der Proben erfolgte über Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1).

Verdau intrazellulärer DNA:

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen in 12-wells bzw. 6-wells (Volumenangaben in Klammern) wurden zu den gewünschten Zeitpunkten nach Infektion mit 500 µl (1 ml) Permeabilisierungspuffer 1 gewaschen, mit 150 µl (360 µl) 37°C-warmer Lysolecithin-Lösung für 2 min im Zellkulturbrutschrank inkubiert, um die Membranen durchgängig zu machen, und erneut mit 500 µl (1 ml) Permeabilisierungspuffer 1 gewaschen. Der MNase-Verdau erfolgte mit 0 U bis 96 U MNase pro well (im 6-well jeweils die 2,4-fache MNase-Menge) in je 150 µl (360 µl) Permeabilisierungspuffer 2 für 0 min bis 30 min bei Raumtemperatur oder 37°C. Nach Absaugen der Lösung wurden die Zellen mit 150 µl (360 µl) 2× TNESEK-Puffer lysiert, die Probe mit 150 µl (360 µl) Lyse-Verdünnungslösung versetzt und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für 15 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde jede Probe mit TE-Puffer auf 400 µl aufgefüllt, mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, für 10 min schnell überkopfgeschüttelt und zentrifugiert (2 min / 21°C / 16 100 × g). Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol sowie einmal mit Chloroform extrahiert – die Zentrifugation nach dem letzten Extraktionsschritt wurde in *Phase Lock Gel*-Gefäßen durchgeführt (5 min / 21°C / 16 100 × g). Genau 250 µl (600 µl) der wässrigen Phase wurden abgenommen, mit 0,3 µl RNase versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur DNA-Fällung wurden 25 µl (60 µl) NaOAc-Lösung, 1 µl Glykogen und 690 µl (1,65 ml) EtOH zugegeben und die ausfallende DNA mit einem Glasstab (Pasteurpipette im Bunsenbrenner passend schmelzen) herausgefischt, in 70% [v/v] EtOH geschwenkt, kurz luftgetrocknet und in 12,5 µl (30 µl) TE-Puffer gelöst. Die restliche Probe wurde über Nacht bei -20°C inkubiert. Die verbliebene gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (30 min / 4°C / 16 100 × g) pelletiert, nach Abgießen des Überstandes mit 1 ml 70% [v/v] EtOH durch 30-sekündiges Vortexen gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min / 21°C / 16 100 × g). Der Überstand wurde mit einer Pipette möglichst vollständig abgezogen,

das Pellet luftgetrocknet, danach in 12,5 µl (30 µl) TE-Puffer gelöst und mit der zuvor gewonnenen DNA vereinigt. Je 13 µl der Proben wurden durch Agarosegelelektrophorese und Southern Blot analysiert (siehe 2.2.1 und 2.2.2).

Permeabilisierungspuffer 1	35 mM HEPES pH 7,4, 150 mM Saccharose, 80 mM KCl, 5 mM K ₂ HPO ₄ , 5 mM MgCl ₂ , 0,5 mM CaCl ₂
Permeabilisierungspuffer 2	50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM Saccharose 50 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂
2× TNESK-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,4, 200 mM NaCl 2 mM EDTA, 2% [w/v] SDS frisch zugeben: 0,2 mg/ml Proteinase K Roche 3115887
Lyse-Verdünnungslösung	150 mM NaCl, 5 mM EDTA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Phenol (äquilibriert, stabilisiert):Chloroform: Isoamylalkohol 25:24:1 AppliChem A0889
Chloroform	Sigma C2432
Phase Lock Gel-Gefäße	Phase Lock Gel Tubes Heavy 1,5 ml/2 ml VWR 713-2534/713-2536
RNase	Roche 11119915001
NaOAc-Lösung	3 M NaOAc pH 5,2 Sigma S7899
Glykogen	20 mg/ml Roche 10901393001
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,1, 1 mM EDTA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium GIBCO/Invitrogen 41966-029
NucleoSpin Blood-Kit	Macherey-Nagel 740951.50, enthält u.a. Proteinase K und die Puffer B3, BW, B5 und BE
Kernpuffer C	15 mM HEPES pH 7,5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl 10 mM NaHSO ₃ , 340 mM Saccharose frisch zusetzen: 150 µM β-Mercaptoethanol Sigma M3149 150 µM Spermin Sigma 85590 500 µM Spermidin Sigma S0266
MNase-Verdünnungspuffer	5 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 µM CaCl ₂
Lysolecithin-Lösung	0,1% [w/v] Lysolecithin Sigma L4129

2.2.4 Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE)

Das verwendete Protokoll basiert auf der Methode von Giresi *et al.* (2007). Pro Ansatz wurden vier 15 cm-Schalen wachstumsarretierte MRC-5-Zellen analog behandelt und zum gewünschten Zeitpunkt nach Infektion geerntet. Dazu wurden zwei Schalen ad 330 mM mit Formaldehyd versetzt und für exakt 10 min im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 1 M Glycin ad 125 mM und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt, die Schalen auf Eis platziert und der Zellrasen zweimal mit je 20 ml eiskaltem DMEM gewaschen. Danach wurden die Zellen mittels eines Zellschabers in 3 ml eiskaltem DMEM je Schale abgekratzt und jede Schale zweimal mit 2 ml eiskaltem DMEM nachgespült. Die Zellen aus beiden Schalen wurden in einem 15 ml-Reaktionsgefäß vereinigt und durch Zentrifugation (10 min / 4°C / 2000 × g) pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes und erneuter Zentrifugation (1 min / 4°C / 2000 × g) wurde der restliche Überstand mit einer

Pipette abgenommen, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die beiden anderen Schalen des Ansatzes wurden ohne Formaldehyd-Quervernetzung analog geerntet. Nach 20-minütigem Auftauen in Eiswasser wurde jedes Pellet in 1 ml CHIP-SDS-Lysepuffer (Raumtemperatur) mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und 30-mal vorsichtig auf- und abpipettiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis erfolgte die Ultraschall-Behandlung mit der Mikrospritze eines Branson-Sonifiers 450: Energieeinstellung 2,5, 7 15s-Pulse in einem 2 ml-Reaktionsgefäß, dazwischen Kühlung in Eiswasser. Danach wurde durch Zentrifugation (10 min / 4°C / $16\,100 \times g$) unlösliches Material abgetrennt. Der Überstand wurde – unterbrochen von 2-minütigen Zentrifugationen zur Festigung des Pellets – portionsweise abgenommen, vereinigt und auf fünf 200 μl -Aliquots verteilt, die entweder bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet wurden. Pro Ansatz wurde je ein Aliquot mit und eines ohne Formaldehyd-Quervernetzung mit je 200 μl TE-Puffer verdünnt und danach mit je 400 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, für 30 s auf höchster Stufe gevortext, in *Phase Lock Gel*-Gefäße überführt und zentrifugiert (5 min / 21°C / $16\,100 \times g$). Die wässrige Phase wurde in das Reaktionsgefäß zurückgegeben und ein weiteres Mal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol sowie einmal mit Chloroform extrahiert. Je 300 μl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 30 μl NaOAc-Lösung, 1 μl Glykogen und 830 μl EtOH versetzt und zur DNA-Fällung über Nacht bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (30 min / 4°C / $16\,100 \times g$) pelletiert, nach Abgießen des Überstandes mit 1 ml 70% [v/v] EtOH durch 30-sekündiges Vortexen gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min / 21°C / $16\,100 \times g$). Der Überstand wurde mit einer Pipette möglichst vollständig abgezogen, das Pellet bei 37°C im Heizblock getrocknet, danach in 40 μl Wasser gelöst und für 20 min bei 40°C im Heizblock inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels quantitativer *real time*-PCR durch Berechnung des Quotienten der DNA-Mengen ohne und mit Formaldehyd-Quervernetzung (siehe 2.2.6).

12,3M (37% [w/w]) Formaldehyd	Sigma F8775
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> GIBCO/Invitrogen 41966-029
Zellschaber	Fisher Scientific 3468136
CHIP-SDS-Lysepuffer	50mM Tris/HCl pH 8,1, 10mM EDTA, 1% [w/v] SDS
Proteaseinhibitoren	Protease Inhibitor Cocktail Set III Calbiochem 539134
TE-Puffer	10mM Tris/HCl pH 8,1, 1 mM EDTA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Phenol (äquilibriert, stabilisiert):Chloroform: Isoamylalkohol 25:24:1 AppliChem A0889
<i>Phase Lock Gel</i> -Gefäße	<i>Phase Lock Gel Tubes Heavy</i> 1,5 ml/2 ml VWR 713-2534/ 713-2536
Chloroform	Sigma C2432
NaOAc-Lösung	3 M NaOAc pH 5,2 Sigma S7899
Glykogen	20mg/ml Roche 10901393001

2.2.5 Psoralen-Quervernetzungsanalyse

Pro Ansatz wurden zwei 10 cm-Schalen mit wachstumsarretierten MRC-5-Zellen zum gewünschten Zeitpunkt nach Infektion ad 330 mM mit Formaldehyd versetzt und für exakt 10 min im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 1 M Glycin ad 125 mM und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt, die Schalen auf Eis platziert und der Zellrasen zweimal mit je 10 ml eiskaltem DMEM gewaschen. Die Schalen wurden mit je 4,5 ml DMEM versehen, mit 1/20 Volumen Psoralen-Lösung bzw. EtOH versetzt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Schalen auf eisgekühlten Aluminiumplatten in minimalem Abstand zu UV-Lampen der Wellenlänge 360 nm für 5 min bestrahlt. Die Zugabe von Psoralen-Lösung bzw. EtOH und die Bestrahlung wurden (ohne 5-minütige Inkubation) noch dreimal wiederholt. Das benutzte Bestrahlungsgerät war eine Eigenkonstruktion des Lehrstuhls für Biochemie III, analoge Ergebnisse konnten mittlerweile mit einem umgebauten Stratalinker erzielt werden ($\lambda = 365 \text{ nm}$, pro Bestrahlungseinheit $1,1008 \text{ J/cm}^2$). Jede Schale wurde erneut mit 10 ml eiskaltem DMEM gewaschen, die Zellen mittels eines Zellschabers in 5 ml eiskaltem DMEM abgekratzt und jede Schale zweimal mit 5 ml eiskaltem DMEM nachgespült. Die Zellen wurden in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (10 min / 4°C / $2000 \times g$) pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes und erneuter Zentrifugation (1 min / 4°C / $2000 \times g$) wurde der restliche Überstand mit einer Pipette abgenommen, das Pellet in $180 \mu\text{l}$ Puffer T1 resuspendiert und über Nacht bei 65°C inkubiert, um die Formaldehyd-Quervernetzung rückgängig zu machen. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem *NucleoSpin Tissue-Kit*: Jede Probe wurde mit $25 \mu\text{l}$ Proteinase K versetzt und für 3 h bei 56°C und 700 rpm inkubiert. Nach Zugabe von $200 \mu\text{l}$ Puffer B3 wurden die Proben für 15 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert, mit $210 \mu\text{l}$ EtOH versetzt und auf ein Säulchen geladen. Nach Zentrifugation (1 min / 21°C / $11000 \times g$) wurde jedes Säulchen mit $500 \mu\text{l}$ Puffer BW und $600 \mu\text{l}$ Puffer B5 gewaschen und erneut zentrifugiert. Jede Probe wurde zweimal mit denselben $75 \mu\text{l}$ 70°C -warmem Puffer BE eluiert: 5 min Inkubation, danach Zentrifugation.

Analog wurden je zwei *wells* eines 24-*wells* mit $25 \mu\text{g}$ gereinigter DNA (mittels *NucleoSpin Tissue-Kit* isoliert) aus nicht infizierten bzw. für 8 h und 48 h infizierten ($\text{MOI} = 5 \text{ PFU/Zelle}$) MRC-5-Zellen befüllt (Gesamtvolumen je $200 \mu\text{l}$, mit DMEM aufgefüllt) und analog zu den Zellen mit Psoralen-Lösung bzw. EtOH versetzt und bestrahlt. Danach wurden die sechs DNA-Proben mit je $200 \mu\text{l}$ Puffer B3 versetzt und wie oben beschrieben weiterbehandelt (Elution in doppeltem Puffervolumen). Die hohen Verluste an gereinigter DNA durch

Adsorption an das 24-*well* konnten mittlerweile durch vorheriges 24-stündiges Absättigen der *well*-Oberfläche mit Fischsperma-DNA minimiert werden.

Um die Psoralen-bedingten Veränderungen im Laufverhalten der DNA untersuchen zu können, wurden aus den Psoralen- bzw. EtOH-behandelten DNA-Proben mittels Restriktionsverdau definierte Genombereiche ausgeschnitten. Dazu wurden je 5 µg (Analyse der viralen Loci) bzw. 20 µg (Analyse des 18S-rDNA-Locus) DNA in PstI/SacII- (MIE P, nachzuweisendes Fragment: 1213 bp), PstI- (MIE T, 1486 bp) bzw. PstI/EcoRI-Verdaue (18S-rDNA, 976 bp) eingesetzt: Jeder 100 µl-Verdauansatz enthielt neben der DNA insgesamt 10 µl Restriktionsenzym(e), 1× BSA und 1× NEB-Puffer (Puffer 2 für MIE P, Puffer 3 für MIE T, Puffer EcoRI für 18S-rDNA). Nach 2,5-stündiger Inkubation bei 37°C wurden zu jedem Ansatz erneut 100 µl (Wasser, Puffer, BSA, Enzyme) gegeben und die Proben erneut für 2,5 h bei 37°C inkubiert. Nach Ende des Verdau wurden die Proben je einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform extrahiert, gefällt (vgl. 2.2.4), in 25 µl H₂O gelöst und komplett in die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Um die größere Menge an viraler DNA 48 h nach Infektion auszugleichen, wurde von diesen Proben nur 1/30 eingesetzt. Agarosegelelektrophorese und Southern Blot wurden wie unter 2.2.1 und 2.2.2 durchgeführt, jedoch ohne Ethidiumbromid-Färbung des Gels. Als zusätzlicher Schritt wurde das Agarosegel nach Ende der Elektrophorese in einem Stratalinker auf mittlerer Höhe von jeder Seite für zweimal 1 min mit 254 nm bestrahlt, um die Psoralen-Quervernetzung wieder aufzulösen, die sonst die DNA-Strangtrennung verhindern würde.

12,3M (37% [w/w]) Formaldehyd	Sigma F8775
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
	GIBCO/Invitrogen 41966-029
Psoralen-Lösung	4,5',8-Trimethylpsoralen, 200 µg/ml in EtOH
	Sigma T6137
(Stratalinker	UV <i>Crosslinker</i> 2400 Stratagene, λ = 365 nm)
Zellschaber	Fisher Scientific 3468136
<i>NucleoSpin Tissue-Kit</i>	Macherey-Nagel 740952.250, enthält u.a. Proteinase K und die Puffer T1, B3, BW, B5 und BE
Fischsperma-DNA	10 mg/ml Invitrogen 15632-011
PstI	20 U/µl NEB R0140
SacII	20 U/µl NEB R0157
EcoRI	20 U/µl NEB R0101
100× BSA	NEB B9001
10× NEB-Puffer 2	NEB B7002
10× NEB-Puffer 3	NEB B7003
10× NEB-Puffer EcoRI	NEB B0101
Stratalinker	UV <i>Crosslinker</i> 1800 Stratagene, λ = 254 nm

2.2.6 Quantitative *real time*-PCR

Die Analyse verschiedener DNA-Proben erfolgte mittels quantitativer *real time*-PCR. Die Messung basiert auf der Anlagerung des Farbstoffes *SYBR Green I* an die kleine Grube doppelsträngiger DNA, was mit einer deutlichen Steigerung der Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Emission}} = 530\text{nm}$) im Vergleich zu freiem oder an einzelsträngige DNA gebundenem *SYBR Green I* einhergeht. So kann mittels Fluoreszenzmessung während der PCR die Zunahme des Produktes ermittelt werden. Die Identität des Produktes wird durch Überprüfung der Schmelztemperatur kontrolliert. Die PCR-Zyklus-Anzahl zu Beginn der exponentiellen Amplifikationsphase wird *crossing point value* oder cp-Wert genannt. E bezeichnet die PCR-Effizienz und damit den Amplifikationsfaktor für jeden Zyklus. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation gilt:

$$(1) \quad N_n = N_0 \cdot E^n$$

mit N_n = Menge an Amplikon im Zyklus n und N_0 = Menge an Amplikon im Zyklus 0

Damit gilt für den Zyklus cp als Spezialfall von (1):

$$(2) \quad N_0 = N_{cp} \cdot E^{-cp}$$

D. h. die Menge an Amplikon in der Probe ist proportional zu E^{-cp} . Für Proben, die auf das gleiche Amplikon hin untersucht werden, gilt zudem, dass ihre jeweiligen N_{cp} -Werte allesamt identisch sind, weshalb sie z. B. in (3) und (4) gekürzt werden können.

Für die Analyse der FAIRE-Ergebnisse (siehe 2.2.4) wurde der Quotient der Amplikon-Mengen ohne und mit Formaldehyd-Quervernetzung (-F/+F) gebildet:

$$(3) \quad \frac{-F}{+F} = \frac{N_{0(-F)}}{N_{0(+F)}} = \frac{E_{(-F)}^{-cp}}{E_{(+F)}^{-cp}} = E^{(cp_{(+F)} - cp_{(-F)})}$$

Für die Analyse der ChIP-Ergebnisse (siehe 2.3.3) wurde eine Normierung der *output*-Amplikon-Mengen auf die *input*-Amplikon-Mengen (mit *input ratio* bezeichnet) vorgenommen, um Schwankungen in der DNA-Menge – etwa durch Zunahme der viralen DNA im Verlauf der Infektion – auszugleichen:

$$(4) \quad \text{input ratio} = \frac{N_{0(output)}}{N_{0(input)}} = \frac{E_{(output)}^{-cp}}{E_{(input)}^{-cp}} = E^{(cp_{input} - cp_{output})}$$

Eventuelle Probenverdünnungen für die PCR sowie die unterschiedlichen Mengen von *output*- und *input*-Proben (entspricht einem theoretischen Verdünnungsfaktor von 33,77) müssen selbstverständlich vor Einsetzen der cp-Werte in (3) und (4) durch Anpassen der cp-Werte berücksichtigt werden. Für einen Verdünnungsfaktor von x folgt aus (2):

$$(5) \quad cp_{\text{angepasst}} = cp_{\text{gemessen}} - \frac{\lg(x)}{\lg(E)}$$

E wurde für jedes *Primer*-Paar durch serielle 1:y-Verdünnungen (meist $y = 10$) einer beliebigen *input*-Probe und die Auftragung der zugehörigen *cp*-Werte gegen den \log_y der enthaltenen DNA-Mengen bestimmt. Die Steigung a der Ausgleichsgeraden liefert dann aus (1) und der Geradengleichung:

$$(6) \quad E = 10^{\frac{\lg(x)}{|a|}} \text{ bzw. als Spezialfall für } y = 10: E = 10^{\frac{1}{|a|}}$$

E gilt mit ausreichender Genauigkeit nur in dem *cp*-Bereich, in dem die Messpunkte der Verdünnungsreihe auf der Ausgleichsgeraden liegen.

Die quantitative *real time*-PCR wurde mittels des *LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I-Kits* und des *LightCycler*-Geräts nach Herstellerangaben mit folgendem Programm durchgeführt, wobei jede Kapillare 12 μl H_2O , 4 μl *Kit-Mastermix*, je 1 μl der beiden *Primer* (10 μM) und 2 μl DNA-Probe enthielt:

1×	10min	95°C
44×	10s	95°C
	10s	x°C
	ys	72°C
1×	Schmelzkurve von 65°C bis 95°C	

Tabelle 2.5 *real time*-PCR-Bedingungen

Amplikon	<i>Primer</i> [*]	x	y	Amplikon-Länge	E	<i>cp</i> -Bereich
GAPDH T	304/305	td	8 s	71 bp	1,97	24 - 34
GAPDH T (1.Exon)	492/493	td	8 s	69 bp	2,06	25 - 32
TUBB T	363/364	td	8 s	102 bp	1,92	21 - 28
RPL30 T	494/495	td	8 s	73 bp	1,95	24 - 34
MyoD T	496/497	td	8 s	75 bp	1,95	26 - 30
HBG P	409/410	68°C	10 s	187 bp	1,85	23 - 34
Sat2	498/499	td	10 s	160 bp	1,82	13 - 32
MIE P	84/85	58°C	15 s	284 bp	1,87	16 - 30
MIE T	292/293	58°C	8 s	112 bp	1,88	18 - 30
UL54 P	294/295	58°C	8 s	71 bp	1,94	15 - 29
UL54 T	296/297	58°C	8 s	113 bp	1,96	13 - 27
UL32 P	298/299	58°C	8 s	150 bp	1,88	15 - 31
UL32 T	300/301	td	8 s	106 bp	1,77	18 - 30
oriLyt	288/289	58°C	10 s	171 bp	1,86	19 - 31

* Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe,
td: touchdown, Temperatur sinkt von 66°C auf 56°C (0,5°C pro Zyklus)

LightCycler SYBR Green I-Kit Roche 03515885001
LightCycler-Kapillaren (20 μl) Roche 04929292001
LightCycler-Gerät Roche *LightCycler 1.5 Instrument*

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Pro Ansatz wurde eine 10 cm-Schale mit wachstumsarretierten MRC-5-Zellen zum gewünschten Zeitpunkt nach Infektion zweimal mit je 10 ml DMEM gewaschen und mittels eines Zellschabers in 2 ml eiskaltem DMEM je Schale abgekratzt und jede Schale zweimal mit 2 ml eiskaltem DMEM nachgespült. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min / 4°C / 500 × g) pelletiert, nach Abgießen des Überstandes und erneuter Zentrifugation (1 min / 4°C / 500 × g) wurde der restliche Überstand mit einer Pipette abgenommen, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde jedes Pellet in 100 µl MIPA-Puffer mit Enzym-Inhibitoren resuspendiert und die DNA durch Beschallung im Bioruptor (30 s an / 30 s aus, hohe Energieeinstellung, 3 × 5 Pulse im Eiswasserbad) fragmentiert. Jede Probe wurde mit 100 µl 2× Protein-Ladepuffer versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und zentrifugiert (10 min / 21°C / 16 100 × g). Die Überstände wurden durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert (siehe 2.3.2).

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> GIBCO/Invitrogen 41966-029
Zellschaber	Fisher Scientific 3468136
MIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM NaCl 0,1 % [w/v] SDS, 1 % [v/v] Igepal CA-630 0,5 % [w/v] Natriumdeoxycholat
MIPA-Puffer mit Enzym-Inhibitoren	zu MIPA-Puffer frisch zugeben (je 1:100): Protease-Inhibitor Cocktail Set III Calbiochem 539134 Phosphatase-Inhibitor Cocktail 1 Sigma P2850 Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2 Sigma P5726 1 M Natriumbutyrat upstate 19-137 N-Ethylmaleimid Sigma E1271 (500 µg/ml, frisch in EtOH lösen)
Bioruptor	Diagenode
2× Protein-Ladepuffer	60 mM Tris/HCl pH 6,8 2 % [w/v] SDS 10 % [v/v] Glycerin 0,001 % [w/v] Bromphenolblau frisch zusetzen: 200 mM β-Mercaptoethanol Sigma M3149

2.3.2 SDS-PAGE und Western Blot

Zur Auftrennung von Gesamtzellextrakten (siehe 2.3.1) wurde eine SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) mit 12%-igem Trenngel (40 % [v/v] Acrylamid-Lösung, 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % [w/v] SDS, 0,1 % [w/v] Ammoniumperoxodisulfat, 2,64 mM TEMED) und 5%-igem Sammelgel (17 % [v/v] Acrylamid-Lösung, 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % [w/v] SDS, 0,1 % [w/v] Ammoniumperoxodisulfat, 6,6 mM

TEMED) durchgeführt. Von jeder Probe wurden zwischen 6 µl und 10 µl geladen, 10 µl eines Protein-Größenstandards wurden mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 mA bis 25 mA in Tris-Glycin-Puffer, bis die Lauffront am unteren Gelrand angelangt war. Das Trenngel wurde ebenso wie die Nitrocellulosemembran für 5 min in Towbin-Puffer äquilibriert, bevor der Transfer im Submers-Blot-Verfahren nach Herstellerangaben durchgeführt wurde (1 h, 300 mA). Nach 2-minütiger Ponceau-Färbung wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5% [w/v] Milchpulver in PBS blockiert, mit PBS/Tween gewaschen, über Nacht bei 4°C mit einer Verdünnung des Primärantikörpers in PBS inkubiert, dreimal für 10 min mit PBS/Tween gewaschen, für 1 h bei Raumtemperatur mit einer Verdünnung des Sekundärantikörpers in 3% [w/v] Milchpulver in PBS inkubiert, dreimal für 10 min mit PBS/Tween und einmal kurz mit PBS gewaschen und nach Herstellerangaben mit einem Chemilumineszenzsubstrat entwickelt. Die Detektion des Signals erfolgte durch Auflegen und Entwickeln eines Röntgenfilms.

Gelapparatur	Mini-PROTEAN 3 Cell Bio-Rad 165-3301
Acrylamid-Lösung	30% [w/v] Acrylamid-/Bisacrylamidlösung, Mix 37,5:1
Protein-Größenstandard	<i>Prestained Protein Marker, Broad Range</i> (7kDa bis 175kDa) NEB P7708
10× Tris-Glycin-Puffer	250 mM Tris, 2,5 M Glycin, 1% [w/v] SDS
Blot-Apparatur	Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad 170-3930
Towbin-Puffer	24 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% [v/v] MeOH
Ponceau-Lösung	0,1% [w/v] Ponceau S in 5% [v/v] HOAc
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
PBS/Tween	PBS mit 0,1% [v/v] Tween 20
Chemilumineszenzsubstrat	SuperSignal West Pico Pierce 34080
Röntgenfilm	CL-XPosure Film 18 x 24 cm Thermo Scientific 34089
Entwickler-Lösung	GBX <i>developer/replenisher</i> Sigma P7042
Fixierer-Lösung	GBX <i>fixer/replenisher</i> Sigma P7167

2.3.3 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Pro Ansatz (ausreichend für 5 Immunpräzipitationen) wurden zwei 15 cm-Schalen wachstums-arretierte MRC-5-Zellen zum gewünschten Zeitpunkt nach Infektion ad 330 mM mit Formaldehyd versetzt und für exakt 10 min im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 1 M Glycin ad 125 mM und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt, die Schalen auf Eis platziert und der Zellrasen zweimal mit je 20 ml eiskaltem DMEM gewaschen. Danach wurden die Zellen mittels eines Zellschabers in 3 ml eiskaltem DMEM je Schale abgekratzt und jede Schale zweimal mit 2 ml eiskaltem DMEM nachgespült. Die Zellen aus beiden Schalen wurden in einem 15 ml-Reaktionsgefäß vereinigt

und durch Zentrifugation (10 min / 4°C / 2000 × g) pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes und erneuter Zentrifugation (1 min / 4°C / 2000 × g) wurde der restliche Überstand mit einer Pipette abgenommen, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nach 20-minütigem Auftauen in Eiswasser wurde das Pellet in 1 ml ChIP-SDS-Lysepuffer (Raumtemperatur) mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und 30-mal vorsichtig auf- und abpipettiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis erfolgte die Ultraschall-Behandlung im Bioruptor: 30 s an / 30 s aus, hohe Energieeinstellung, 3 × 5 Pulse im Eiswasserbad (alternativ wurde zu Beginn der Arbeit die Mikrospritze eines Branson-Sonifier 450 benutzt: Energieeinstellung 2,5, 7 15 s-Pulse in einem 2 ml-Reaktionsgefäß, dazwischen Kühlung in Eiswasser). Nach Überführen der Probe in ein 2 ml-Reaktionsgefäß wurde durch Zentrifugation (10 min / 4°C / 16100 × g) unlösliches Material abgetrennt. Der Überstand wurde – unterbrochen von 2-minütigen Zentrifugationen zur Festigung des Pellets – portionsweise abgenommen, vereinigt und auf fünf 200 µl-Aliquots verteilt, die entweder bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet wurden. Ca. 20 µl des Überstandes wurden als *input*-Probe bei -20°C aufbewahrt. Für jeden Immunpräzipitations-Ansatz wurde ein 200 µl-Aliquot mit 1,8 ml eiskaltem ChIP-Verdünnungspuffer mit Proteaseinhibitoren versetzt und nach Zugabe von 75 µl Protein A-Agarose / *salmon sperm* DNA zur Entfernung von unspezifisch an die Protein A-Agarose bindendem Material für 30 min bei 4°C langsam überkopfgeschüttelt. Nach Zentrifugation (1 min / 4°C / 100 × g) und 3 min Absetzzeit wurden 1,9 ml des Überstandes in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit der entsprechenden Menge des gewünschten Antikörpers (siehe 2.1.1) über Nacht bei 4°C langsam überkopfgeschüttelt. Nach Zugabe von je 60 µl Protein A-Agarose / *salmon sperm* DNA wurden die Ansätze für eine weitere Stunde bei 4°C langsam überkopfgeschüttelt. Nach Zentrifugation (1 min / 4°C / 100 × g) und 3 min Absetzzeit wurde der Überstand mit einer feinen Kanüle abgezogen und das Pellet mit 1 ml Niedrigsalzpuffer gewaschen (60-mal umwenden zwischen zwei eiskalten Metall-Ständern). Die Waschprozedur wurde jeweils einmal mit Hochsalzpuffer und LiCl-Puffer sowie zweimal mit TE-Puffer wiederholt; am Ende wurde der Überstand komplett abgezogen, bis das Pellet trocken war. Die Elution des Immunkomplexes inklusive der gebundenen DNA erfolgte durch Zugabe von 250 µl 65°C-warmem Elutionspuffer, 15 min Inkubation im Wasserbad bei 65°C sowie 15 min etwas schnelleres Überkopfschütteln bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation (1 min / 21°C / 100 × g) und 3 min Absetzzeit wurden 200 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Elution mit 250 µl Elutionspuffer wiederholt – diesmal wurden 250 µl des

Überstandes abgenommen und mit dem ersten Eluat vereinigt ($\hat{=}$ *output*-Probe). Nach Zugabe von 16 μ l 5 M NaCl wurde das Eluat im Heizblock für 5 h auf 65°C erhitzt, um die Formaldehyd-Quervernetzung rückgängig zu machen. Nach Auftauen und Zentrifugation (10 min / 21°C / 16 100 \times g) wurden 5 μ l der *input*-Probe mit CHIP-Verdünnungspuffer auf 100 μ l aufgefüllt, mit 4 μ l 5 M NaCl versetzt und ebenfalls im Heizblock für 5 h auf 65°C erhitzt; die Lagerung der Proben nach diesem Schritt erfolgte bei -20°C. Nach erneutem Auftauen wurde jede Probe mit 9 μ l 500 mM EDTA, 18 μ l 1 M Tris/HCl (pH 6,5) und 2 μ l Proteinase K versetzt (bei *input*-Proben analog 2 μ l / 4 μ l / 2 μ l) und für eine Stunde bei 45°C im Heizblock inkubiert. Zur DNA-Extraktion wurden die Proben mit je 500 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (bei *input*-Proben 100 μ l) versetzt, für 30 s auf höchster Stufe gevortext, in *Phase Lock Gel*-Gefäße überführt und zentrifugiert (5 min / 21°C / 16 100 \times g). Die wässrige Phase wurde in das Reaktionsgefäß zurückgegeben und ein weiteres Mal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol sowie zweimal mit Chloroform extrahiert. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde auf 10 min ausgedehnt, um das Entfernen ausfallender Materialien aus der wässrigen Phase sicherzustellen. Je 400 μ l des Überstandes (bei *input*-Proben 90 μ l) wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 40 μ l NaOAc-Lösung, 1 μ l Glykogen und 1,1 ml EtOH versetzt (bei *input*-Proben analog 9 μ l / 1 μ l / 250 μ l) und zur DNA-Fällung über Nacht bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (30 min / 4°C / 16 100 \times g) pelletiert, nach Abgießen des Überstandes mit 1 ml 70% [v/v] EtOH durch 30-sekündiges Vortexen gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min / 21°C / 16 100 \times g). Der Überstand wurde mit einer Pipette möglichst vollständig abgezogen, das Pellet bei 37°C im Heizblock getrocknet und je nach Bedarf in 40 μ l bis 65 μ l Wasser gelöst und für 20 min bei 40°C im Heizblock inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels quantitativer *real time*-PCR durch Berechnung der *input ratio* (siehe 2.2.6) – nur Werte, die mindestens doppelt so hoch waren wie die mittels rIgG aus Kaninchen-Präimmunsrum (siehe 2.1.1) erhaltenen wurden ausgewertet.

12,3M (37% [w/w]) Formaldehyd	Sigma F8775
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> GIBCO/Invitrogen 41966-029
Zellschaber	Fisher Scientific 3468136
CHIP-SDS-Lysepuffer	50mM Tris/HCl pH 8,1, 10mM EDTA, 1% [w/v] SDS
Proteaseinhibitoren	Protease-Inhibitor Cocktail Set III Calbiochem 539134
Bioruptor	Diagenode
CHIP-Verdünnungspuffer	16,7mM Tris/HCl pH 8,1, 167mM NaCl, 1,2mM EDTA, 1,1% [v/v] Triton X-100, 0,01% [w/v] SDS
Protein A-Agarose / <i>salmon sperm</i> DNA	upstate 16-157
Niedrigsalzpuffer	20mM Tris/HCl pH 8,1, 150mM NaCl, 2mM EDTA 1% [v/v] Triton X-100, 0,1% [w/v] SDS

Hochsalzpuffer	20mM Tris/HCl pH 8,1, 500mM NaCl, 2mM EDTA 1% [v/v] Triton X-100, 0,1% [w/v] SDS
LiCl-Puffer	10mM Tris/HCl pH 8,1, 250mM LiCl, 1mM EDTA 1% [v/v] Igepal CA-630, 1% [w/v] Natriumdeoxycholat
TE-Puffer	10mM Tris/HCl pH 8,1, 1mM EDTA
Elutionspuffer	100mM NaHCO ₃ , 1% [w/v] SDS aus getrennten 10×-Vorratslösungen frisch ansetzen
Proteinase K	Roche 3115887
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Phenol (äquilibriert, stabilisiert):Chloroform: Isoamylalkohol 25:24:1 AppliChem A0889
<i>Phase Lock Gel</i> -Gefäße	<i>Phase Lock Gel Tubes Heavy</i> 1,5ml/2ml VWR 713-2534/ 713-2536
Chloroform	Sigma C2432
NaOAc-Lösung	3M NaOAc pH 5,2 Sigma S7899
Glykogen	20mg/ml Roche 10901393001

2.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

MRC-5-Zellen wurden im Verhältnis 1:3 auf sterilen Deckgläschen in 6-wells ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und für weitere drei Tage in serumfreiem Medium kultiviert, um den Eintritt in die G₀-Phase des Zellzyklus zu erreichen. Die Fixierung des Zellmaterials erfolgte zum gewünschten Zeitpunkt nach Infektion nach zwei verschiedenen Protokollen: Mischfixierung für den Nachweis von CAF-1 und PCNA, PFA-Fixierung für den Nachweis von ASF1a. Für beide Methoden wurde zunächst das Deckgläschen mit einer Pinzette aufgenommen, nacheinander in drei Bechergläser mit PBS/T getaucht und in einem mit PBS/T gefüllten 6-well abgelegt, dann für 15 min bei Raumtemperatur mit 2% [w/v] Paraformaldehyd in PBS inkubiert und dreimal für 5 min mit PBS/T gewaschen (ohne Schütteln). Für die Mischfixierung wurde die Probe dann für 10 min bei -20°C mit vorgekühltem MeOH inkubiert und zweimal kurz mit PBS/T gewaschen. Für die PFA-Fixierung wurde die Probe stattdessen für 15 min bei Raumtemperatur mit 0,1% [v/v] Triton X-100 in PBS inkubiert und dreimal für 5 min mit PBS/T gewaschen.

Für die Inkubation mit Blockierlösung bzw. Antikörpern wurden die Deckgläschen mit der Zelleite nach oben auf ein Stück Parafilm auf den Deckel eines 6-wells gelegt, mit einem Tropfen von 100 µl bzw. 75 µl benetzt und in eine geschlossene Dose mit feuchtem Whatman-Papier gestellt. Die Waschschrte erfolgten wieder im 6-well. Die Antikörperverdünnungen wurden vor Benutzung zentrifugiert (10 min / 21°C / 9300 × g), um Antikörper-Aggregate abzutrennen.

Zur Blockierung der Präparate kam PBS/T mit 2% [w/v] BSA und 0,02% [w/v] Human-IgG zum Einsatz, um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern. Nach 1 h Blockierung wurden die Präparate zweimal kurz mit PBS/T gewaschen und dann für 1 h mit einer Verdünnung des Primäantikörpergemisches in PBS/T mit 0,02% [w/v] Human-IgG

inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS/T für jeweils 5 min wurden die Präparate für 1 h mit einer Verdünnung des Sekundärantikörperrgemisches in PBS/T inkubiert, viermal für je 5 min mit PBS/T und einmal kurz mit PBS gewaschen und mit je 15 μ l *SlowFade Gold antifade reagent* mit 1,67 μ M DRAQ5 eingedeckt. Durch sanftes Überstreichen der unter einem Zellstofftuch liegenden Proben wurde überschüssiges Eindeckmedium entfernt, bevor der Rand des Deckgläschens mit Nagellack versiegelt wurde. Tabelle 2.6 liefert eine Übersicht der durchgeführten Immunfluoreszenz-Färbungen sortiert nach den angefärbten zellulären Proteinen.

Tabelle 2.6 Primärantikörperverdünnungen der Immunfluoreszenz-Färbungen

Präparat	nicht infiziert	8 h p.i.	24 h p.i.	72 h p.i.
CAF-1	α -CAF-1 1:500	α -CAF-1 1:500 α -IE2 1:20	α -CAF-1 1:2 000 α -UL44 1:5 000	α -CAF-1 1:2 000 α -UL44 1:10 000
PCNA	α -PCNA 1:2 000	α -PCNA 1:2 000 α -IE2 1:20	α -PCNA 1:2 000 α -UL44 1:5 000	α -PCNA 1:2 000 α -UL44 1:10 000
ASF1a	α -ASF1a 1:500	α -ASF1a 1:500 α -IE2 1:20	α -ASF1a 1:500 α -UL44 1:5 000	α -ASF1a 1:500 α -UL44 1:10 000

serumfreies Medium	siehe 2.4.1 (ohne fötales Kälberserum)
PBS	siehe 2.3.2
PBS/T	PBS mit 0,05% [v/v] Tween 20
BSA	Albumin Fraktion V AppliChem A1391
Human-IgG	Sigma I2511
<i>SlowFade Gold antifade reagent</i>	Invitrogen S36936
DRAQ5	Axxora BOS-889-001, 1:30 in DMSO vorverdünnen

2.4 Zellkulturverfahren

2.4.1 Kultivierung humaner Zellen

Die Kultivierung der MRC-5-Zellen erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, enthält 4,5 mg/ml Glucose, 4 mM L-Glutamin und 110 mg/l Na-Pyruvat) mit 10% [v/v] fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin. Fötales Kälberserum wurde von den Firmen PAN Biotech, Lonza Bio Whittaker und Gibco/Invitrogen bezogen, vor einem Wechsel wurden jeweils Seren verschiedener Anbieter auf bestmögliche Unterstützung des Zellwachstums getestet. Zur Kultivierung der Zellen wurde ein befeuchteter Heraeus Zellkulturinkubator mit 37°C Innentemperatur und 5% CO₂-Gehalt benutzt.

Zur Expansion wurden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz unter Verwendung einer Trypsin/EDTA-Lösung im Verhältnis 1:3 subkultiviert. Da MRC-5-Zellen nicht

immortalisiert sind, wurden sie insgesamt nur ca. 30 Verdopplungszyklen unterworfen, um experimentelle Schwankungen durch beginnende Seneszenz zu vermeiden.

Um Wachstumsarretierung zu erreichen, erhielten die Zellen drei Tage nach Aussaat frisches Kulturmedium, in dem sie für weitere sieben Tage verblieben und so durch Kontaktinhibition und Verbrauch der Wachstumsfaktoren des Kälberserums in die G₀-Phase des Zellzyklus eintraten. Dabei erreichten die Zellen typischerweise Dichten von $1,5 \times 10^7$ bis 2×10^7 pro 15 cm-Schale. Standard-Kulturvolumina waren 25 ml für 15 cm-Schalen, 10 ml für 10 cm-Schalen, 2 ml im 6-well, 1 ml im 12-well und 100 µl im 96-well.

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> GIBCO/Invitrogen 41966-029
Penicillin/Streptomycin	10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin PAN Biotech P06-07100
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ PAN Biotech P10-023500
15 cm-Schalen	Falcon 35 3025
10 cm-Schalen	Falcon 35 3003
6-well	Falcon 35 3046
12-well	Falcon 35 3043
96-well	Falcon 35 3072

2.4.2 Herstellung von Virus-stocks

Zur Herstellung eines Virus-stocks wurden mindestens 20 15 cm-Schalen MRC-5-Zellen nach Erreichen der Konfluenz mit frischem Kulturmedium versehen und durch Zugabe eines bestehenden Virus-stocks mit einer MOI von 0,01 PFU/Zelle infiziert. Für diese Infektion wurde nach Möglichkeit auf den ältesten im Labor vorhandenen stock zurückgegriffen, um die Anhäufung von Mutationen durch sequenzielle Passage der stocks zu minimieren. Alle drei Tage erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums, bis alle Zellen einen deutlichen cytopathischen Effekt zeigten. Dann wurden die Zellen vorsichtig mit einem Kulturvolumen PBS gewaschen und erhielten daraufhin Kulturmedium ohne fötales Kälberserum. Nach ca. 60 h wurde der Kulturüberstand abgenommen, unter Eiskühlung vereinigt und zur Abtrennung enthaltener Zellen zentrifugiert (15 min / 4°C / 6000 × g). Der Überstand wurde in 10 ml- und 1 ml-Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert. Der Titer des stocks wurde mittels Plaque-Test bestimmt (siehe 2.4.4).

Kulturmedium	siehe 2.4.1
PBS	siehe 2.3.2

2.4.3 Infektion

Die benötigte Menge an Virus-stock wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, danach sofort auf Eis gestellt und zur Vereinzelung der Virionen im Becherresonator des Branson-Sonifier

450 beschallt: Energieeinstellung 8, 80% an / 20% aus, zweimal 10 Pulse, dazwischen Kühlung auf Eis. Die Verdünnung des *Virus-stocks* erfolgte in konditioniertem Medium, also dem Zellkulturüberstand von Zellen derselben Passage wie die Versuchs-Zellen, die analog zu diesen behandelt wurden. Nach 2-stündiger Infektion im Zellkulturbrutschrank wurde das Inokulum abgesaugt und durch 20ml konditioniertes Medium ersetzt, das bis zur Ernte der Zellen meist nicht mehr gewechselt wurde. Typische Infektionsvolumina waren 10 oder 15 ml für 15 cm-Schalen, 5 ml für 10 cm-Schalen, 1 ml im 6-*well*, 500 µl im 12-*well* und 50 µl im 96-*well*. Um sicherzustellen, dass Virionen, die nach Ablauf der Infektionszeit von 2 h noch nicht in die Zellen eingetreten waren, dies auch später nicht mehr taten, wurde bei den Versuchen mit einer MOI von 0,5 PFU/Zelle nach Absaugen des Inokulums ein Waschschrift mit Citrat-Puffer eingeschoben. Dazu wurden 15 ml Citrat-Puffer für genau 1 min auf den Zellen belassen, um extrazelluläre Virionen zu inaktivieren; danach erfolgte ein kurzer Waschschrift mit 15 ml DMEM, um den pH-Wert zu stabilisieren, bevor wie gewohnt konditioniertes Medium zugegeben wurde.

Citrat-Puffer	40 mM Natriumcitrat pH 3,0, 10 mM KCl 135 mM NaCl
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> GIBCO/Invitrogen 41966-029

2.4.4 Plaque-Test

Pro Ansatz – üblicherweise Doppelbestimmungen – war ein 12-*well* wachstumsarretierter MRC-5-Zellen nötig. Sollte der Titer eines *Virus-stocks* bestimmt werden, so wurde ein Aliquot des *stocks* bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, danach sofort auf Eis gestellt und zur Vereinzelung der Virionen im Becherresonator des Branson-Sonifier 450 beschallt: Energieeinstellung 8, 80% an / 20% aus, zweimal 10 Pulse, dazwischen Kühlung auf Eis. Das Aliquot wurde in zwei getrennten identischen Verdünnungsreihen mit konditioniertem Medium in 8 Stufen von 10^{-1} bis 10^{-8} verdünnt, je 500 µl der Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-8} wurden zur 2-stündigen Infektion eines 6-*well*s eingesetzt. Nach Absaugen des Inokulums wurde das Kulturmedium durch 2 ml 4°C-kalte Methocel-Lösung ersetzt, die beim Erwärmen erstarrt und so die Ausbreitung der Viren über das Medium unterbindet. Nach 10-tägiger Inkubation im Zellkulturbrutschrank wurde die Methocel-Lösung abgesaugt und jedes *well* dreimal mit je 2 ml PBS gewaschen und danach für 10 min mit 2 ml Färbelösung inkubiert. Nach Abgießen der Färbelösung wurde das 6-*well* vorsichtig unter laufendem Wasser gespült und getrocknet. Durch Auszählen der Plaques unter dem Mikroskop ließ sich der Titer des

stocks bestimmen. Wurden Überstände aus infizierten Kulturen titriert, so wurden die Verdünnungstufen 10^{-1} bis 10^{-6} bzw. 10^0 bis 10^{-5} eingesetzt.

Methocel-Lösung	1 % [w/v] Methocel Sigma M0262 1× DMEM (ohne NaHCO ₃) Sigma D7777 0,375 % [w/v] NaHCO ₃ Sigma S8761 1 % [v/v] fötales Kälberserum siehe 2.4.1 1 % [v/v] Penicillin/Streptomycin siehe 2.4.1 (zunächst Methocel in H ₂ O lösen, autoklavieren, bei 4°C rühren, restliche Komponenten steril zugeben)
PBS	siehe 2.3.2
Färbelösung	70 % [v/v] MeOH, 0,5 % [w/v] Methylenblau

2.4.5 Cytotoxizitätstest

Zur Untersuchung des toxischen Einflusses einiger der eingesetzten Enzym-Inhibitoren (siehe 2.4.6) auf MRC-5-Zellen kam der *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* zum Einsatz. Die Methode beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis eines Formazan-Produktes, das durch Reduktion aus der Tetrazolium-Komponente des Substrats entsteht. Als Reduktionsmittel dienen vermutlich NADH und NADPH, deren Konzentration in stoffwechselaktiven Zellen deutlich höher ist als in geschädigten Zellen.

Für den Test wurden wachstumsarretierte MRC-5-Zellen in 96-wells für 1 h mit je 50 µl konditioniertem Medium mit Inhibitoren (KMI) vorinkubiert, für 2 h mit je 50 µl KMI mit Virus (MOI = 0,5 PFU/Zelle) inkubiert und danach mit je 100 µl KMI versehen (KMI-Wechsel 24 h p.i.). Für die Messung 48 h p.i. wurden die Platten mit 100 µl konditioniertem Medium je well versehen und nach Zugabe von je 20 µl des *Kit*-Reagenz für etwa 30 min im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Platten mehrfach im ELISA-Reader bei 490 nm vermessen, der Datensatz mit den höchsten OD-Werten noch unterhalb von OD = 1 wurde zur Auswertung herangezogen. Es wurden jeweils in Quadruplikaten vier verschiedene Inhibitor-Konzentrationen auf infizierten und nicht infizierten Zellen untersucht.

<i>CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Prolif. Assay</i>	Promega G3580
konditioniertes Medium	siehe 2.4.3

2.4.6 Einsatz von Enzyminhibitoren

Als Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme kamen Anacardinsäure, Chaetocin, Curcumin und 5'-Deoxy-5'-(methylthio)adenosin (MTA) zum Einsatz. Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden für 1 h mit konditioniertem Medium mit Inhibitoren (KMI) vorinkubiert, für 2 h mit Virus in KMI infiziert und danach erneut mit KMI versehen (KMI-Wechsel 24 h p.i.).

Phosphonoessigsäure (PAA) und Ganciclovir wurden zur Unterdrückung der viralen DNA-Replikation benutzt. Die Substanzen wurden nach Ende der Infektion zum konditionierten Medium zugesetzt und nach 24 h zusammen mit diesem erneuert.

Aphidicolin hemmt zusätzlich die zellulären DNA-Polymerasen α , δ , und ϵ und wurde parallel mit PAA nach dem gleichen Anwendungsschema wie die Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme benutzt.

Tabelle 2.7 Konzentrationen der eingesetzten Inhibitoren

Substanz	Vorratslösung	eingesetzte Konzentration	Lösungsmittel
Anacardinsäure	28,7 mM	45 μ M	DMSO
Chaetocin	1,435 mM	15 nM	DMSO
Curcumin	15 mM	15 μ M	DMSO
MTA	120 mM	1,1 mM	DMSO
PAA	142,8 mM	1,4 mM	PBS
Ganciclovir	10 mM	100 μ M	100 mM HCl
Aphidicolin	2,954 mM	2 μ M	DMSO

Anacardinsäure	Calbiochem 172050
Chaetocin	Sigma C9492
Curcumin	Calbiochem 239802
MTA	Sigma D5011
konditioniertes Medium	siehe 2.4.3
PAA	Sigma 284270
Ganciclovir	Sigma G2536
Aphidicolin	Sigma A0781

3 Ergebnisse

3.1 Chromatinisierung des HCMV-Genoms während der lytischen Infektion

Wie in der Einleitung dargelegt, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit der Kenntnisstand über den Chromatinisierungsstatus des HCMV-Genoms während der lytischen Infektion und seinen möglichen Einfluss auf die Regulation des Infektionsverlaufs äußerst lückenhaft. Daher wurde mittels eines breiten Methodenspektrums (ChIP, MNase-Verdau, Psoralen-Quervernetzungsanalyse, FAIRE und Immunfluoreszenzfärbung) der Frage nachgegangen, ob HCMV-Genome im lytischen Infektionszyklus in nukleosomaler Struktur vorliegen (siehe 3.1.1, 3.1.2), inwiefern sich die Chromatinisierung vom zellulären Genom unterscheidet (siehe 3.1.1 bis 3.1.4) und ob Besetzungsunterschiede zwischen verschiedenen viralen Genombereichen und verschiedenen Infektionsstadien bestehen (siehe 3.1.2 bis 3.1.4). Desweiteren wurden Hinweise auf die Chromatinisierungsmechanismen des HCMV-Genoms erbracht: die Abhängigkeit der Histon-Besetzung von der viralen DNA-Replikation (siehe 3.1.5) und die Beteiligung der zellulären Chromatinisierungsmaschinerie (siehe 3.1.6).

3.1.1 Assoziation des HCMV-Genoms mit allen fünf Histontypen

Zunächst sollte geklärt werden, ob HCMV-Genome während der lytischen Infektion überhaupt mit Histonen besetzt sind und ob diese wie auf dem zellulären Genom in "klassischen" Nukleosomen angeordnet sind. In diesem Fall müssten die vier *core*-Histone H2A, H2B, H3 und H4 in äquimolaren Verhältnissen am viralen Genom nachweisbar sein. Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden mit einer MOI von 5 PFU/Zelle mit HCMV infiziert und 0,5 h p.i. durch ChIP (siehe 2.3.3) mit Antikörpern gegen die vier *core*-Histone sowie das *linker*-Histon H1 analysiert, um die Besetzung von sieben ausgewählten viralen Loci sowie drei zellulären Kontroll-Loci mit den verschiedenen Histon-Typen zu bestimmen. Dabei handelte es sich um das *core*-Element des lytischen Replikationsursprungs (oriLyt) sowie jeweils einen die Transkriptions-Startstelle im Promotor umfassenden Bereich (P) und einen Teil des 3'-Bereichs der transkribierten Region (T) dreier viraler Gene: das *major immediate early*-Gen (MIE), das *early*-Gen UL54 und das *late*-Gen UL32. Die untersuchten zellulären Loci waren Regionen des 3'-Bereichs der transkribierten Region des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und des Cytoskelett-Gens β -Tubulin (TUBB) sowie die Promotor-Region des hauptsächlich in fötalen Erythrozyten exprimierten γ -Globins (HBG). Die aus den ChIP-Experimenten erhaltenen *input ratios* (Prozentsatz der

immunpräzipitierten DNA, siehe 2.2.6) wurden auf den Mittelwert der drei zellulären Kontroll-Loci normiert, um die Unterschiede in der ChIP-Effizienz zwischen den verschiedenen Antikörpern auszugleichen (siehe Abb. 3.1). Durch diese Normierung schwanken die Werte der zellulären Loci für jedes Histon um den Wert 1; sie liegen trotz einiger Unterschiede relativ nahe beisammen. Die viralen Loci weisen ebenfalls eine untereinander ähnliche Besetzung mit den jeweiligen Histonen auf, im Vergleich zu den zellulären Kontroll-Genen sind sie allerdings bezüglich der *core*-Histone im Schnitt um etwa Faktor 5 unterbesetzt, bei Histon H1 sogar um Faktor 14. Da bei den zellulären Genen von einer klassischen Nukleosomenbesetzung und damit von gleichen Mengen der vier *core*-Histone ausgegangen werden kann (Kornberg, 1974), weisen die nach Normierung auf die zellulären Loci annähernd gleichen Werte für H2A, H2B, H3 und H4 an den viralen DNA-Abschnitten auf eine äquimolare Besetzung des HCMV-Genoms mit den vier *core*-Histonen hin. Damit ist die Grundvoraussetzung für eine Organisation der viralen DNA in "klassischen" Nukleosomen erfüllt.

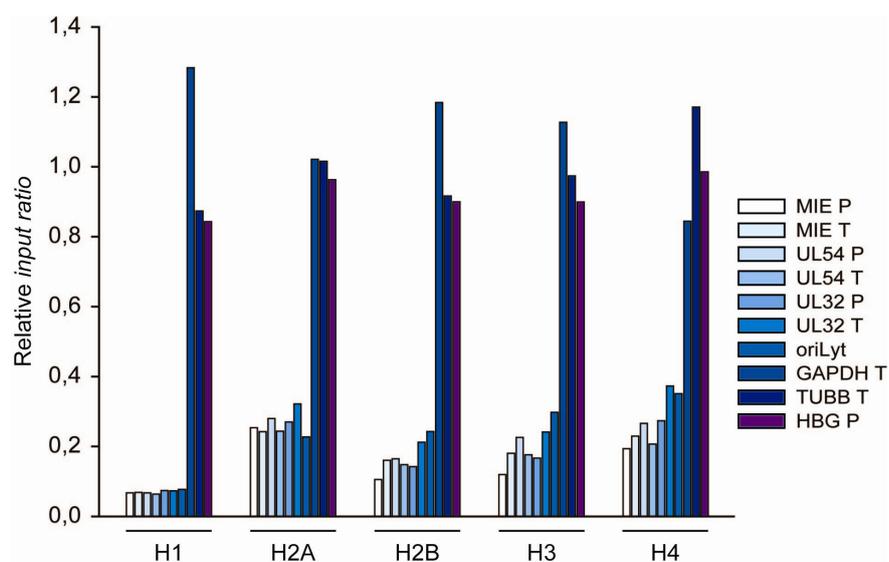


Abb. 3.1 Assoziation des HCMV-Genoms mit allen fünf Histontypen

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden 0,5h p.i. (MOI = 5 PFU/Zelle) mittels ChIP-Analyse mit Antikörpern gegen alle fünf Histontypen auf die Histonbesetzung ausgewählter viraler und zellulärer Loci hin untersucht. Die *input ratios* wurden für jedes Histon auf den Mittelwert der zellulären Kontroll-Loci normiert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnten innerhalb der Arbeitsgruppe weitere Hinweise auf die Assoziation des HCMV-Genoms mit allen vier *core*-Histonen erbracht werden, denn die Histone kolokalisieren mit den viralen Replikationszentren im Zellkern (Reitberger, 2008; siehe auch Nitzsche *et al.*, 2008).

Aufgrund der annähernd äquimolaren Mengen der *core*-Histone an ausgewählten viralen Genombereichen besteht also durchaus die Möglichkeit "klassischer" Nukleosomen auf dem HCMV-Genom während der lytischen Infektion. Allerdings sind die *core*-Histone und in verstärktem Maß das *linker*-Histon 0,5 h p.i. im Vergleich zu zellulären Loci deutlich unterrepräsentiert. Die Unterbesetzung mit H1 könnte sich aufgrund der Beteiligung dieses Histons an der Chromatin-Verdichtung auf die übergeordnete Struktur des HCMV-Chromatins auswirken.

3.1.2 Nukleosomale Struktur des HCMV-Genoms

Um die mögliche nukleosomale Struktur des HCMV-Genoms genauer zu analysieren, kam die Technik des Mikrokokken-Nuklease-Verdau zum Einsatz (siehe 2.2.3). Das Enzym MNase schneidet in Nukleosomen verpackte DNA ausschließlich im *linker*-Bereich, so dass die 146bp DNA des Nukleosoms vor Verdau geschützt sind. Bei einem Partialverdau nukleosomaler DNA entsteht daher ein Gemisch aus Mono-, Di-, Tri- usw. Nukleosomen, welches nach DNA-Aufreinigung auf einem Agarosegel distinkte Banden, die sogenannte Nukleosomen-Leiter, ergibt. Der Partialverdau Nukleosomen-freier DNA erzeugt hingegen ein gleichmäßiges Gemisch von DNA-Fragmenten aller Längen und damit einen "Schmier" auf dem Agarosegel.

Zunächst wurde gereinigte zelluläre und virale DNA mit unterschiedlichen Mengen MNase verdaut und nach Aufreinigung auf Agarosegelen analysiert, um sequenzabhängige Präferenzen des Enzyms auszuschließen (siehe Abb. 3.2). In beiden Fällen zeigen sich unabhängig vom Grad des Verdau keine distinkten Banden sondern es entsteht eine gleichmäßige DNA-Fragment-Mischung; in der am stärksten verdauten Probe ist kaum noch DNA zu erkennen, zudem liegt die Durchschnittslänge der Fragmente deutlich unter 100bp, so dass wohl keine vor Verdau geschützten DNA-Bereiche existieren. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die beim Verdau nukleosomaler DNA erwartete Leiter-Struktur durch Sequenz-Präferenzen der MNase zustande kommt.

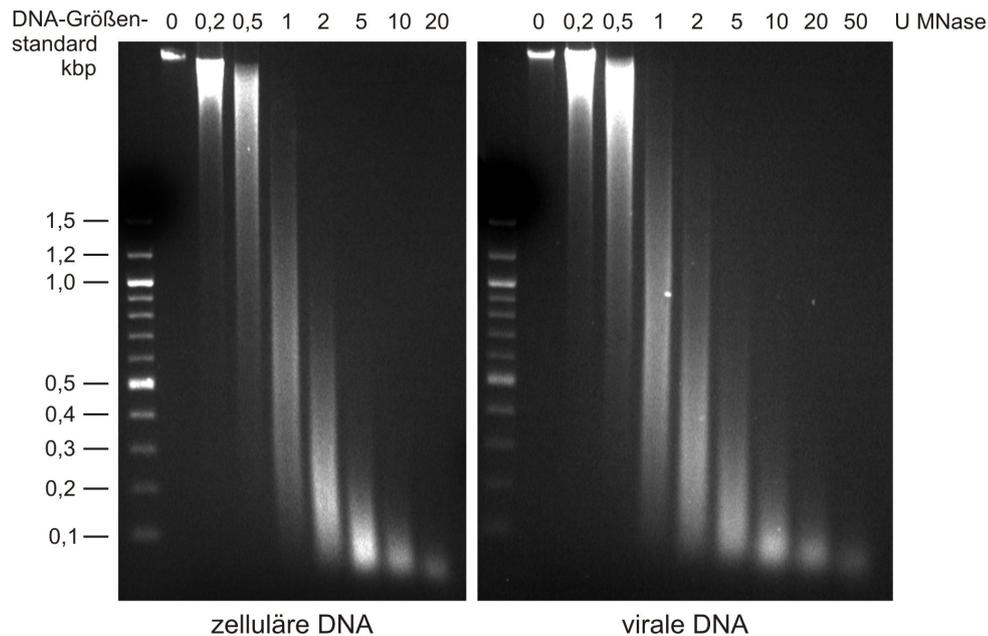


Abb. 3.2 Verdau Nukleosomen-freier zellulärer und viraler DNA

Je 2 μg bzw. 1,8 μg gereinigte zelluläre bzw. virale DNA wurden mit den angegebenen Mengen MNase für jeweils 3 min bei Raumtemperatur verdaut, gereinigt und auf Agarosegelen aufgetrennt. Die Spuren mit unverdauter DNA enthalten nur je 200 ng.

Als Nächstes wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (MOI = 5 PFU/Zelle) ein Verdau der intrazellulären DNA mit unterschiedlichen MNase-Mengen durchgeführt und die gereinigte DNA durch Agarosegelelektrophorese mit anschließendem Southern Blot analysiert (siehe 2.2.3, 2.2.2). Aufgrund der DNA-Mengen-Verhältnisse lassen die Agarosegele vor allem Rückschlüsse auf das zelluläre Genom zu – erst 72 h p.i. ist aufgrund der fortgeschrittenen viralen DNA-Replikation eine leichte Zunahme der Gesamt-DNA-Menge in den Spuren mit DNA aus infizierten Zellen gegenüber den nicht infizierten Kontrollen zu erkennen (siehe Abb. 3.3). Ohne MNase (nur für 2 h p.i. abgebildet) fand kein DNA-Verdau statt, in den Proben mit MNase findet man jeweils eine Bande mit hochmolekularer unverdauter DNA sowie mehrere Banden verdauter DNA, die oberhalb von ca. 1 kbp zu einem gleichmäßigen "Schmier" verschmelzen. Da jedes Nukleosom 146 bp DNA vor Verdau schützt, entspricht die Bande auf dieser Höhe den Mononukleosomen, bei ca. 320 bp und 500 bp folgen die Banden, welche dem Di- bzw. Trinukleosom entsprechen (jeweils inklusive *linker*-DNA) – mindestens bis zu fünf Nukleosomen weit ist die Leiterstruktur zu erkennen. Mit zunehmender Vollständigkeit des Verdau (von links nach rechts im Gel) laufen alle Banden ein Stück tiefer, da bei ausreichender MNase-Einwirkung auch die *linker*-DNA stärker abverdaut wird. Ein kleiner Teil der hochmolekularen, unverdauten DNA bleibt auch bei hohen MNase-Mengen erhalten, möglicherweise stammt sie

aus nicht ausreichend permeabilisierten Zellen, in die nicht genug MNase eindringen konnte. Neuere Daten der Arbeitsgruppe erhärten diesen Verdacht, da bei MNase-Verdau von isolierten Zellkernen diese Bande nicht erhalten bleibt (Winterling, 2009).

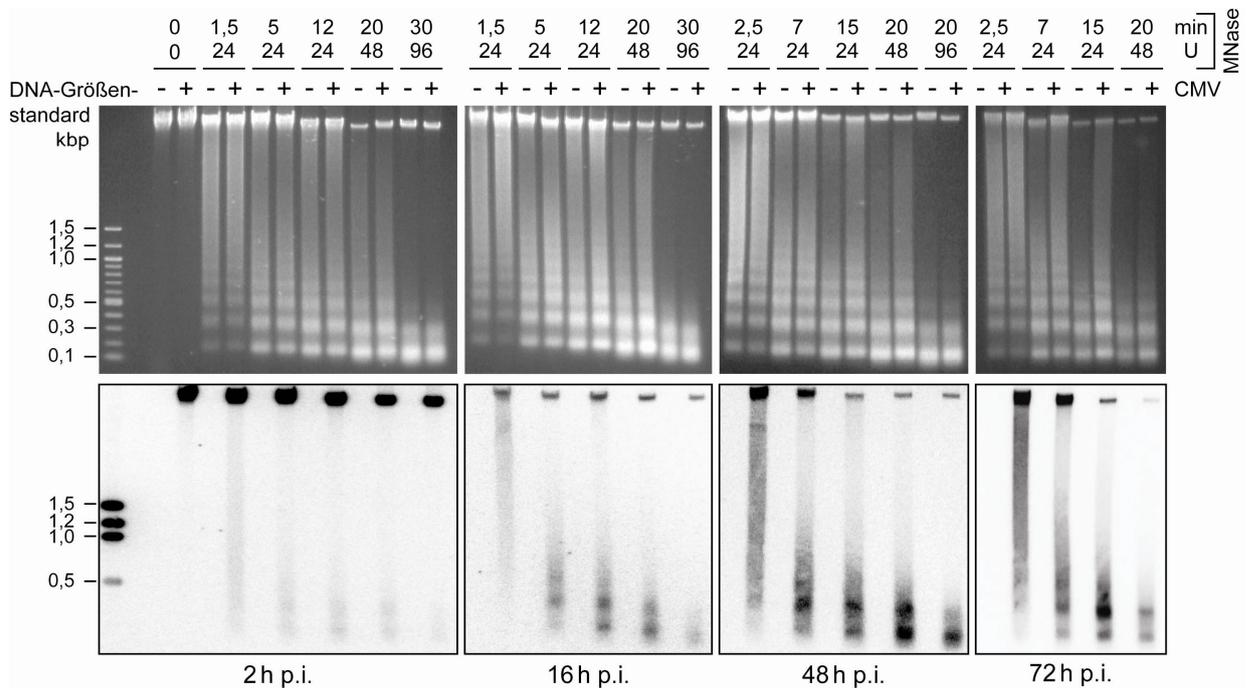


Abb. 3.3 Nukleosomale Struktur des HCMV-Genoms während der lytischen Infektion

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (2 - 72h) nach HCMV-Infektion (MOI = 5 PFU/Zelle) permeabilisiert und bei Raumtemperatur bzw. 37°C (bei den 96U-Proben) einem MNase-Verdau (0 - 30min; 0 - 96U) unterzogen. Nach DNA-Aufreinigung und Agarosegelelektrophorese (obere Bildreihe) folgte eine Analyse per Southern Blot mit einer gegen das gesamte HCMV-Genom gerichteten Sonde (untere Bildreihe). Nicht infizierte Zellen dienten als Kontrolle.

Die für die Southern Blots benutzte Sonde ist gegen das komplette virale Genom gerichtet, so dass die erhaltenen Banden einen Querschnitt der Struktur des HCMV-Chromatins abbilden. In den Spuren mit DNA aus nicht infizierten Zellen ist kein Signal zu erkennen, so dass von einer spezifischen Hybridisierung mit der viralen DNA ausgegangen werden kann. Ebenso wie auf den Agarosegelen ist auch auf den Blots zu allen untersuchten Zeitpunkten der Infektion eine Nukleosomen-Leiter mit entsprechenden Abständen zwischen den Banden zu erkennen, so dass zumindest Teile des viralen Genoms und/oder eine bestimmte Population von Genomen nukleosomal organisiert sein dürften. Im Gegensatz zum zellulären Genom auf den Agarosegelen sind auf den Blots allerdings nur Mono-, Di- und Trinukleosomen-Banden zu erkennen, was darauf hinweist, dass auf der HCMV-DNA wohl keine langen, gleichmäßigen Nukleosomen-Anordnungen existieren. Neben den nukleosomalen Banden ist auch im Southern Blot hochmolekulare unverdaute DNA zu sehen, die vermutlich dem Volllänge-HCMV-Genom entspricht, das z. B. durch Enkapsidierung oder andere

Mechanismen vor MNase-Verdau geschützt ist. Ein kleiner Teil dieser unverdauten DNA stammt möglicherweise auch aus nicht ausreichend permeabilisierten Zellen (siehe oben). Vor allem bei den beiden Zeitpunkten vor Einsetzen der viralen DNA-Replikation (2 h und 16 h p.i.) fällt auf, dass die Vollängen-DNA auch bei größeren MNase-Mengen kaum angegriffen wird, während 48 h und 72 h p.i. bei stärkerem Verdau die Menge an unverdauter DNA deutlich zurückgeht. Möglicherweise existieren hier zwei unterschiedliche Mechanismen, welche die HCMV-DNA unterschiedlich gut vor MNase-Verdau schützen. Auffällig ist auch das wechselnde Verhältnis von unverdauter zu verdauter DNA: 2 h p.i. finden sich nur minimale Mengen an nukleosomaler DNA, nahezu die gesamte DNA ist vor MNase-Verdau geschützt – vermutlich befindet sich in diesem frühen Stadium der Infektion noch ein größerer Anteil der infizierenden Genome in den Viruskapsiden. 16 h p.i. sind in etwa gleiche DNA-Mengen in der hochmolekularen und den nukleosomalen Banden vertreten, bei den späteren Zeitpunkten dominieren dagegen eher die verdauten DNA-Fragmente. Diese Beobachtung legt nahe, dass im Verlauf der lytischen Infektion die Nukleosomen-Besetzung des HCMV-Genoms zunimmt, sei es durch dichtere Besetzung der einzelnen Genome oder durch die zusätzliche Besetzung zuvor nackter Genome. Um einen besseren Vergleich der Chromatinisierung zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion zu ermöglichen, wurde DNA aus infizierten Zellen 0,5 h, 16 h, 48 h und 96 h p.i. (MOI = 5 PFU/Zelle) nebeneinander auf ein Agarosegel geladen und ebenfalls mittels

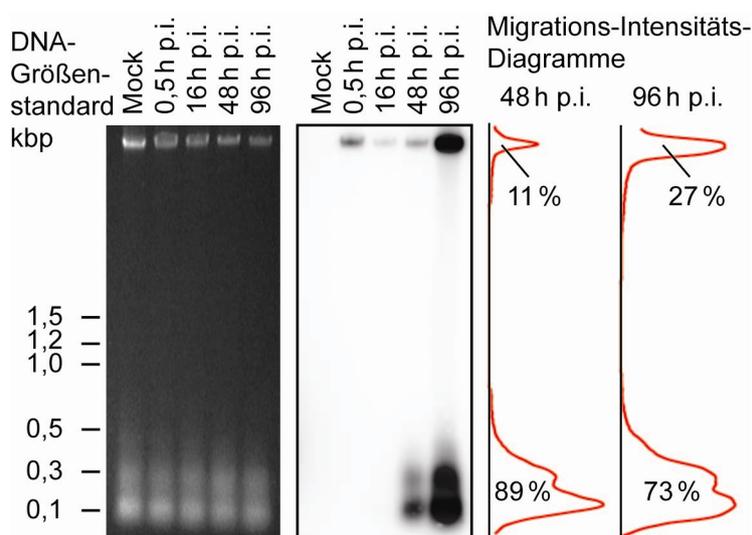


Abb. 3.4 Übersicht über vier Stadien der Infektion

Die Proben wurden analog zu Abb. 3.3 generiert, der MNase-Verdau erfolgte mit 96 U für 30 min bei 37°C. Für die 48 h- und 96 h p.i.-Spuren wurde die Signalintensität entlang der Laufstrecke mittels der Scion Image-Software ermittelt und als Migrations-Intensitäts-Diagramm dargestellt. Die Zahlenwerte geben den Anteil der unverdauten sowie der verdauten DNA am Gesamtsignal wieder.

Southern Blot analysiert; DNA aus nicht infizierten Zellen diente als Spezifitätskontrolle (siehe Abb. 3.4). Durch die zunehmende virale DNA-Replikation ist die Gesamtmenge an viraler DNA in den beiden letzten Spuren deutlich größer. Wie schon in Abb. 3.3 zeigt sich in allen Proben eine Bande unverdauter DNA sowie in den 48 h p.i.- und 96 h p.i.-Proben deutliche Banden auf Höhe von Mono- und

Dinukleosomen, die Trinukleosomen-Bande ist aufgrund der hohen MNase-Menge nicht mehr zu erkennen. Besonders zwischen 16h und 48h p.i. lässt sich eine starke Intensitätszunahme der Nukleosomen-Banden erkennen, was auf eine Zunahme der nukleosomal organisierten Genom(bereich)e hindeutet. Gleichzeitig ändert sich die Menge an Vollängen-DNA kaum, so dass es unwahrscheinlich ist, dass der Effekt durch eine bloße stärkere Zugänglichkeit der DNA für MNase zustande kommt. Die Analyse der Signalstärke mittels Migrations-Intensitäts-Diagrammen ergab außerdem eine Zunahme des Anteils der unverdauten DNA am Gesamtsignal von 11% auf 27% zwischen 48h und 96h p.i., was durch die erneute Enkapsidierung eines Teils der Genome spät in der Infektion verursacht werden könnte.

Die MNase-Verdau-Analysen bestätigen also, dass das HCMV-Genom während aller Phasen der lytischen Infektion zumindest teilweise mit klassischen Nukleosomen besetzt ist, auch wenn meist nur ein bis drei Nukleosomen in regelmäßigen Abständen angeordnet sind. Zudem scheint der Anteil der nukleosomal organisierten viralen DNA im Verlauf der Infektion deutlich zuzunehmen.

3.1.3 Zeitliche und räumliche Unterschiede in der Chromatinisierung

Da die MNase/Southern Blot-Analysen mit einer Sonde gegen das gesamte virale Genom durchgeführt wurden, lassen sie nur Rückschlüsse auf den Querschnitt der Nukleosomen-Dichte an der HCMV-DNA zu. Um detailliertere Informationen über die Besetzungssituation an einzelnen viralen Loci zu gewinnen, kamen Psoralen-Quervernetzungsanalysen (siehe 2.2.5) sowie FAIRE-Experimente (siehe 2.2.4) zum Einsatz. Das Prinzip der Psoralen-Quervernetzungsanalyse basiert auf der Eigenschaft von Trimethylpsoralen, bevorzugt in Nukleosomen-freie DNA-Bereiche zu interkalieren und bei UV-Bestrahlung zur

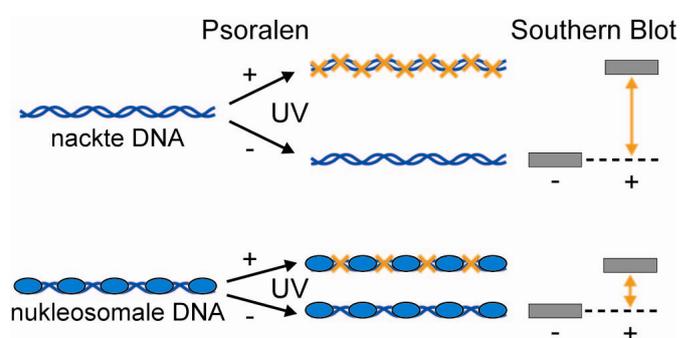


Abb. 3.5 Schema der Psoralen-Quervernetzungsanalyse

Quervernetzung der beiden DNA-Stränge zu führen (siehe Abb. 3.5). Diese Quervernetzung lässt die betroffenen DNA-Fragmente im Agarosegel langsamer laufen. Je nach Nukleosomen-Dichte wird unterschiedlich viel Psoralen eingelagert und die Verzögerung im Gel fällt dementsprechend stärker

oder schwächer aus.

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden vor (Mock) sowie 8 h und 48 h nach HCMV-Infektion (MOI = 5 PFU/Zelle) analysiert. Nach Psoralen- bzw. Lösungsmittel-Behandlung und DNA-Extraktion wurden mittels passender Restriktionsendonukleasen DNA-Fragmente des viralen MIE P- und MIE T- sowie des zellulären 18S-rDNA-Locus ausgeschnitten, über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Southern Blot mit spezifischen Sonden nachgewiesen. Als Kontrollen für den maximalen Laufweitenunterschied zwischen Psoralen- und Lösungsmittel-behandelten Proben diente aus infizierten Zellen aufgereinigte und damit Nukleosomen-freie DNA (siehe Abb. 3.6) – das Laufverhalten der DNA aus nicht infizierten Zellen sowie aus 8 h und aus 48 h p.i. geernteten Zellen war erwartungsgemäß identisch (Daten nicht gezeigt). In den beiden Blots, die mit gegen virale DNA-Bereiche gerichteten Sonden

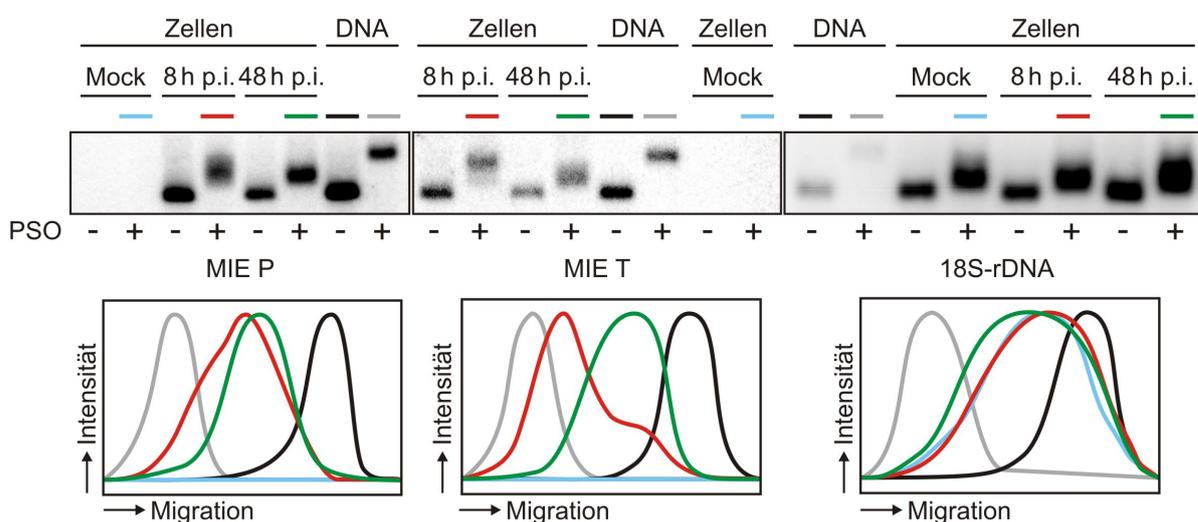


Abb. 3.6 Nukleosomale Besetzung des MIE P-, MIE T- sowie des zellulären 18S-rDNA-Locus während der Infektion

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen sowie aus infizierten MRC-5-Zellen isolierte DNA wurden mit Psoralen (PSO) bzw. Lösungsmittel behandelt und mit UV bestrahlt. Nach DNA-Aufreinigung wurden die Proben mit Restriktionsendonukleasen verdaut und mit Locus-spezifischen Sonden im Southern Blot nachgewiesen. Die Signalintensitätsverteilung entlang der Laufstrecke wurde mittels der Scion Image-Software bestimmt und als Intensitäts-Migrations-Diagramm dargestellt. Die grauen und schwarzen Kurven repräsentieren die mit Psoralen bzw. Lösungsmittel behandelte Nukleosomen-freie DNA, blaue, rote und grüne Kurven stellen die Psoralen-behandelten Zellen ohne Infektion, 8 h und 48 h p.i. dar.

analysiert wurden, zeigte sich als Nachweis für die Spezifität der Sonden in den Spuren mit DNA aus nicht infizierten Zellen kein Signal. Alle Spuren mit Lösungsmittel-behandelten Proben weisen eine Bande auf der gleichen Höhe auf. Die Banden der Psoralen-behandelten Proben laufen allesamt höher, wobei die gereinigte DNA wegen der größten Menge an eingelagertem Psoralen die stärkste Verschiebung zeigt. In den Intensitäts-Migrations-Diagrammen unter den jeweiligen Blots ist die Signalintensitätsverteilung entlang der

Laufstrecke der Spuren aufgetragen: Die schwarze und die graue Kurve entsprechen jeweils der Lösungsmittel- bzw. Psoralen-behandelten nukleosomenfreien DNA und geben damit den maximalen Laufweitenunterschied durch das Psoralen an. Die roten und grünen Kurven spiegeln die Nukleosomenbesetzung 8 h bzw. 48 h p.i. wider, die blauen Kurven die Besetzung in nicht infizierten Zellen. Je näher an der schwarzen Kurve sich die farbigen Kurven wiederfinden, desto höher ist die Nukleosomenbesetzung des entsprechenden Locus. Für die zelluläre Kontrolle (18S-rDNA) sind die drei farbigen Kurven nahezu deckungsgleich (die grüne Kurve ist wegen der Überladung der entsprechenden Spur etwas breiter), was auf eine gleichbleibend hohe Nukleosomenbesetzung zu allen drei Zeitpunkten hinweist, wie man sie für das zelluläre Genom erwartet. Beide viralen Loci zeigen 48 h p.i. eine relativ scharf abgegrenzte Bande, was auf eine einheitliche Genompopulation hindeutet, während 8 h p.i. die Hauptpeaks deutliche Schultern aufweisen, die vermutlich auf mehrere unterschiedlich besetzte Genompopulationen zurückgehen. So scheint der Hauptanteil der HCMV-Genome sowohl 8 h als auch 48 h p.i. am MIE P eine mittlere Nukleosomenbesetzung aufzuweisen, während zum früheren Zeitpunkt zusätzlich noch weniger stark besetzte Genome vorhanden sind. Am MIE T hingegen sind die meisten Genome 8 h p.i. mit geringen Nukleosomenmengen assoziiert, einige jedoch weisen auch einen höheren Besetzungsgrad auf. Später im Verlauf der Infektion scheinen alle HCMV-Genome in diesen dicht besetzten Zustand überzugehen, so dass im Hinblick auf den MIE T-Locus nur noch eine einheitliche Population existiert.

Die Besetzungsunterschiede zwischen verschiedenen viralen Loci wurden außerdem mittels FAIRE (*formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements*) untersucht. Für diese Technik werden die Zellen jeder Probe in zwei Hälften aufgeteilt, von denen eine mittels Formaldehyd einer Quervernetzung von DNA und DNA-assoziierten Proteinen unterzogen wird (siehe Abb. 3.7). Nach Ultraschall-Behandlung zum Scheren der DNA werden die Proben mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert – wegen der Formaldehyd-Quervernetzung werden dabei Protein-assoziierte DNA-Fragmente in die organische Phase gezogen. Nach Aufreinigung der DNA und Quantifizierung spezifischer Bereiche durch *real time*-PCR gibt der Unterschied zwischen den Proben mit und ohne Formaldehyd-Behandlung Aufschluss über die Protein-Besetzungsdichte des entsprechenden DNA-Bereichs.

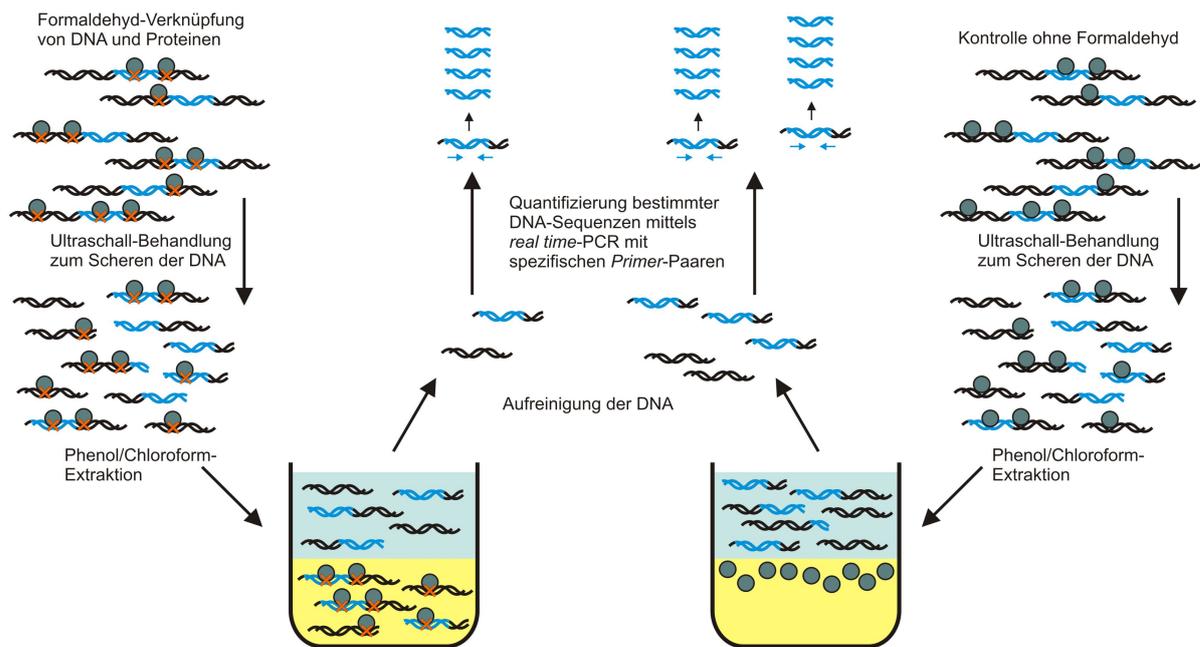


Abb. 3.7 Schema der FAIRE-Technik

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden 2h, 16h, 48h und 96h nach HCMV-Infektion (MOI = 5 PFU/Zelle) mittels FAIRE analysiert. Die Quotienten aus den ermittelten DNA-Mengen ohne und mit Formaldehyd-Behandlung (-F/+F) sind ein Maß für die Besetzungsdichte des jeweiligen Locus mit Proteinen – vorwiegend Histone, aber auch andere DNA-assoziierte Proteine. Die Werte für die viralen Loci wurden für jeden Zeitpunkt der Infektion auf den entsprechenden GAPDH T-Wert normiert (siehe Abb. 3.8). Wieder fällt auf, dass die viralen Genombereiche im Vergleich zur zellulären Kontrolle deutlich weniger stark mit Histonen besetzt sind. Aber auch die Unterschiede zwischen den viralen Loci, die schon durch die Psoralen-Quervernetzungsanalysen zutage traten, werden durch die FAIRE-Experimente bestätigt. So sind MIE T, UL54 P, UL54 T und UL32 P an den beiden späteren Infektionszeitpunkten merklich stärker chromatinisiert als die drei übrigen Loci. Früh in der Infektion sind die Unterschiede zwischen den Loci eher gering, lediglich der MIE P-Bereich ist etwas unterbesetzt. Sehr deutlich ist auch der starke Anstieg der Histon-Besetzung an den drei codierenden Genen zwischen 16h und 48h p.i. zu erkennen, der auch schon durch die MNase-Analysen (siehe 3.1.2) festgestellt wurde. Die Besetzungsdichte des lytischen Replikations-Ursprungs hingegen bleibt während der Infektion konstant niedrig. Zwischen 2h und 16h p.i. zeigen sich indes keine signifikanten Unterschiede, auch zwischen 48h p.i. und dem letzten Zeitpunkt lässt sich kein eindeutiger Trend feststellen, da die Besetzung an einigen Loci leicht rückläufig ist, während sie an den übrigen leicht ansteigt.

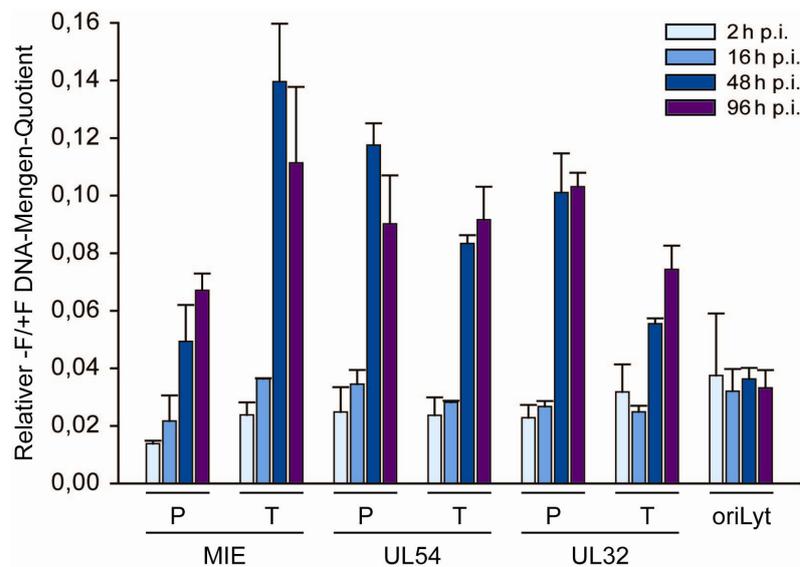


Abb. 3.8 Proteinbesetzung viraler Loci im Infektionsverlauf

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (MOI = 5 PFU/Zelle) mittels FAIRE analysiert. Der Quotient der erhaltenen DNA-Mengen ohne und mit Formaledehyd-Behandlung spiegelt die Besetzungsdichte der jeweiligen DNA-Bereiche mit Proteinen (v.a. Histonen) wider und wurde für die dargestellten viralen Loci auf den zellulären GAPDH T-Locus normiert.

Mittels zweier unterschiedlicher Techniken konnte also gezeigt werden, dass die Nukleosomen-Besetzung der verschiedenen viralen Loci sich vor allem im späteren Infektionsverlauf zum Teil deutlich unterscheidet – z. B. sind der MIE P- und der oriLyt-Bereich schwächer besetzt als die MIE T-Region. Für die beiden MIE-Loci ergaben sich Hinweise auf unterschiedliche Populationen in der frühen Phase der lytischen Infektion, die im weiteren Verlauf in eine homogene Population übergehen. Auch konnte der starke Anstieg der Chromatinisierung zwischen 16h und 48h p.i. für die sechs untersuchten Loci im codierenden Bereich bestätigt werden – ebenso wie die deutlich geringere Besetzung des HCMV-Genoms im Vergleich zu zellulärer DNA.

3.1.4 Detaillierte Analyse der H3-Besetzung verschiedener viralen Loci im Infektionsverlauf

Die unter 3.1.3 aufgeführten Techniken beruhen beide auf einem indirekten Nachweis der Nukleosomen-Besetzung: im Falle der Psoralen-Quervernetzungsanalysen mittels der Einlagerung von Psoralen in Nukleosomen-freie DNA-Bereiche, im Falle der FAIRE-Analysen durch die Abreicherung Protein-assoziiierter DNA-Fragmente. Die schon unter 3.1.1 verwendete ChIP-Technik basiert hingegen auf der direkten Anreicherung von mit bestimmten Proteinen assoziierten DNA-Regionen durch spezifische Antikörper. Die weitere detaillierte Analyse der Chromatinisierung des HCMV-Genoms im Infektions-Zeitverlauf

erfolgte daher mittels ChIP, wobei stellvertretend für das komplette Nukleosom die Besetzung mit Histon H3 untersucht wurde.

Dazu wurden wachstumsarretierte MRC-5-Zellen in nicht infiziertem Zustand sowie zu zehn verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (MOI = 5 PFU/Zelle) zwischen 0,5 h und 96 h p.i. mit Formaldehyd fixiert, lysiert und die DNA durch Ultraschall-Behandlung geschoren. Nach Anreicherung von H3-assoziierten DNA-Fragmenten mittels eines H3-spezifischen Antikörpers wurde die DNA aufgereinigt und durch *real time*-PCR analysiert. Die ermittelten *input ratio*-Werte sind in Abb. 3.9 als Kreisflächen und in Abb. 3.10 als Säulendiagramm dargestellt. Als Spezifitätskontrolle diente eine Immunpräzipitation mit Kaninchen-Präimmunsereum (rb IgG) – alle durch Präzipitation mit dem anti-H3-Antikörper generierten Werte sind mindestens doppelt so hoch wie die mittels rb IgG erhaltenen.

Die H3-Besetzung des zellulären GAPDH T-Locus blieb während der gesamten Infektion weitgehend konstant. Einige andere zelluläre Genbereiche wurden stichprobenartig in nicht infizierten Zellen und 24 h p.i. untersucht (Abb. 3.9 B), auch ihre Besetzung wurde durch die Infektion nicht verändert. Zusätzlich zu den oben bereits erwähnten Loci wurden Sequenzen im Bereich der pericentromerischen Satelliten-DNA 2 (Sat2) und im 5'-Bereich der transkribierten Region des für das ribosomale Protein L30 codierenden RPL30-Gens und des fakultativ heterochromatischen, an der Muskelzellendifferenzierung beteiligten MyoD-Gens untersucht. Wegen der erhöhten Störungsanfälligkeit des GAPDH T-*Primer*-Paares in der PCR wurde außerdem ein weiter am 5'-Ende der GAPDH T-Sequenz gelegener Locus in die Untersuchung aufgenommen (GAPDH T (1. Exon)). Bis auf die Satelliten-DNA-Sequenz und vor allem den GAPDH T (1. Exon)-Locus war die Besetzungsdichte der zellulären DNA-Bereiche sehr einheitlich. Die Unterschiede zwischen den beiden GAPDH T-Loci lassen sich vermutlich durch die geringere Nukleosomendichte im Bereich um die Transkriptions-Startstelle erklären (Barski *et al.*, 2007), die geringfügig reduzierte H3-Besetzung der Satelliten-Sequenz hängt möglicherweise mit deren pericentromerischer Lage zusammen.

Die Chromatinisierung des HCMV-Genoms lässt sich in vier Phasen einteilen: Die initiale Chromatinisierung des Genoms findet sofort bei Ankunft im Wirtszellkern statt – schon 0,5 h p.i. war an allen untersuchten Loci Histon H3 nachweisbar. Bis zum Einsetzen der DNA-Replikation 16 h p.i. folgt eine Phase der niedrigen Nukleosomen-Besetzung mit nur leichten Schwankungen. Ab 24 h bis 48 h p.i. findet an den meisten Genombereichen ein starker Anstieg der H3-Besetzung statt, danach nimmt die Besetzung bis 96 h p.i. wieder ab –

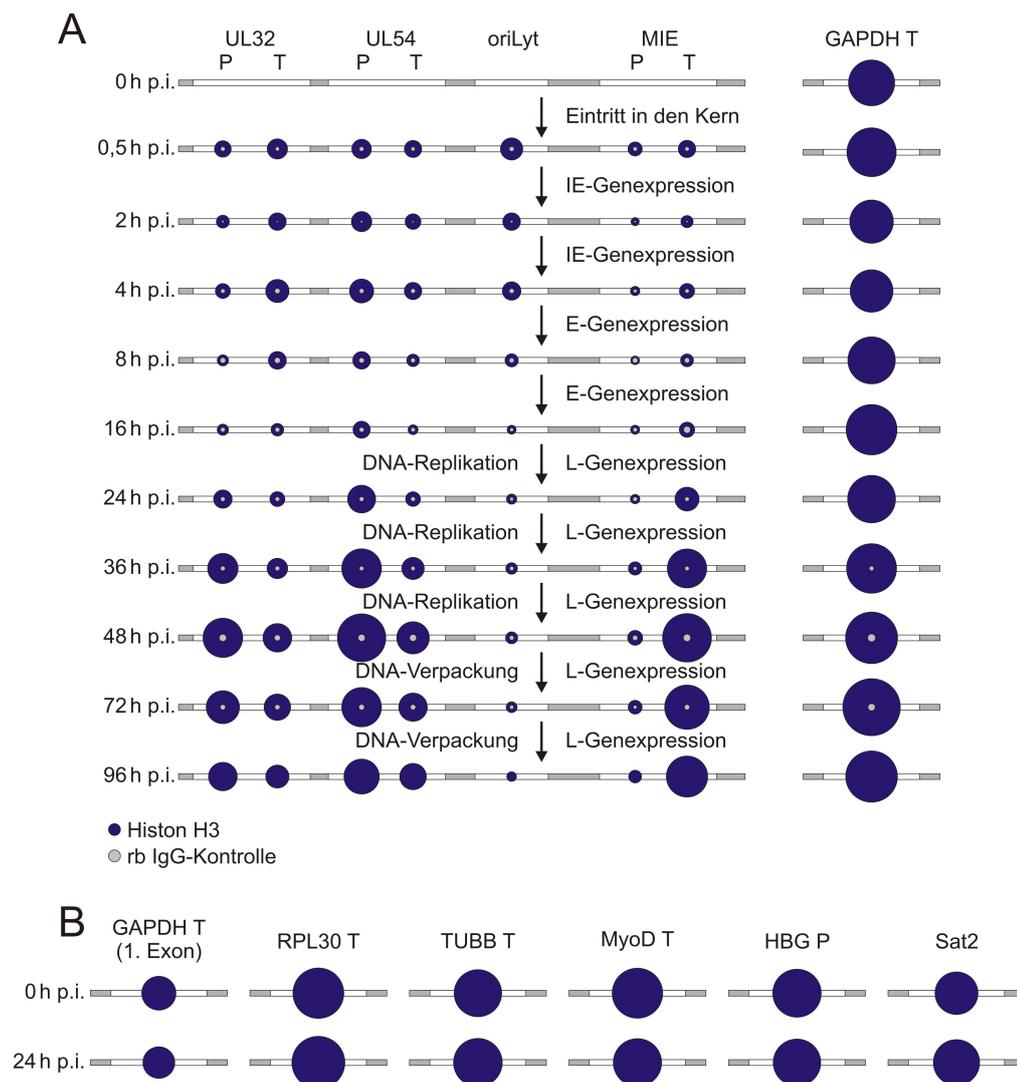


Abb. 3.9 H3-Besetzung viraler und zellulärer Loci im Verlauf der lytischen Infektion

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden in nicht infiziertem Zustand sowie zu den angegebenen Zeitpunkten nach HCMV-Infektion (MOI = 5 PFU/Zelle) mittels ChIP analysiert. Es kamen ein Histon H3-spezifischer Antikörper und – als Spezifitätskontrolle – Kaninchen-Präimmunserum (rb IgG) zum Einsatz, die erhaltenen *input ratio*-Werte sind als blaue (H3) und graue (rb IgG) Kreisflächen auf einem schematischen HCMV-Genom bzw. zellulären Genomteilen dargestellt (A). Wo kein rb IgG-Wert abgebildet ist, wurde kein spezifisches PCR-Produkt gebildet. Die zellulären Kontroll-Loci wurden bis auf GAPDH T nur in nicht infizierten Zellen sowie 24h p.i. untersucht (B).

möglicherweise verursacht durch die zu diesem Zeitpunkt stattfindende Verpackung eines Teils der Genome in Kapside oder auch durch eine Erschöpfung des Vorrats an mobilisierbaren Histonen. Ausnahmen von diesem Modell bilden der MIE P- sowie der oriLyt-Bereich, die über den gesamten Infektionsverlauf hinweg eine gleichbleibend niedrige Histon-Besetzung aufweisen – am oriLyt findet man allerdings anfangs eine etwas höhere H3-Menge, die innerhalb der ersten acht Stunden auf das spätere niedrige Niveau absinkt.

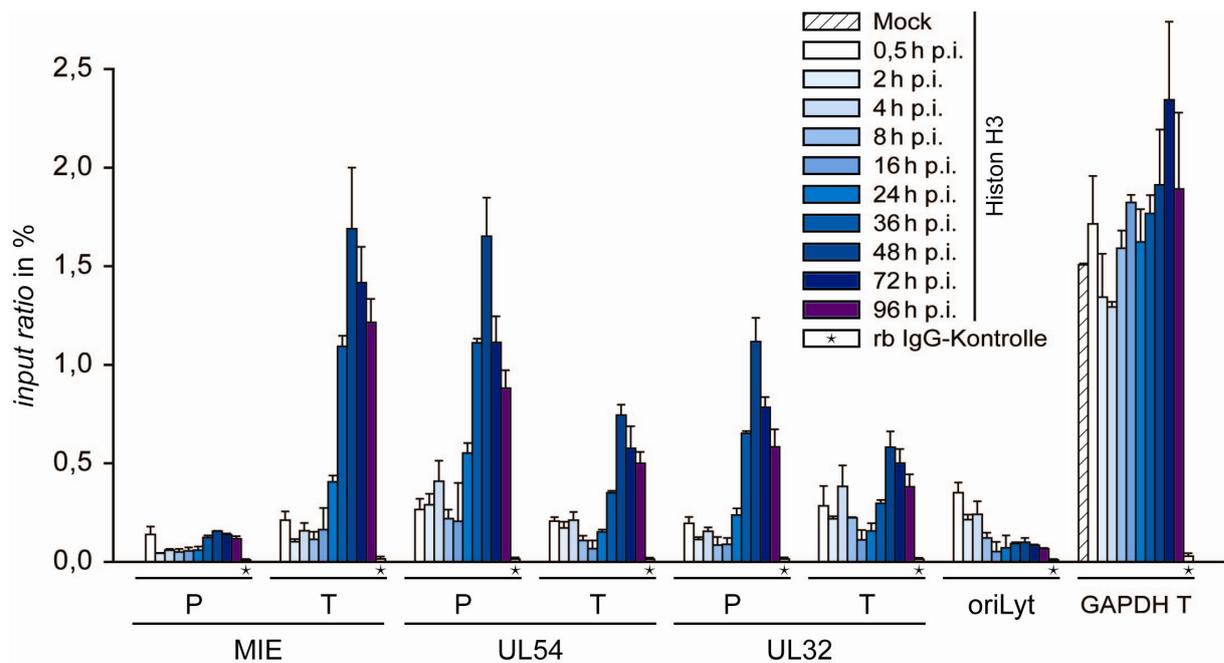


Abb. 3.10 H3-Besetzung viraler und zellulärer Loci im Verlauf der lytischen Infektion

Dieselben Daten wie in Abb. 3.9 wurden als Säulendiagramm dargestellt. Der rb IgG-Wert ist jeweils als Mittelwert über alle Zeitpunkte angegeben.

Durch die umfassende ChIP-Analyse sieben ausgewählter viraler Loci konnte also gezeigt werden, dass die Besetzung mit Histon H3 und damit wohl auch mit Nukleosomen sowohl im zeitlichen Verlauf der lytischen Infektion als auch zwischen den untersuchten Genombereichen großen Schwankungen unterliegt. Für die meisten viralen Loci konnte die Chromatinisierung in vier Phasen unterteilt werden, der MIE P und der oriLyt nehmen vermutlich wegen ihrer Bedeutung als wichtigster lytischer Promotor sowie als Replikationsursprung eine Sonderstellung ein (siehe 4.1).

3.1.5 DNA-Replikations-(un)abhängige Chromatinisierungsphasen

Das zeitliche Zusammentreffen der starken Zunahme der Histon H3-Besetzung mit der viralen DNA-Replikation lässt einen Zusammenhang zwischen beiden Vorgängen vermuten, zumal auch das zelluläre Genom während seiner Replikation mit Nukleosomen aufgefüllt wird und daher eine Replikations-abhängige Chromatinisierungsmaschinerie in der Wirtszelle vorhanden ist. Um einen möglichen Zusammenhang mit der viralen DNA-Replikation zu überprüfen, wurden beide Chromatinisierungsphasen, die mit einem H3-Besetzungsanstieg verbunden sind, untersucht (vgl. 3.1.4): die initiale Chromatinisierung des HCMV-Genoms bei Eintritt in den Kern und der deutliche Besetzungsanstieg nach 16 h p.i., der mit der viralen DNA-Replikation durch die virale DNA-Polymerase pUL54 einhergeht. Abb. 3.11 A zeigt

den mittels *real time*-PCR ermittelten Verlauf der HCMV-Genom-Kopienzahl (UL32 T) während der lytischen Infektion, normiert auf die zelluläre Genom-Kopienzahl (GAPDH T) zu Beginn der Infektion. Zwischen 0,5 h und 2 h p.i. nimmt die HCMV-DNA-Menge noch zu, da das Inokulum auf den Zellen verweilt und weiterhin Virionen in die Wirtszellen eindringen können, danach folgt eine möglicherweise durch DNA-Abbau verursachte leichte Abnahme bis 16 h p.i., wo die virale DNA-Replikation einsetzt und für eine kontinuierliche Zunahme der HCMV-DNA sorgt. Die zelluläre Genom-Kopienzahl bleibt abgesehen von experimentellen Schwankungen über die Infektion hinweg konstant. Da pro Zelle zwei GAPDH-Loci vorliegen, beläuft sich die Anzahl der HCMV-Genome pro Zelle zu Beginn der Infektion auf etwa 80 – was bei einer MOI von 5 PFU/Zelle in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen auf einen entsprechend hohen Anteil von nicht infektiösen, aber DNA-haltigen Viruspartikeln hindeutet (vgl. Heider *et al.*, 2002). Gegen Ende des Replikationszyklus (72 h p.i.) liegen ca. 2000 Kopien pro Zelle vor – etwa 7% der zellulären DNA-Menge*.

Zum Zeitpunkt der initialen Chromatinisierung findet zwar noch keine virale DNA-Replikation in messbaren Größenordnungen statt, jedoch ist eine geringfügige Replikationsaktivität etwa durch zelluläre DNA-Polymerasen oder durch geringe Mengen an pUL54 im Viruspartikel nicht auszuschließen. Um die Abhängigkeit der Chromatinisierung von der DNA-Replikation zu ermitteln, wurden drei verschiedene Inhibitoren eingesetzt (siehe 2.4.6): Phosphonoessigsäure (PAA) und Ganciclovir sind Inhibitoren der viralen DNA-Polymerase, Aphidicolin inhibiert zusätzlich die zellulären DNA-Polymerasen α , δ , und ϵ .

Da in der initialen Chromatinisierungsphase sowohl virale als auch zelluläre Polymerasen an einer möglichen viralen DNA-Replikation beteiligt sein könnten, wurden wachstumsarretierte MRC-5-Zellen für 1 h mit PAA bzw. Aphidicolin vorbehandelt, für 2 h in Anwesenheit der Inhibitoren mit HCMV infiziert (MOI = 5 PFU/Zelle) und mittels ChIP auf die H3-Besetzung des HCMV-Genoms hin untersucht. Die HCMV-*input*-DNA-Mengen normiert auf den GAPDH T-Wert der Kontrollzellen waren sowohl in unbehandelten als auch in Inhibitor-behandelten Zellen weitgehend konstant (siehe Abb. 3.11 B). Auch die H3-Besetzungs-Niveaus normiert auf die GAPDH T-Werte zeigen an den viralen Loci keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und PAA- bzw. Aphidicolin-behandelten Zellen, so dass in dieser frühen Infektionsphase kein Einfluss der DNA-Replikation auf die Chromatinisierung messbar ist (siehe Abb. 3.11 D).

* $2000 \times 2,3 \times 10^5$ bp virale DNA vs. $6,4 \times 10^9$ bp zelluläre DNA pro Zelle

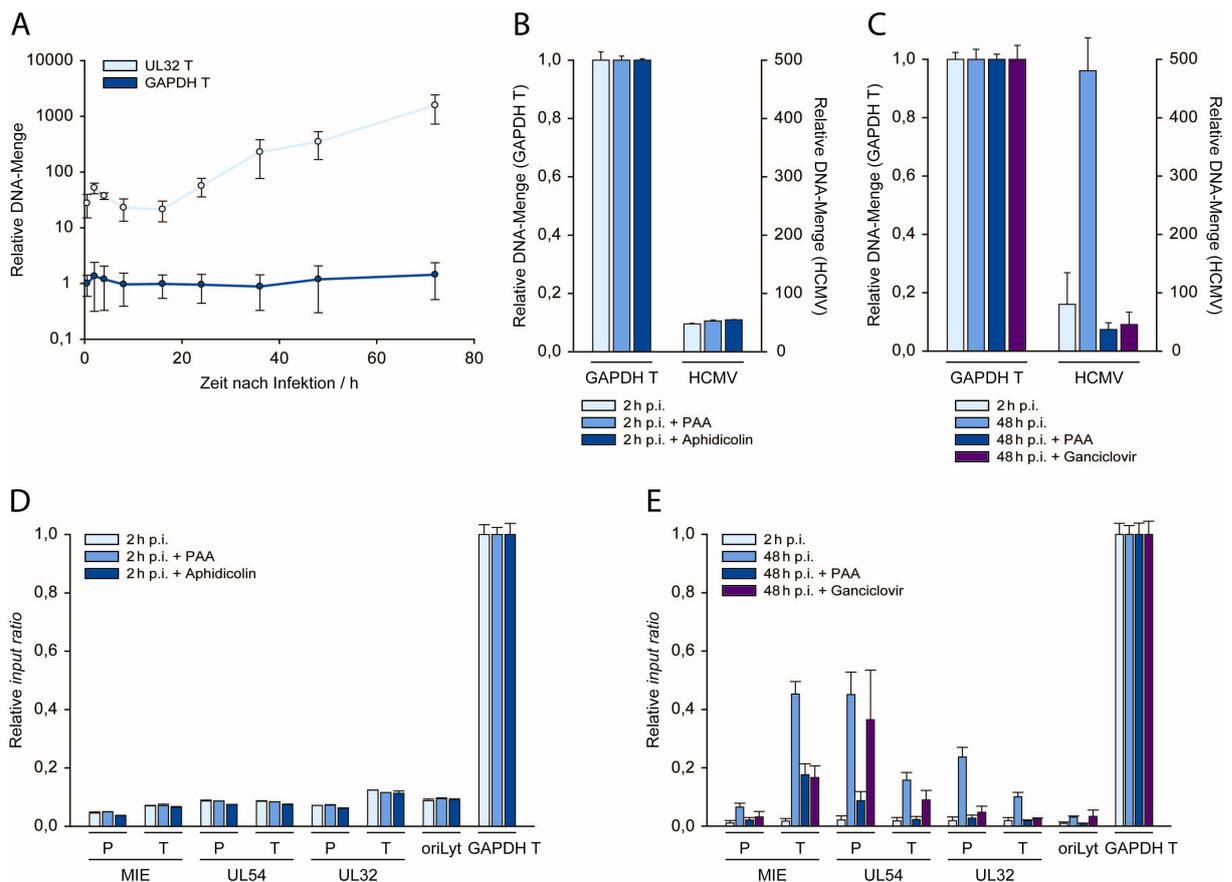


Abb. 3.11 DNA-Replikationsabhängigkeit der Chromatinisierungsphasen des HCMV-Genoms

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden mit HCMV infiziert (MOI = 5 PFU/Zelle) und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion analysiert. Für (A) wurden die viralen und zellulären Genom-Kopienzahlen (repräsentiert durch die UL32 T- und GAPDH T-Loci) während der lytischen Infektion bestimmt und auf den ersten GAPDH T-Wert normiert. Für (B) und (D) wurden die Zellen für 1 h mit PAA (1,4 mM) bzw. Aphidicolin (2 μ M) vorbehandelt, um virale und zelluläre DNA-Polymerasen zu inhibieren, dann für 2 h in Anwesenheit der Inhibitoren infiziert und anschließend mittels ChIP auf die Histon H3-Besetzung ausgewählter viraler und zellulärer Loci hin untersucht. Für (C) und (E) wurden nach der Infektion PAA (1,4 mM) bzw. Ganciclovir (100 μ M) zugegeben, um die virale DNA-Replikation zu unterbinden, und die Zellen 48 h p.i. mittels ChIP analysiert. (B) und (C) zeigen jeweils die zellulären und viralen (Mittelwert aller viralen Loci) DNA-Mengen normiert auf den jeweiligen GAPDH T-Wert. In (D) und (E) sind die *input ratio*-Werte der ausgewählten Loci für Histon H3 normiert auf den jeweiligen GAPDH T-Wert abgebildet.

Zur Untersuchung der zweiten Phase des H3-Besetzungsanstiegs wurden wachstumsarretierte MRC-5-Zellen mit HCMV infiziert (MOI = 5 PFU/Zelle), ab 2 h p.i. mit PAA bzw. Ganciclovir behandelt und 48 h p.i. durch ChIP analysiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte infizierte Zellen 2 h und 48 h p.i.. Die virale DNA-Menge (normiert auf den jeweiligen GAPDH T-Wert) steigt in unbehandelten Zellen zwischen 2 h und 48 h p.i. durch die virale DNA-Replikation deutlich an, während sie in den PAA- und Ganciclovir-behandelten Proben sogar noch etwas absinkt (siehe Abb. 3.11 C), möglicherweise verursacht durch denselben DNA-Abbau-Mechanismus, der für die Abnahme der viralen DNA-Menge zwischen 2 h und 16 h p.i. verantwortlich ist (siehe Abb. 3.11 A). Die Inhibitoren waren also

erwartungsgemäß in der Lage, die virale DNA-Replikation weitreichend zu unterbinden. Die H3-Besetzung der viralen Loci normiert auf die jeweiligen GAPDH T-Werte zeigt zwischen 2 h und 48 h p.i. den schon aus 3.1.4 bekannten starken Anstieg (siehe Abb. 3.11 E). Unter Einsatz der beiden Inhibitoren konnte dieser Anstieg ebenfalls deutlich verringert werden, was zumindest auf eine teilweise DNA-Replikations-Abhängigkeit dieser Chromatinisierungsphase hindeutet. Das Besetzungs-Niveau der Inhibitor-behandelten Proben liegt allerdings noch zum Teil deutlich über dem der 2 h p.i.-Probe, vor allem bei Einsatz von Ganciclovir. Ein Erklärungsansatz wäre, dass der postulierte DNA-Replikations-unabhängige Besetzungsmechanismus, der für die initiale HCMV-DNA-Chromatinisierung verantwortlich zu sein scheint und durch PAA nicht gehemmt wird, möglicherweise auch in der späteren Chromatinisierungsphase parallel zur DNA-Replikations-abhängigen Besetzungsmechanik aktiv ist.

Durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren viraler und zellulärer DNA-Polymerasen konnte also gezeigt werden, dass die initiale Chromatinisierung des HCMV-Genoms zu Beginn der Infektion nicht an DNA-Replikation gekoppelt ist, während der starke H3-Besetzungsanstieg ab 16 h p.i. in hohem Maße von der viralen DNA-Replikation abhängt.

3.1.6 Assoziation viraler Replikationszentren mit Komponenten der zellulären Chromatinisierungsmechanik

Nachdem die Untersuchung der DNA-Replikations-Abhängigkeit der Chromatinisierung des HCMV-Genoms erste Hinweise auf die beteiligten Mechanismen erbrachte, sollte durch Lokalisationsstudien die Beteiligung zellulärer Komponenten an der Chromatinisierung der viralen DNA analysiert werden. Dazu wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie die Kolo-kalisation der viralen Replikationszentren (nachgewiesen durch Färbung der viralen Proteine IE2 bzw. ppUL44) mit dem Polymerase-Prozessivitätsfaktor PCNA sowie den Histon-Chaperonen CAF-1 und ASF1a untersucht (siehe 2.3.4). Alle drei sind an der DNA-Replikations-abhängigen Chromatinisierung zellulärer DNA beteiligt (siehe 1.2). Die Analyse der Gleichgewichtsmengen der entsprechenden Proteine im Infektionsverlauf erfolgte mittels Western Blot-Technik mit Gesamtzelllysaten (siehe Abb. 3.12 A): Der Nachweis von GAPDH diente dabei als Ladekontrolle, während sich durch die ppUL44-Zunahme der Infektionsverlauf nachverfolgen lässt. Die Gleichgewichtsmengen von CAF-1, PCNA und ASF1a nehmen während der HCMV-Infektion merklich zu, was auf eine erhöhte

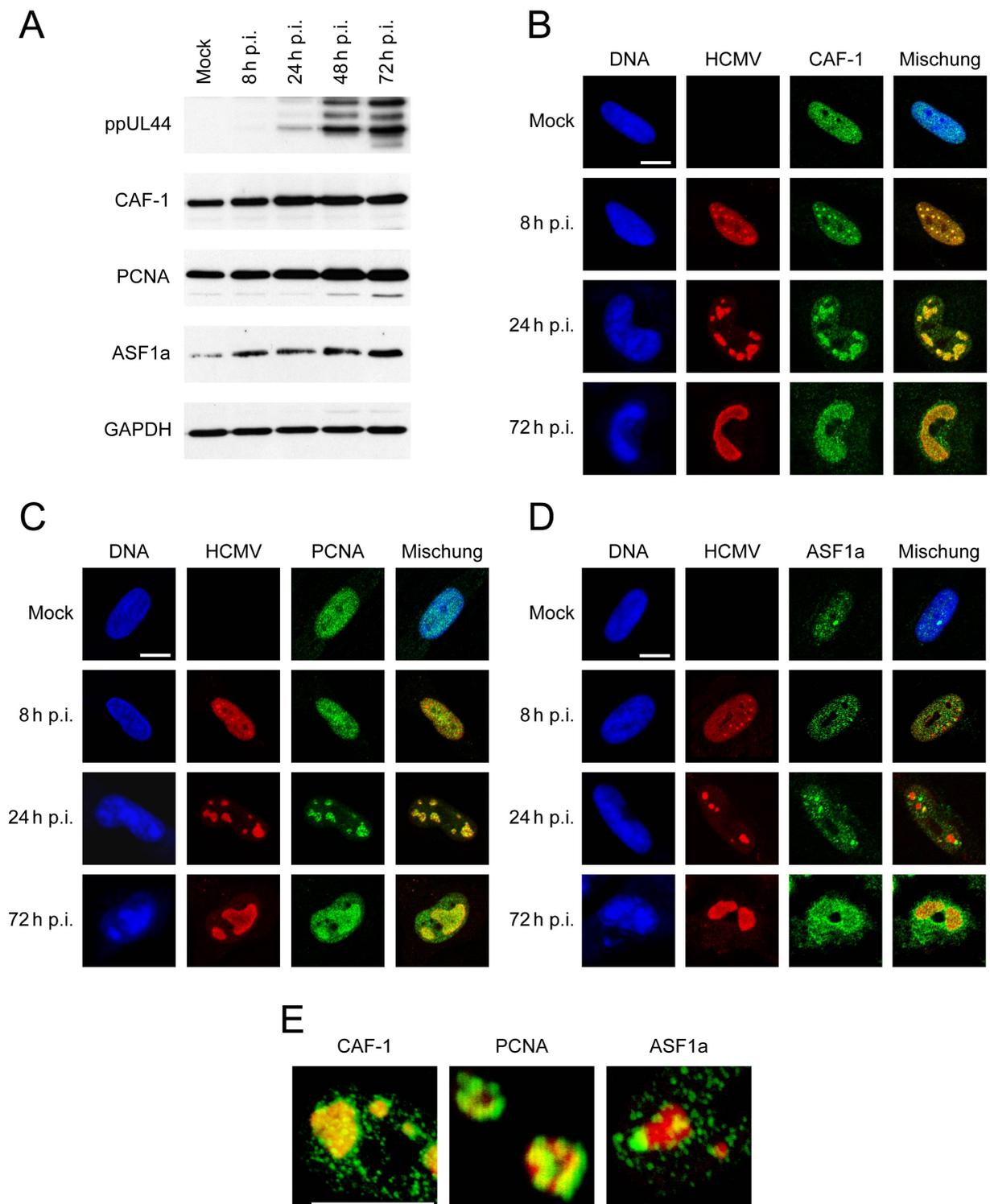


Abb. 3.12 Lokalisation zellulärer Komponenten der Chromatinisierungsmaschinerie

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden zu Gesamtzellextrakten verarbeitet und im Western Blot analysiert (A) bzw. fixiert und mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht (B – E). Es wurden jeweils die DNA (blau), die viralen Replikationszentren (8 h p.i. durch IE2, danach durch ppUL44 repräsentiert; rot) sowie eines der drei zellulären Proteine CAF-1, PCNA und ASF1a (grün) angefärbt. (E) zeigt Detailaufnahmen von Replikationszentren 24 h p.i. (3D-Projektion von Z-Stapeln, Schrittweite 0,38 μM , analysiert mit Zeiss LSM510-Software). Der Skalierungsstrich misst in (B – D) 10 μM , in (E) 1 μM . Die Western Blot-Analysen (A) wurden von Dr. Christina Paulus und Carla Winterling durchgeführt.

Transkriptionsrate oder die Stabilisierung der Proteine durch die Infektion hinweist. Durch die Immunfluoreszenz-Analysen lässt sich die Entstehung der viralen Replikationszentren über die Färbung von IE2 und später von ppUL44 nachvollziehen: Zunächst bilden sich mehrere kleine Zentren, die im Verlauf der Infektion größer werden und zusehends verschmelzen, bis nur noch ein Replikationszentrum übrig ist, das beinahe den gesamten Zellkern ausfüllt (siehe Abb. 3.12 B, C, D). Alle drei untersuchten zellulären Proteine zeigen in nicht infizierten Zellen ein feingepunktetes nukleäres Verteilungsmuster, ASF1a findet sich zusätzlich in einem bis drei größeren Komplexen. Während der Infektion findet eine Konzentration der drei Proteine im Bereich der viralen Replikationszentren und damit der viralen DNA statt – am deutlichsten sichtbar ist der Effekt 24 h p.i., wenn die Replikationszentren noch nicht zu einem einzigen verschmolzen sind. CAF-1 kolokalisiert schon ab 8 h p.i. mit den viralen Proteinen, PCNA und ASF1a erst ab 24 h p.i., d. h. mit Einsetzen der viralen DNA-Replikation. Während CAF-1 und PCNA eine sehr exakte Kolokalisation aufweisen, findet man ASF1a eher am Rand der Replikationszentren positioniert. Abb. 3.12 E zeigt ein vergrößertes Replikationszentrum 24 h p.i. in dreidimensionaler Aufnahme zur Illustration der Lokalisationsdetails: Die CAF-1-Färbung entspricht exakt der Position des Replikationszentrums, PCNA ist in mehreren länglichen Flecken lokalisiert, die auf der Oberfläche der Replikationszentren liegen und teilweise in sie hineinragen, und ASF1a befindet sich in enger Nachbarschaft zum Replikationszentrum. Während der lytischen Infektion sammeln sich also einige Komponenten, die an der DNA-Replikations-abhängigen Chromatinisierung beteiligt sind, in den viralen Replikationszentren an, während zudem ihre Gleichgewichtsmengen ansteigen. Diese zellulären Faktoren könnten daher an der Besetzung des HCMV-Genoms mit Nukleosomen beteiligt sein.

3.1.7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine umfassende Analyse der Chromatinisierung des HCMV-Genoms im Verlauf der lytischen Infektion durchgeführt. Dabei konnte mittels verschiedener Techniken (ChIP, MNase-Verdau, Psoralen-Quervernetzungsanalyse, FAIRE) gezeigt werden, dass das virale Genom sofort nach Eintritt in den Wirtszellkern mit Nukleosomen besetzt wird, wobei die Besetzungsdichte des zellulären Genoms nicht erreicht wird. Während diese initiale Chromatinisierung DNA-Replikations-unabhängig stattfindet, nimmt später im Infektionszyklus an den meisten viralen Loci die Histon-Besetzung DNA-Replikations-abhängig stark zu – Ausnahmen bilden hier die

regulatorisch bedeutsamen MIE P- sowie oriLyt-Loci. Noch später im Infektionsverlauf sinkt die Nukleosomen-Besetzung des HCMV-Genoms wieder deutlich ab. Mit der möglichen Beteiligung einiger zellulärer Faktoren der DNA-Replikations-abhängigen Chromatinisierungsmaschinerie an der zweiten Besetzungsphase der viralen DNA wurden erste Hinweise auf den zugrundeliegenden Mechanismus erbracht.

3.2 Histon-Modifikationen am HCMV-Genom während der lytischen Infektion

Nachdem die Chromatinisierung des HCMV-Genoms im Verlauf der lytischen Infektion unerwartet große Veränderungen und damit auch Regulationsmöglichkeiten aufwies, sollte auch der Einfluss posttranslationaler Histon-Modifikationen am viralen Chromatin untersucht werden. Dazu wurde das Modifikationsmuster durch ChIP-Experimente mit Modifikations-spezifischen Antikörpern analysiert (siehe 3.2.1, 3.2.2) und durch Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme zu manipulieren versucht. Die Inhibitoren wurden zunächst auf ihre Toxizität und antivirale Wirkung getestet (siehe 3.2.3), bevor ihr Einfluss auf das Modifikationsmuster untersucht wurde (siehe 3.2.4).

3.2.1 Histon-Modifikationsmuster am HCMV-Genom

Um einen ersten Überblick über das Histon-Modifikationsmuster am HCMV-Genom und seine Veränderungen im Verlauf der lytischen Infektion zu gewinnen, wurde der Acetylierungsgrad aller vier *core*-Histone zu Infektionsbeginn und 48 h p.i. bestimmt. Dazu wurden wachstumsarretierte MRC-5-Zellen durch ChIP mit Antikörpern gegen acetylierte Formen der *core*-Histone sowie gegen zentrale Bereiche der Histone analysiert, wobei letztere die Histone unabhängig von N-terminalen Modifikationen erkennen. Die *input ratio*-Werte für die acetylierten Histonformen wurden auf die Werte für die Gesamt-Histone sowie auf den jeweiligen GAPDH T-Wert normiert, was ein Maß für den Acetylierungsgrad der einzelnen Histone an den untersuchten HCMV-Loci im Vergleich zum zellulären Genom liefert (siehe Abb. 3.13). Aufgrund der unterschiedlichen ChIP-Effizienz der verwendeten Antikörper ist es nicht zulässig, die Werte für die verschiedenen Antikörper untereinander zu vergleichen. Daher lässt sich keine Aussage darüber treffen, welche Histone besonders stark acetyliert sind; lediglich der Vergleich zwischen den beiden Zeitpunkten und zwischen den untersuchten Loci ist möglich.

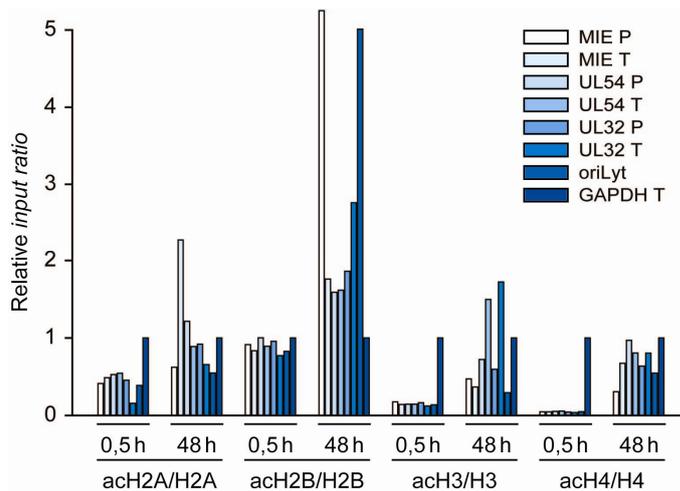


Abb. 3.13 Acetylierungsgrad der *core*-Histone

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden 0,5h und 48h p.i. mittels ChIP mit Antikörpern gegen die *core*-Histone H2A, H2B, H3 und H4 sowie deren acetylierte Formen (H2AK5ac, H2BK5/K12/K15/K20ac, H3K9/K14ac, H4K5/K8/K12/K16ac) analysiert. Die erhaltenen *input ratio*-Werte für die acetylierten Histone wurden auf die Werte der Gesamt-Histone sowie auf GAPDH T normiert und stellen somit ein Maß für den Acetylierungsgrad der *core*-Histone an den untersuchten viralen Loci im Vergleich zu GAPDH T dar.

Zunächst fällt auf, dass der Acetylierungsgrad der *core*-Histone zwischen 0,5h und 48h p.i. an allen viralen Loci im Vergleich zu GAPDH T deutlich ansteigt. Da das Experiment nur einmal durchgeführt wurde, handelt es sich bei den wenigen auffallend hohen Werten (etwa acH2B/H2B bei MIE P und oriLyt, 48h p.i.) wohl um Schwankungen infolge der Normierung kleiner Zahlenwerte, die nicht signifikant sein dürften. Desweiteren liegt der Acetylierungsgrad von H2A, H3 und H4 am HCMV-Genom zu Beginn der Infektion deutlich unter dem GAPDH T-Wert, während sich die Werte 48h p.i. annähern. Der H2B-Acetylierungsgrad an den viralen Loci entspricht hingegen schon 0,5h p.i. dem am zellulären Genom, später in der Infektion übersteigt er den GAPDH T-Wert sogar deutlich. Wegen der Bedeutung der Histon-Acetylierung für die Transkriptions-Aktivierung korrelieren die Daten mit der Tatsache, dass die untersuchten viralen Genombereiche zu Beginn der Infektion eher inaktiv sind, während sie sich nach Aktivierung des HCMV-Genoms (48h p.i.) bezüglich der Histon-Acetylierung dem konstitutiv aktiven Haushaltsgen GAPDH annähern. Als Nächstes wurde in Analogie zur H3-Besetzungsanalyse (siehe 3.1.4) die Assoziation des HCMV-Genoms mit posttranslational modifiziertem Histon H3 über den gesamten lytischen Infektionszyklus hinweg untersucht. Dazu wurden wachstumsarretierte MRC-5-Zellen in nicht infiziertem Zustand sowie zu neun Zeitpunkten zwischen 0,5h und 72h p.i. (MOI = 5 PFU/Zelle) durch ChIP untersucht. Zum Einsatz kamen Antikörper gegen zwei Transkriptions-aktivierende (H3K9/K14ac und H3K4me2) und eine Transkriptions-reprimierende (H3K9me2) Modifikation von Histon H3. Um die nur durch die Schwankungen der H3-Menge im Infektionsverlauf verursachten Veränderungen der Menge an modifiziertem Histon H3 auszugleichen, wurden die *input ratio*-Werte für die drei H3-Modifikationen jeweils auf die Gesamtmenge an Histon H3 normiert – die Daten sind in Abb. 3.14 als Kreisflächen und in Abb. 3.15 als Säulendiagramm dargestellt. Als Spezifitätskontrolle diente

eine Immunpräzipitation mit Kaninchen-Präimmunserum (rb IgG) – alle Werte, die durch Präzipitation mit den gegen modifiziertes H3 gerichteten Antikörpern generiert wurden, sind mindestens doppelt so hoch wie die mittels rb IgG erhaltenen. Auch hier ist aufgrund der unterschiedlichen CHIP-Effizienz kein Vergleich zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Antikörper möglich; daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche H3-Modifikation mengenmäßig dominiert.

Das H3-Modifikationsmuster des Haushaltsgens GAPDH bleibt im Verlauf der HCMV-Infektion weitgehend unverändert. Betrachtet man das Muster an einigen anderen zellulären Loci in nicht infizierten Zellen, so stellt man fest, dass die als transkriptionell aktiv angesehenen Genombereiche, also beide GAPDH T-Loci und der RPL30 T-Locus, im Vergleich relativ hohe Mengen der Transkriptions-aktivierenden Modifikationen H3K9/K14ac und H3K4me2 tragen, während die Menge an H3K9me2 nicht erhöht ist (siehe Abb. 3.14 B). Im Gegensatz dazu finden sich an den heterochromatischen Loci HBG P und Sat2 sowie am fakultativ heterochromatischen Locus MyoD T deutlich geringere Mengen der aktivierenden Modifikationen, dafür jedoch etwas erhöhte H3K9me2-Werte. Ein ähnliches Muster zeigt auch der TUBB T-Bereich, so dass das β -Tubulin-Gen in MRC-5-Zellen wohl als transkriptionell eher inaktiv angesehen werden muss, was sich innerhalb der Arbeitsgruppe durch mRNA-Analysen bestätigen ließ. Die Modifikationsmuster der zellulären Loci blieben während der Infektion im Wesentlichen unverändert, lediglich der fakultativ heterochromatische MyoD T-Locus wurde anscheinend durch die HCMV-Infektion aktiviert und zeigte dementsprechend einen ausgeprägten Anstieg der beiden Aktivierungs-Marker.

Unmittelbar nach dem Eintritt des HCMV-Genoms in den Wirtszellkern war das H3-Modifikationsmuster an allen untersuchten viralen Loci sehr einheitlich und ähnelte dem von zellulärem Heterochromatin. Im weiteren Verlauf der lytischen Infektion wandelt sich das Muster in Richtung Euchromatin, d. h. die Menge der Transkriptions-aktivierenden Modifikationen steigt an, während die des Transkriptions-reprimierenden Markers zurückgeht. Der Zeitpunkt des ersten deutlichen Anstiegs von H3K9/K14ac und H3K4me2 variiert zwischen den untersuchten Loci: am MIE zeigt sich schon 4h p.i. die erste Veränderung, während am UL54- bzw. UL32-Locus erst 16h bzw. 24h p.i. ein deutlicher Anstieg erkennbar wird – damit spiegeln die Zeitpunkte der epigenetischen Veränderung die kinetischen Klassen der drei verschiedenen viralen Gene wider. Im späteren Infektionsverlauf gleicht das Modifikationsmuster an weiten Teilen der untersuchten viralen Genombereiche dem des GAPDH T-Locus. Ausgenommen von diesem Wandel des Modifikationsmusters ist

der oriLyt-Bereich, der jedoch durch seine Funktion als Replikationsursprung eine Sonderrolle einnimmt – hier zeigt sich über die gesamte Infektion hinweg ein eher

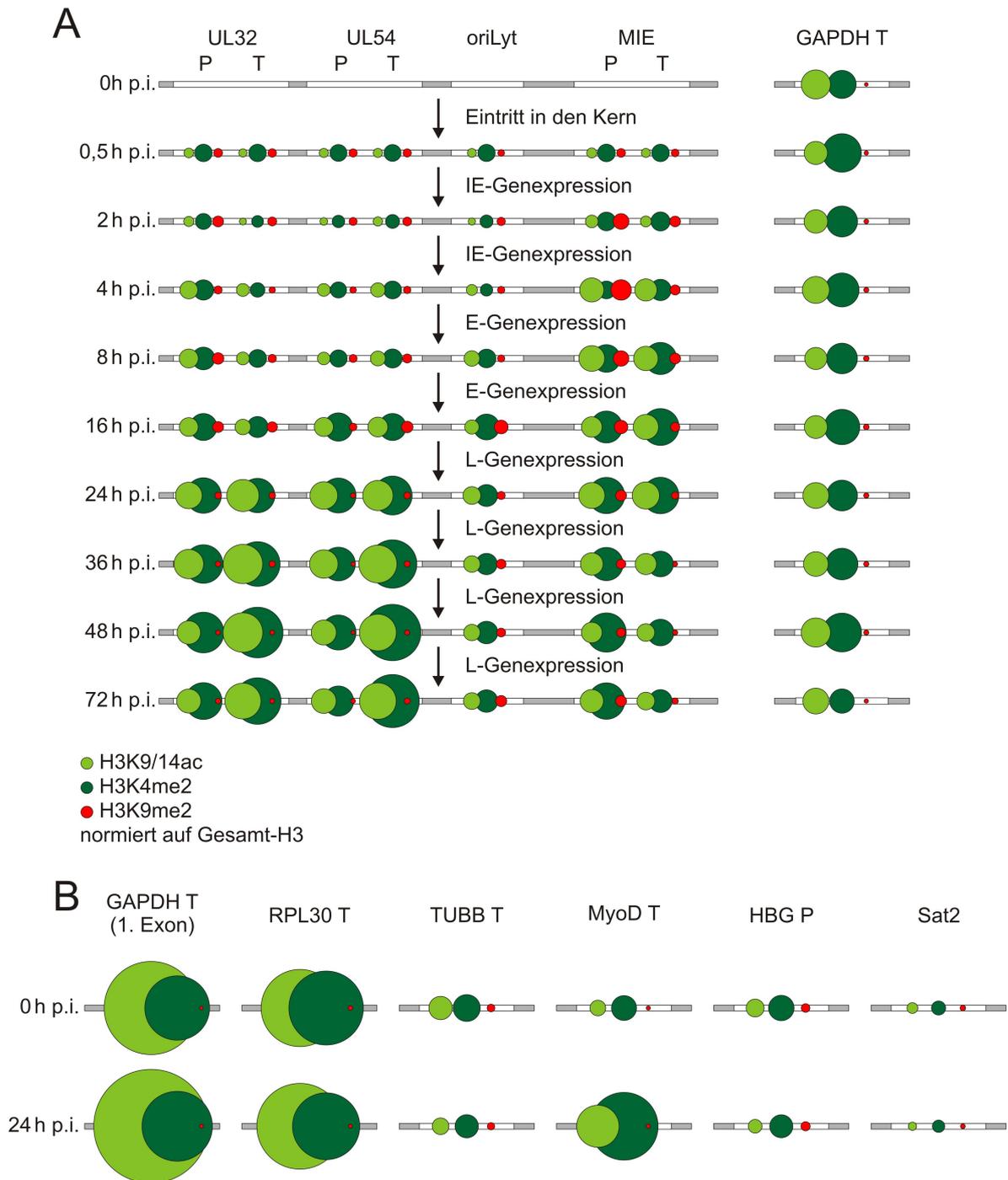


Abb. 3.14 H3-Modifikationen am viralen und zellulären Genom während der lytischen Infektion

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden in nicht infiziertem Zustand sowie zu den angegebenen Zeitpunkten nach HCMV-Infektion (MOI = 5 PFU/Zelle) mittels ChIP analysiert. Es kamen Antikörper gegen drei posttranslationale Histon H3-Modifikationen zum Einsatz, die erhaltenen *input ratio*-Werte sind für die Transkriptions-aktivierenden Modifikationen als hellgrüne (H3K9/K14ac) und dunkelgrüne (H3K4me2), für die Transkriptions-reprimierende Modifikation als rote (H3K9me2) Kreisflächen auf einem schematischen HCMV-Genom bzw. zellulären Genomteilen dargestellt. Die Werte für modifiziertes Histon H3 sind jeweils auf die H3-Gesamtmengen normiert (A). Die zellulären Kontroll-Loci wurden bis auf GAPDH T nur in nicht infizierten Zellen sowie 24 h p.i. untersucht (B).

heterochromatisch geprägtes Modifikationsmuster. Am Ende des Infektionszyklus (72 h p.i.) findet sich am oriLyt sowie am MIE P-Locus ein Anstieg der Transkriptions-reprimierenden H3K9me2-Modifikation, am MIE-Locus sinkt gleichzeitig auch das Niveau der beiden

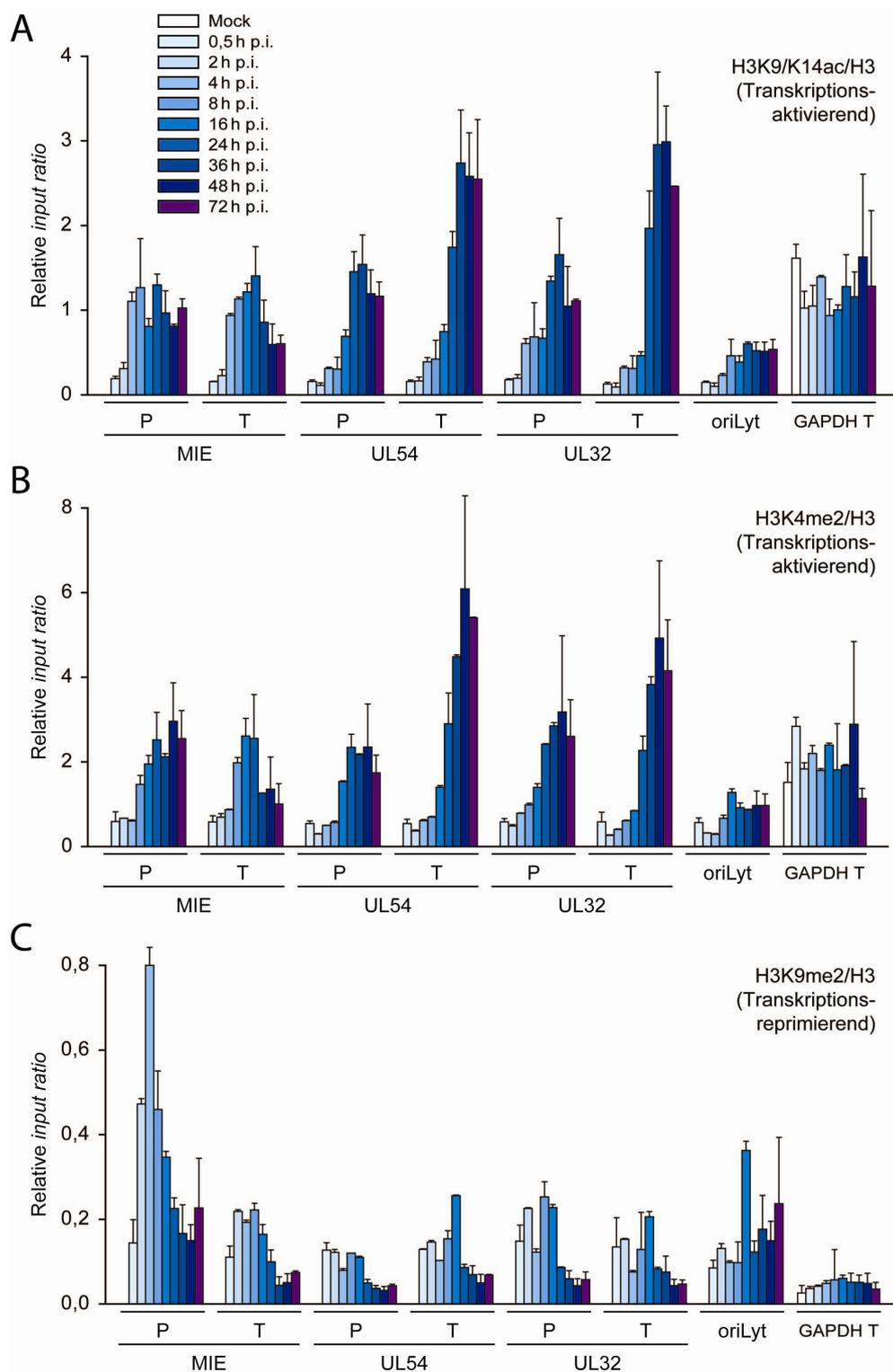


Abb. 3.15 H3-Modifikationen am viralen und zellulären Genom während der lytischen Infektion

Dieselben Daten wie in Abb. 3.14 A sind als Säulendiagramme dargestellt. (A) zeigt die Werte für H3K9/K14ac, (B) für H3K4me2 und (C) für H3K9me2 – jeweils normiert auf die Gesamt-Histon H3-Mengen.

Transkriptions-aktivierenden Modifikationen ab; beide Genombereiche besitzen eine IE2-Bindestelle, so dass die in der späten Infektionsphase beobachtete transkriptionelle Abschaltung des MIE-Bereichs, die gut zu dieser Veränderung der H3-Modifikation zu passen scheint, möglicherweise mit IE2 zusammenhängt. Auch früher in der Infektion verhält sich der MIE-Locus anders als die untersuchten *early*- und *late*-Gene. So gestaltet sich der Anstieg der Transkriptions-aktivierenden Marker am MIE-Gen zweiphasig, während der Anstieg beider Modifikationen ansonsten zeitgleich auftritt: 4 h p.i. steigt zunächst H3K9K14ac an, erst 8 h p.i. gefolgt von H3K4me2. Außerdem findet sich eine überraschend starke transiente Erhöhung der Transkriptions-reprimierenden H3K9me2-Modifikation mit einem Maximum 4 h p.i., die vielleicht durch eine zelluläre Abwehrreaktion ausgelöst wird. Möglicherweise betreffen die Transkriptions-aktivierenden und -reprimierenden Modifikationen zu diesem Zeitpunkt auch zwei verschiedene Populationen an HCMV-Genomen – z. B. Genome, die im Folgenden die lytische Infektion durchlaufen, und solche, die der zellulären Abwehr unterliegen und keine aktive Transkription mehr initiieren können. Das posttranslationale Histon-Modifikationsmuster durchläuft also an den meisten der untersuchten viralen Loci einen Wandel von heterochromatisch zu euchromatisch, d. h. die Transkriptions-aktivierenden Modifikationen wie H3K4me2 und Histon-Acetylierungen nehmen deutlich zu, während das Transkriptions-reprimierende H3K9me2 am viralen Genom zurückgeht. Der Zeitpunkt dieses epigenetischen Übergangs korreliert mit den kinetischen Klassen der untersuchten Gene. Generell ist jedoch am HCMV-Genom – vor allem am MIE P-Locus – eine im Vergleich zum zellulären Euchromatin erhöhte Menge an H3K9me2 zu finden, was auf inhibitorische Einflüsse z. B. durch zelluläre Abwehrmechanismen oder auch durch virale Regulation hindeutet.

3.2.2 Replikationsunabhängigkeit des Anstiegs der untersuchten H3-Modifikationen

Da ein Großteil des Anstiegs der posttranslationalen Modifikationen an Histon H3 zeitlich mit der viralen DNA-Replikation zusammenfällt, sollte als Nächstes untersucht werden, ob tatsächlich ein Zusammenhang besteht – etwa wenn die während der DNA-Replikation neu am HCMV-Genom auftauchenden Histone zu einem hohen Anteil modifiziert sind. Dazu wurden wachstumsarretierte MRC-5-Zellen mit HCMV infiziert (MOI = 5 PFU/Zelle), zum Teil mit PAA behandelt, um die virale DNA-Replikation zu unterbinden, und 48 h p.i. mittels ChIP mit Antikörpern gegen Histon H3, H3K9/K14ac, H3K4me2 und H3K9me2 analysiert. Die *input ratio*-Werte für die H3-Modifikationen wurden jeweils auf die Werte von Histon H3

normiert, um die durch PAA verursachten Schwankungen der H3-Besetzung auszugleichen (siehe Abb. 3.16). Nach Normierung der viralen DNA-Menge auf die zelluläre zeigt sich deutlich die Inhibition der viralen DNA-Replikation durch PAA (siehe Abb. 3.16 A). Sofern tatsächlich ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Transkriptions-aktivierenden H3-Modifikationen und der DNA-Replikation vorliegt, wäre nach PAA-Behandlung ein Absinken der Modifikationen im Vergleich zur Kontrollprobe zu erwarten. Der Acetylierungsgrad von Histon H3 steigt durch die PAA-Behandlung an allen untersuchten viralen und zellulären Loci allerdings deutlich an (siehe Abb. 3.16 B) – eine Hyperacetylierung der während der DNA-Replikation neu hinzugekommenen Histon H3-Moleküle ist daher wohl eher nicht die Ursache für den Acetylierungsanstieg im Laufe der Infektion. Möglicherweise beeinflusst PAA aber neben der viralen DNA-Replikation noch

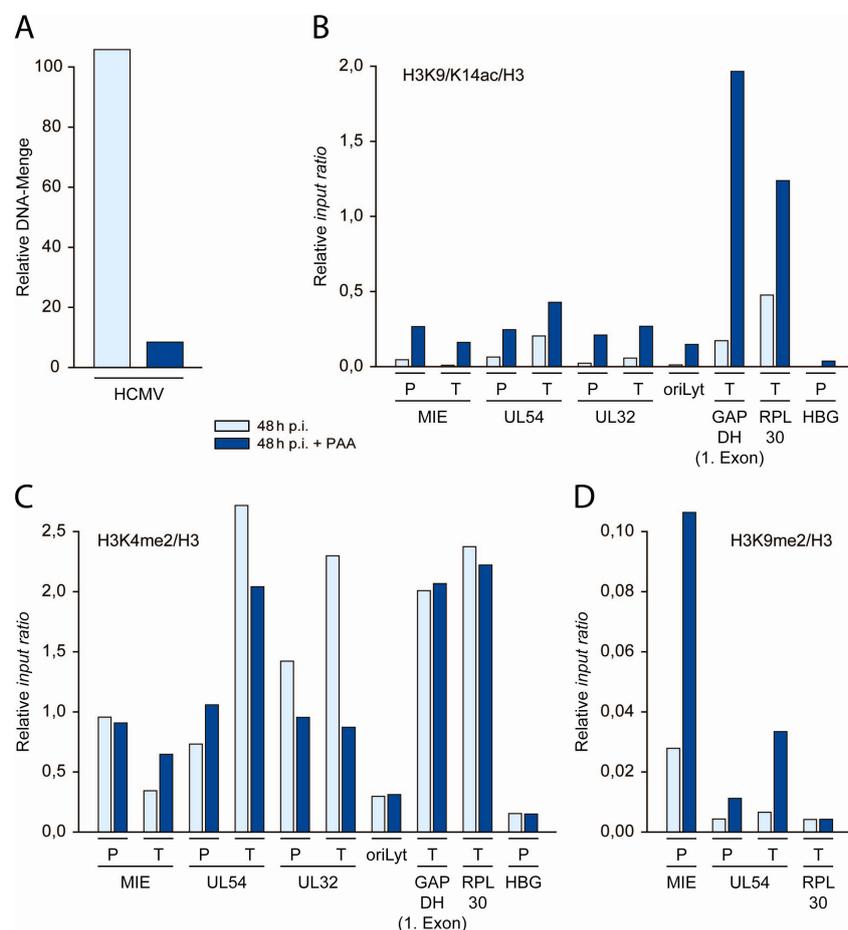


Abb. 3.16 DNA-Replikationsunabhängigkeit des Anstiegs der H3-Modifikationen

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden mit HCMV infiziert (MOI = 5 PFU/Zelle) und mit und ohne PAA-Behandlung 48 h p.i. durch ChIP analysiert. (A) zeigt den Mittelwert der viralen DNA-Menge über alle untersuchten viralen Loci normiert auf den Mittelwert der zellulären DNA-Menge mit und ohne PAA-Behandlung. In (B), (C) und (D) sind die *input ratio*-Werte von H3K9/K14ac, H3K4me2 und H3K9me2 jeweils normiert auf die Gesamt-H3-Werte für Zellen mit und ohne PAA-Behandlung dargestellt. Aufgrund der mangelnden ChIP-Effizienz der verwendeten anti-H3K9me2-Antikörper-Charge wurden für (D) nur vier ausgewählte Loci analysiert.

andere Prozesse in der Zelle und führt auf diese Weise eine generelle Hyperacetylierung von H3 sowohl am viralen als auch am zellulären Genom herbei. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass dieser PAA-Nebeneffekt einen womöglich durch die Inhibition der DNA-Replikation verursachten Abfall des Acetylierungsgrades am viralen Genom maskiert – zumal der Acetylierungsanstieg an den viralen Loci deutlich schwächer ausfällt als an den zellulären. Auch die Menge an H3K4me2 normiert auf H3 sinkt nach PAA-Behandlung nicht generell signifikant ab: An vielen viralen Loci kann ein Ansteigen bzw. ebenso wie an den zellulären Kontroll-Loci ein Gleichbleiben des Modifikationsgrades beobachtet werden (siehe Abb. 3.16 C). Am UL54 T- und vor allem am UL32-Locus sinkt der Methylierungsgrad hingegen deutlich ab – ein Zusammenhang mit der E/L- bzw. L-Kinetik dieser beiden Gene kann nicht ausgeschlossen werden: Durch die PAA-bedingte Inhibition der viralen DNA-Replikation sollte die Transkription der L-Gene dramatisch zurückgehen – möglicherweise schlägt sich diese Tatsache auch im Modifikationsmuster der entsprechenden Loci nieder. Für die Methylierung von H3 an Lysin 4 scheint also – unter Umständen mit Ausnahme der L-Gene – ebenfalls keine DNA-Replikations-Abhängigkeit vorzuliegen. Der Methylierungsgrad von Histon H3 an Lysin 9 steigt während der viralen DNA-Replikation mit Ausnahme des MIE P- und des oriLyt-Locus nicht an, so dass ein Zusammenhang mit der DNA-Replikation nicht wahrscheinlich ist (vgl. Abb. 3.15). Durch PAA-Behandlung steigt der Methylierungsgrad an den untersuchten viralen Loci hingegen deutlich an, während am zellulären RPL30 T-Locus keine Änderung eintritt (siehe Abb. 3.16 D). Eine Erklärungsmöglichkeit wäre die erhöhte Effizienz eines potentiellen zellulären epigenetischen Abwehrsystems, das seine Aktivität nach Hemmung der viralen DNA-Replikation nur noch auf die verminderte Anzahl von HCMV-Genomen aufteilen muss (vgl. auch Groves *et al.*, 2009).

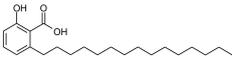
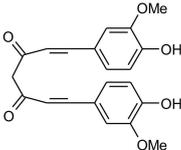
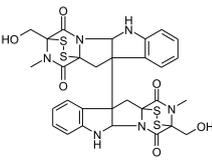
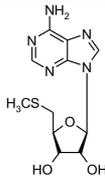
Die Analyse des H3-Modifikationsmusters am HCMV-Genom mit und ohne PAA-Behandlung erbrachte also keine Hinweise auf eine generelle Abhängigkeit des Anstiegs der Transkriptions-aktivierenden H3-Modifikationen während der lytischen Infektion von der viralen DNA-Replikation.

3.2.3 Antivirale Effekte von Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme

Nachdem die Untersuchung einiger Histon-Modifikationen am viralen Genom Möglichkeiten der epigenetischen Regulation des lytischen HCMV-Infektionszyklus aufgezeigt hatte, sollte nun versucht werden, die korrekte Ausbildung dieser Modifikationsmuster durch den Einsatz

von Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme zu unterbinden und auf diese Weise womöglich die virale Replikation zu behindern. Zum Einsatz kamen **Anacardinsäure** (Bestandteil der Cashewnuss-Schale), **Curcumin** (Bestandteil des Gewürzes Kurkuma), **Chaetocin** (Toxin des Pilzes *Chaetomium minutum*) und 5'-Deoxy-5'-(methylthio)adenosin (**MTA**; Nebenprodukt der zellulären Polyaminsynthese) – zur Übersicht siehe Tabelle 3.1. Anacardinsäure und Curcumin inhibieren Histon-Acetyltransferasen: Anacardinsäure p300 und PCAF, Curcumin hingegen p300 und CBP, jedoch nicht PCAF und Gcn5 (Balasubramanyam *et al.*, 2003; Marcu *et al.*, 2006). Chaetocin inhibiert spezifisch die SUV39H-Methyltransferase und damit die Methylierung von Histon H3 an Lysin 9 (Greiner *et al.*, 2005). MTA ist ein genereller Inhibitor der Protein-Methylierung und wurde eingesetzt, um die Methylierung von Histon H3 an Lysin 4 zu manipulieren (Avila *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2006).

Tabelle 3.1 Übersicht der verwendeten Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme

Name	Anacardinsäure	Curcumin	Chaetocin	MTA
Strukturformel				
Ziel-Enzyme	p300, PCAF	p300, CBP	SUV39H	Methyltransferasen
IC ₅₀ -Werte	8,5 μM, 5 μM	25 μM	0,8 μM	-

Zunächst wurde die für MRC-5-Zellen subtoxische Inhibitor-Konzentration ermittelt, indem wachstumsarretierte MRC-5-Zellen für 1 h mit den Inhibitoren vorbehandelt, für 2 h in Anwesenheit der Inhibitoren mit HCMV infiziert (MOI = 0,5 PFU/Zelle), mit Inhibitorhaltigem Medium (ein Wechsel 24 h p.i.) weiterinkubiert und 48 h p.i. mittels eines kommerziellen Tests durch Messung des Redoxpotentials auf ihre Stoffwechselaktivität untersucht wurden (siehe 2.4.5). Auch nicht infizierte Zellen (Mock) wurden nach dem gleichen Schema mit den Inhibitoren behandelt. Die gemessenen OD-Werte korrelieren mit der Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen; sie wurden für jeden Inhibitor auf den Messwert der DMSO-behandelten nicht infizierten Zellen normiert (siehe Abb. 3.17).

Bei keinem der vier Inhibitoren konnte eine signifikante Verminderung der Zellstoffwechselaktivität ermittelt werden, d. h. der toxische Bereich wurde offenbar nicht erreicht. Der deutliche Anstieg der Werte mit steigender Curcumin-Konzentration liegt in der gelben Farbe

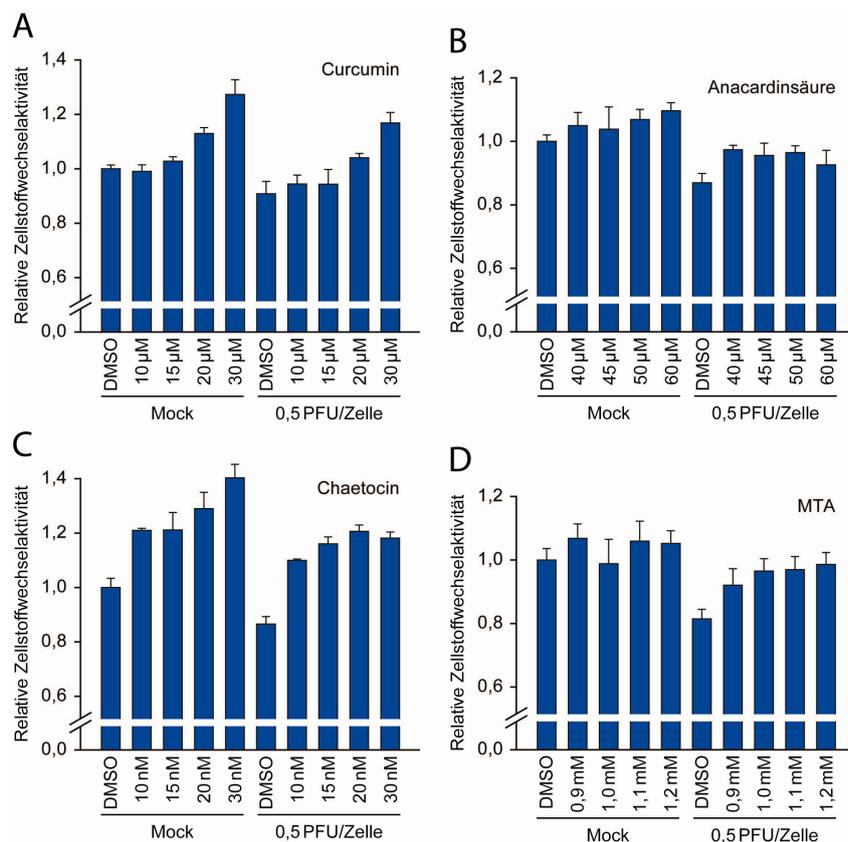


Abb. 3.17 Cytotoxizität der verwendeten Inhibitoren

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an Curcumin (A), Anacardinsäure (B), Chaetocin (C) und MTA (D) behandelt, in Anwesenheit der Inhibitoren mit HCMV infiziert (MOI = 0,5 PFU/Zelle) bzw. uninfiziert belassen und bis 48 h p.i. weiter mit den Inhibitoren behandelt (Mediumwechsel 24 h p.i.). Die DMSO-Konzentration wurde jeweils konstant gehalten (0,66% [v/v] bei (A, C), 0,96% [v/v] bei (B) und 1% [v/v] bei (D)). 48 h p.i. wurde die Zellstoffwechsellaktivität mittels eines kommerziellen Tests ermittelt – die gemessenen OD-Werte wurden für jeden Inhibitor auf den Messwert der nicht infizierten DMSO-behandelten Kontrollprobe normiert.

der Substanz mitbegründet, welche die OD-Messung in hohen Konzentrationen verfälscht. Für die folgenden Experimente wurde jeweils nicht die höchste subtoxische Konzentration gewählt, um durch experimentelle Schwankungen nicht doch in toxische Bereiche zu gelangen – in Tests mit höherer MOI (5 PFU/Zelle) war mit 30 μM Curcumin und 40 nM Chaetocin bereits ein deutlicher Rückgang der Zellstoffwechselrate festgestellt worden (Daten nicht gezeigt); um toxischen Effekten durch DMSO vorzubeugen, sollte die Konzentration von 1% [v/v] DMSO im Medium nicht überschritten werden. Aufgrund dieser Daten sowie der mikroskopischen Analyse der Zellmorphologie wurden die folgenden Inhibitor-Konzentrationen für weitere Experimente ausgewählt: Curcumin und Chaetocin 15 μM bzw. 15 nM mit je 0,66% [v/v] DMSO, Anacardinsäure und MTA 45 μM bzw. 1,1 mM mit je 0,92% [v/v] DMSO. In der Literatur finden sich IC_{50} -Werte bezüglich der Hemmung der entsprechenden Histon-modifizierenden Enzyme von 25 μM für Curcumin (Balasubra-

manyam *et al.*, 2004), 8,5 μM bzw. 5 μM (getrennt angegeben für p300 bzw. PCAF) für Anacardinsäure (Balasubramanyam *et al.*, 2003) und 0,8 μM für Chaetocin (Greiner *et al.*, 2005) – MTA wurde für Experimente mit HSV in Konzentrationen von 1 mM erfolgreich eingesetzt (Huang *et al.*, 2006). Die für Curcumin und MTA ausgewählten Konzentrationen korrelieren also größenordnungsmäßig mit den Literaturwerten, die Konzentration für Anacardinsäure liegt etwas darüber; bei Vergleichen mit IC_{50} -Werten muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Chemikalien möglicherweise nicht gleich effizient in die Zellen eindringen können – zudem besteht die Möglichkeit, dass ein Teil der Inhibitoren durch Serumproteine im Zellkulturmedium gebunden wird. Bei Chaetocin konnte die IC_{50} -Konzentration bei weitem nicht erreicht werden, was vermutlich mit zum vergleichsweise schwachen antiviralen Effekt beiträgt (siehe Abb. 3.18) – hier limitiert die Cytotoxizität die Einsatzmöglichkeiten der Substanz. Insgesamt konnten aber trotz der Abweichungen von den

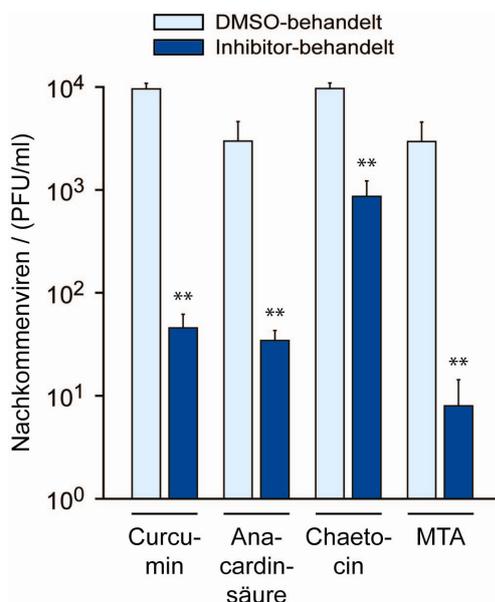


Abb. 3.18 Einfluss der untersuchten Inhibitoren auf die Produktion infektiöser Nachkommenviren

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden für 1 h mit Curcumin (15 μM , 0,66% [v/v] DMSO), Anacardinsäure (45 μM , 0,92% [v/v] DMSO), Chaetocin (15 nM, 0,66% [v/v] DMSO) und MTA (1,1 mM, 0,92% [v/v] DMSO) vorbehandelt, für 2 h in Anwesenheit der Inhibitoren mit HCMV infiziert (MOI = 0,5 PFU/Zelle) und bis 48 h p.i. mit den Inhibitoren weiterbehandelt (Mediumwechsel 24 h p.i.). 96 h p.i. wurde der Überstand abgenommen und mittels Plaque-Test die Menge an infektiösen Nachkommenviren ermittelt. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Inhibitor-Behandlung (DMSO). ** = $p < 0,01$ (Student-t-Test)

Literaturwerten unter den gewählten Bedingungen deutliche antivirale Effekte erzielt werden, so dass die Inhibitorkonzentrationen auf jeden Fall im wirksamen Bereich lagen.

Die Untersuchung des antiviralen Effekts der vier Inhibitoren erfolgte mittels Quantifizierung der Nachkommenviren aus infizierten Inhibitor-behandelten Zellen. Dazu wurden wachstumsarretierte MRC-5-Zellen in je drei 12-wells pro Ansatz genau wie für die Cytotoxizitäts-Tests beschrieben mit den Inhibitoren behandelt und mit HCMV infiziert; um die Infektionsbedingungen in den unterschiedlichen Ansätzen möglichst konstant zu halten, wurde nach der Infektion ein Waschschriff mit Citrat-Puffer durchgeführt, der nicht internalisierte Virionen auf der Zelloberfläche inaktiviert (siehe 2.4.3). Da die Cytotoxizität nur für diesen Zeitraum getestet worden war, wurden die Inhibitoren 48 h p.i. entfernt, 96 h p.i. erfolgte die Ernte des Überstandes. Die Menge an enthaltenen infektiösen

Nachkommenviren wurde mittels Plaque-Test ermittelt (siehe 2.4.4). Im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrollprobe zeigt sich bei allen vier Inhibitoren ein deutlicher antiviraler Effekt: Curcumin vermindert die Menge an infektiösen Nachkommenviren um Faktor 210, Anacardinsäure etwa um Faktor 80, Chaetocin etwa um Faktor 10 und MTA sogar um Faktor 370 (siehe Abb. 3.18). Damit haben alle untersuchten Substanzen auch in den gewählten teilweise niedrigen Konzentrationen einen deutlichen inhibitorischen Einfluss auf die virale Replikation in MRC-5-Zellen.

Durch die Untersuchung der Menge an infektiösen Nachkommenviren wird nur das Endergebnis der viralen Replikation ermittelt, es kann nicht bestimmt werden, zu welchem Zeitpunkt des lytischen Infektionszyklus die Beeinträchtigung stattfindet. Dieser Aspekt des antiviralen Effekts sollte durch Analyse der viralen DNA-Replikation und Genexpression genauer beleuchtet werden.

Die Menge an viraler DNA in DMSO- und Inhibitor-behandelten Zellen wurde 24h und 48h p.i. im Zuge der später beschriebenen ChIP-Experimente (siehe 3.2.4) ermittelt und jeweils auf die Menge zellulärer DNA normiert, um ein Maß für die Anzahl viraler Genome pro Zelle zu erhalten (siehe Abb. 3.19). Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den Inhibitoren: Kurz nach Beginn der viralen DNA-Replikation (24h p.i.) ist die virale

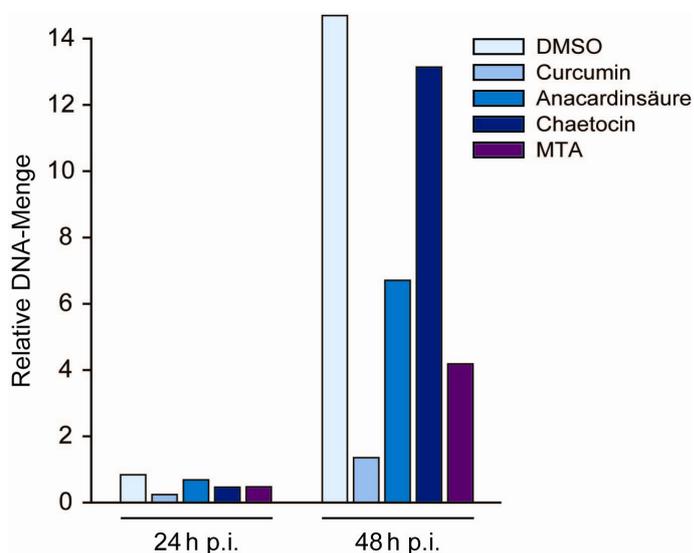


Abb. 3.19 Einfluss der untersuchten Inhibitoren auf die virale DNA-Replikation

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden für 1 h mit DMSO (0,92% [v/v]), Curcumin (15 μ M, 0,66% [v/v] DMSO), Anacardinsäure (45 μ M, 0,92% [v/v] DMSO), Chaetocin (15 nM, 0,66% [v/v] DMSO) und MTA (1,1 mM, 0,92% [v/v] DMSO) vorbehandelt, für 2 h in Anwesenheit der Inhibitoren infiziert (MOI = 0,5 PFU/Zelle) und mit Inhibitor-haltigem Medium weiterinkubiert (Mediumwechsel 24 h p.i.). 24 h und 48 h p.i. wurde die virale DNA-Menge ermittelt und auf die zelluläre DNA-Menge normiert.

DNA-Menge vor allem in den Curcumin-behandelten Zellen leicht verringert – dieser Effekt verstärkt sich 48 h p.i. dramatisch. Auch Anacardinsäure und MTA inhibieren die virale DNA-Replikation merklich, während Chaetocin nur geringen Einfluss ausübt. Dieser Befund passt zu den Mengen an infektiösen Nachkommenviren (siehe Abb. 3.18): Auch hier beeinträchtigt Chaetocin die virale Replikation am wenigsten, Anacardinsäure und vor allem MTA haben einen deutlich stärkeren inhibitorischen Effekt.

Allerdings stört Curcumin trotz nahezu komplett inhibierter viraler DNA-Replikation die Bildung von Nachkommenviren nur bedingt – der antivirale Effekt der untersuchten Substanzen muss also zumindest teilweise noch in anderen Wirkungen begründet liegen.

Der Zeitpunkt des Eingreifens der verschiedenen Inhibitoren in den viralen Replikationszyklus sollte durch Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen Vertreter der drei kinetischen Klassen näher untersucht werden. Dazu wurden wachstumsarretierte MRC-5-Zellen für 1 h mit den vier Inhibitoren und DMSO vorbehandelt, für 2 h in Anwesenheit der Inhibitoren mit HCMV infiziert (MOI = 0,5 PFU/Zelle), bis 48 h p.i. weiter mit den Inhibitoren inkubiert (Mediumwechsel 24 h p.i.) und unmittelbar nach der Vorbehandlung (Mock) sowie 2 h, 8 h, 24 h und 48 h p.i. zu Gesamtzellextrakten verarbeitet (siehe 2.3.1). Die Proben wurden durch SDS-PAGE und nachfolgenden Western Blot mit Antikörpern gegen die viralen Proteine IE1 (*immediate early*), ppUL44 (*early*) und pp28 (*late*) analysiert; Tubulin diente als Ladekontrolle (siehe Abb. 3.20). Alle fünf Blots wurden jeweils parallel behandelt und die Signale mit demselben Röntgenfilm detektiert, um zwischen den Blots vergleichbare Signalintensitäten zu erzeugen. Die Tubulinmengen sind sowohl innerhalb der einzelnen Zeitverläufe als auch zwischen den fünf Proben sets weitgehend konstant, so dass von einer vergleichbaren Probenmenge ausgegangen werden kann. Die DMSO-behandelten

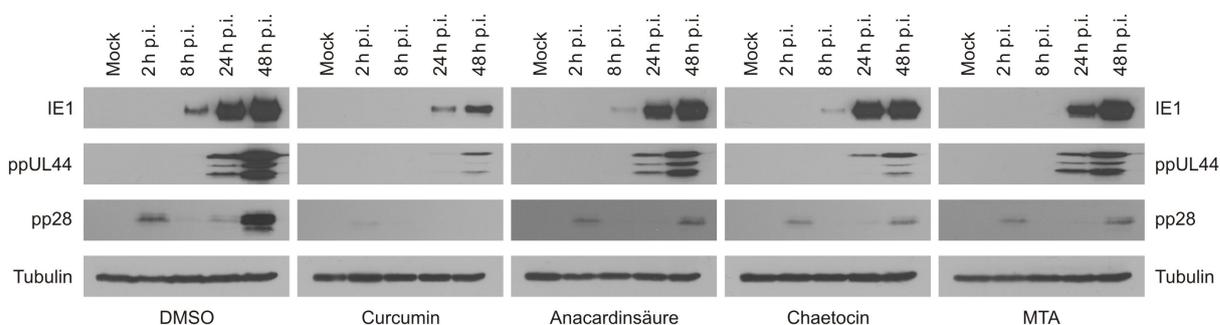


Abb. 3.20 Einfluss der untersuchten Inhibitoren auf die Gleichgewichtsmengen viraler Proteine

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden für 1 h mit DMSO (0,92% [v/v]), Curcumin (15 μ M, 0,66% [v/v] DMSO), Anacardinsäure (45 μ M, 0,92% [v/v] DMSO), Chaetocin (15 nM, 0,66% [v/v] DMSO) und MTA (1,1 mM, 0,92% [v/v] DMSO) vorbehandelt, für 2 h in Anwesenheit der Inhibitoren mit HCMV infiziert (MOI = 0,5 PFU/Zelle), bis 48 h p.i. weiter mit den Inhibitoren inkubiert (Mediumwechsel 24 h p.i.) und nach der Vorbehandlung (Mock) sowie 2 h, 8 h, 24 h und 48 h p.i. zu Gesamtzellextrakten verarbeitet und mittels Western Blot mit Antikörpern gegen IE1, ppUL44, pp28 und Tubulin analysiert. Der Röntgenfilm wurde gleichzeitig auf alle fünf Blots aufgelegt, um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten.

Proben zeigen den erwarteten Verlauf der HCMV-Infektion: Das IE1-Protein ist erstmals 8 h p.i. nachweisbar, ppUL44 erst 24 h p.i.; die Gleichgewichtsmengen beider Proteine steigen im weiteren Infektionsverlauf deutlich an. Das pp28-Protein ist Bestandteil des Virions und daher schon zu Beginn der Infektion nachzuweisen, bevor es wieder abgebaut wird – im Zuge der Infektion neu gebildetes pp28 ist 24 h und in verstärktem Maße 48 h p.i. zu erkennen.

Vergleicht man die Protein-Gleichgewichtsmengen der Inhibitor-behandelten Proben mit denen der DMSO-behandelten, so stellt man in allen Stadien der Infektion eine deutliche Verringerung der Mengen aller drei viralen Proteine fest. Die Störung der viralen Replikation scheint bei Anacardinsäure und Chaetocin eher im späten Stadium der Infektion zu liegen, da die Gleichgewichtsmengen von IE1 noch wenig beeinträchtigt sind, während ppUL44 und pp28 zunehmend stärker von der Inhibition betroffen sind. Bei Curcumin und MTA sind schon die IE1-Mengen stark reduziert und diese Beeinträchtigung setzt sich im weiteren Infektionsverlauf fort, sei es aufgrund der anhaltenden Wirkung der Inhibitoren oder aufgrund der verminderten Menge an transaktivierenden IE-Proteinen.

Der antivirale Effekt der vier untersuchten Inhibitoren schlägt sich also in verringerten Mengen von HCMV-DNA sowie in verringerten Gleichgewichtsmengen von Proteinen aller kinetischen Klassen über den gesamten Infektionsverlauf hinweg nieder, woraufhin auch die Produktion infektiöser Nachkommenviren stark beeinträchtigt wird. Der inhibitorische Effekt von Curcumin und MTA beginnt schon früh in der Infektion und pflanzt sich in ihrem weiteren Verlauf fort, während Anacardinsäure und Chaetocin eher in spätere Infektionsstadien einzugreifen scheinen.

3.2.4 Einfluss der untersuchten Inhibitoren auf das Histon H3-Modifikationsmuster

Da Curcumin, Anacardinsäure, Chaetocin und MTA allesamt Histon-modifizierende Enzyme inhibieren (vgl. Tabelle 3.1), könnten Störungen im Histon-Modifikationsmuster am HCMV-Genom die Ursache für die beobachteten antiviralen Effekte sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das Histon H3-Modifikationsmuster in HCMV-infizierten MRC-5-Zellen (MOI = 0,5 PFU/Zelle) nach Behandlung mit den vier Inhibitoren bzw. DMSO durch ChIP analysiert. Zunächst wurden die gleichen Modifikationen untersucht wie schon für die Infektionsverlaufsanalyse (vgl. Abb. 3.14). Wie schon bei den vorhergegangenen Experimenten wurden die wachstumsarretierten Zellen für 1 h mit den Inhibitoren vorbehandelt, für 2 h in Anwesenheit der Inhibitoren infiziert, mit Inhibitor-haltigem Medium weiterinkubiert (Mediumwechsel 24 h p.i.) und 8 h bzw. 48 h p.i. durch ChIP mit Antikörpern gegen Histon H3 und seine modifizierten Formen untersucht. Aufgrund der niedrigen MOI in diesen Experimenten konnten die H3K9/K14ac- und H3K9me2-Mengen 8 h p.i. nicht ausgewertet werden, allerdings treten die meisten auffälligen Veränderungen im Modifikationsmuster auch erst später als 8 h p.i. auf (vgl. Abb. 3.14). Von Experimenten bei einer MOI von 5 PFU/Zelle wurde wegen des unter diesen Bedingungen deutlich schwächeren

antiviralen Effekts der vier Inhibitoren (nur 1,5- bis 3-fach verringerte Menge an Nachkommenviren, Daten nicht gezeigt) abgesehen.

Zunächst wurden die Auswirkungen von Curcumin und Anacardinsäure auf die H3K9/K14ac-Menge, von MTA auf die H3K4me2-Menge sowie von Chaetocin auf die H3K9me2-Menge normiert auf Histon H3 analysiert, indem jeweils der Durchschnitt aus den Werten von 5 zellulären und 7 viralen Loci ermittelt wurde (siehe Abb. 3.21). Die Behandlung mit Curcumin und Anacardinsäure ließe erwarten, dass der in Abb. 3.15 gezeigte Anstieg des H3-Acetylierungsgrades während der lytischen HCMV-Infektion geringer ausfällt. Tatsächlich findet man in Curcumin-behandelten Zellen sowohl am viralen als auch am zellulären Genom im Durchschnitt geringere H3K9/K14ac-Werte als in DMSO-behandelten Zellen. Der Einsatz von Anacardinsäure hingegen erbrachte im Mittel keine Veränderung des Acetylierungsgrades (siehe Abb. 3.21 A). Damit ergibt sich für die beiden Acetyltransferase-Inhibitoren kein eindeutiger Trend für das virale Genom, obwohl eine Locus-spezifische Wirkung der Substanzen möglich bleibt. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen den Veränderungen im Histon H3-Modifikationsmuster am HCMV-Genom und der gestörten viralen Replikation kann zwar trotzdem bestehen, vermutlich wirken die beiden Substanzen aber hauptsächlich durch andere Mechanismen.

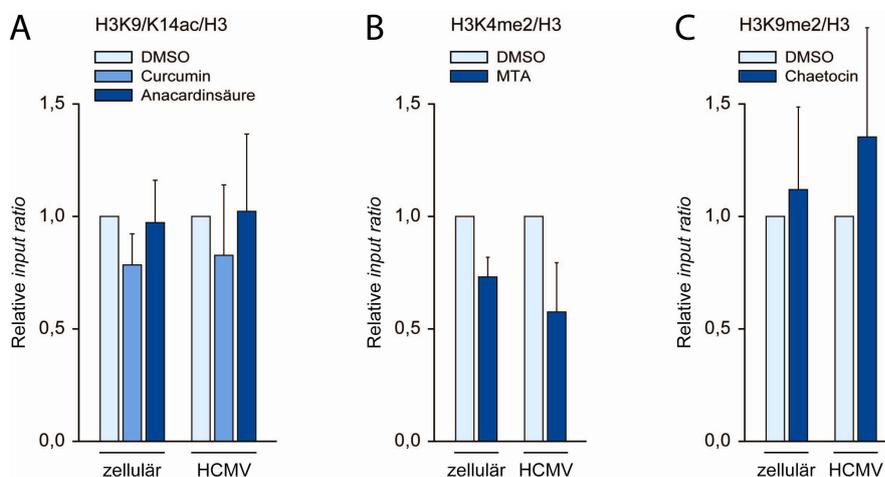


Abb. 3.21 Einfluss der untersuchten Inhibitoren auf das Histon H3-Modifikationsmuster

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden für 1 h mit DMSO (0,92% [v/v]), Curcumin (15 μ M, 0,66% [v/v] DMSO), Anacardinsäure (45 μ M, 0,92% [v/v] DMSO) (A), MTA (1,1 mM, 0,92% [v/v] DMSO) (B) und Chaetocin (15 nM, 0,66% [v/v] DMSO) (C) vorbehandelt, für 2 h in Anwesenheit der Inhibitoren mit HCMV infiziert (MOI = 0,5 PFU/Zelle), bis 48 h p.i. weiter mit den Inhibitoren inkubiert (Mediumwechsel 24 h p.i.) und durch ChIP mit Antikörpern gegen Histon H3, H3K9/K14ac, H3K4me2 und H3K9me2 analysiert. Die *input ratio*-Werte von H3K9/K14ac (A), H3K4me2 (B) und H3K9me2 (C) sind jeweils normiert auf die Gesamt-H3-Werte dargestellt; es ist der Mittelwert aus 5 zellulären und 7 viralen Loci abgebildet, wobei die DMSO-Werte jeweils gleich 1 gesetzt wurden.

Die inhibitorische Wirkung von MTA auf Methyltransferasen lässt analog zu den Acetyltransferase-Inhibitoren vermuten, dass nach MTA-Behandlung der Anteil von an Lysin 4 dimethyliertem Histon H3 an der H3-Gesamtmenge geringer ausfällt als in DMSO-behandelten Kontrollzellen. Tatsächlich sank der Methylierungsgrad am HCMV-Genom deutlich ab, sogar noch etwas stärker als an den zellulären Loci (siehe Abb. 3.21 B).

Die Behandlung mit Chaetocin führte sowohl am zellulären als auch in verstärktem Maße am viralen Genom zu einem deutlichen Anstieg der Transkriptions-reprimierenden H3K9me2-Modifikation pro Gesamt-H3 (siehe Abb. 3.21 C). Dieser Effekt könnte zwar durchaus zur Inhibition der viralen Replikation beitragen, muss aber – da SUV39H die Tri-, nicht aber die Dimethylierung von H3 an Lysin 9 katalysiert – wohl auf einen indirekten Wirkmechanismus des SUV39H-Inhibitors Chaetocin zurückgehen, möglicherweise die Beeinflussung zellulärer Gene (siehe 4.2).

Da MTA als einziger der vier untersuchten Inhibitoren eine deutliche Wirkung auf das Histon-Modifikationsmuster am viralen Genom zeigte, werden im Folgenden die Werte für die einzelnen Loci getrennt betrachtet: An den untersuchten zellulären Loci ist sowohl 8 h als auch 48 h p.i. ein merklicher Rückgang an H3K4me2 in MTA-behandelten Zellen zu verzeichnen (siehe Abb. 3.22). Auch an allen viralen Loci ist schon 8 h p.i. eine Verringerung der H3K4me2-Menge sichtbar, die 48 h p.i. (z. B. mit 2,3- bzw. 4,1-fachen Änderungen am

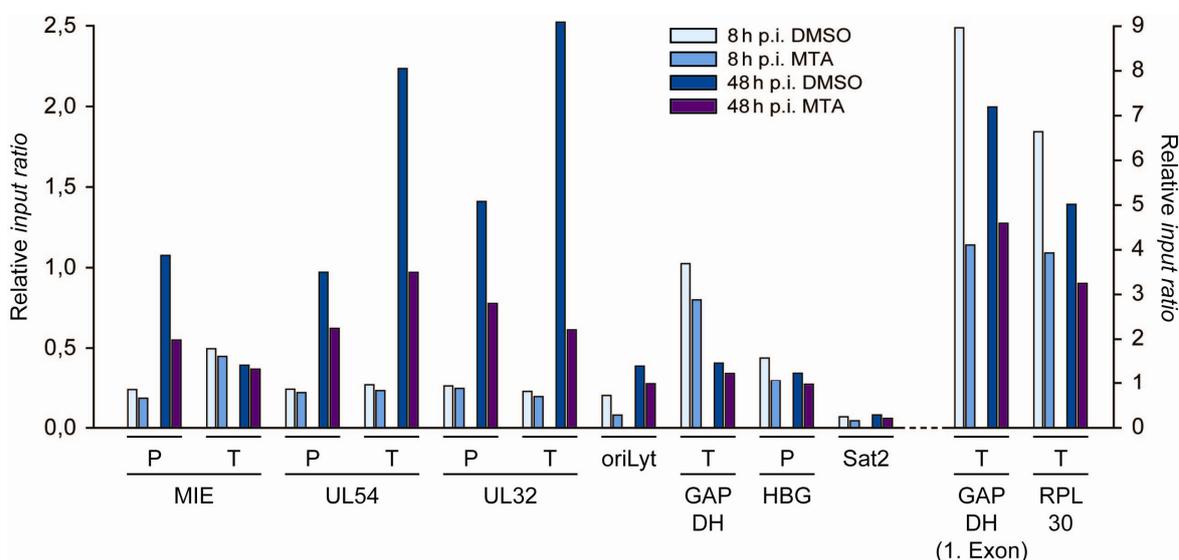


Abb. 3.22 Einfluss von MTA auf das Histon H3K4-Methylierungsmuster

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden für 1 h mit DMSO (0,92% [v/v]), bzw. MTA (1,1 mM, 0,92% [v/v] DMSO) vorbehandelt, für 2 h in Anwesenheit der Inhibitoren mit HCMV infiziert (MOI = 0,5 PFU/Zelle), weiter mit den Inhibitoren inkubiert (Mediumwechsel 24 h p.i.) und 8 h sowie 48 h p.i. durch ChIP mit Antikörpern gegen Histon H3 und H3K4me2 analysiert. Die *input ratio*-Werte von H3K4me2 sind jeweils normiert auf die Gesamt-H3-Werte dargestellt, zur besseren Übersichtlichkeit wurde für zwei zelluläre Loci eine separate Skala eingeführt.

UL54 T- bzw. UL32 T-Locus) ungleich stärker ausfällt. Dies überrascht nicht, da der durch MTA verringerte Anstieg der H3K4me2-Menge ja erst mit Einsetzen der viralen DNA-Replikation beginnt, so dass der Effekt spät in der Infektion deutlicher ausgeprägt ist als im frühen Stadium. Aufgrund dieser starken Abnahme der H3K4me2-Menge an allen untersuchten Loci nach MTA-Behandlung wäre die Veränderung des H3-Modifikationsmusters am HCMV-Genom als Ursache für den antiviralen Effekt von MTA durchaus denkbar.

Neben diesen Modifikations-spezifischen Antikörpern, die schon für die Analysen in 3.2.1 verwendet wurden, kamen zur detaillierteren Untersuchung der epigenetischen Effekte der Inhibitoren zusätzlich Antikörper mit leicht unterschiedlichen Spezifitäten zum Einsatz. So finden sich in der Literatur Hinweise auf die Wirkung von Chaetocin und MTA auf die trimethylierten Formen von H3K9me und H3K4me (Greiner *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006), während bisher nur die dimethylierten Formen untersucht wurden. Zudem kann die Acetylierung von H3 an Lysin 9 wohl nur von nicht Curcumin-inhibierbaren Enzymen wie PCAF und Gcn5 katalysiert werden, während H3K14 sowohl von Curcumin-inhibierbaren als auch von nicht Curcumin-inhibierbaren Enzymen acetyliert wird. Daher ist das oben verwendete polyklonale Serum gegen die H3K9/K14ac-Doppelmodifikation womöglich nicht optimal geeignet, um den Einfluss von Curcumin auf die H3-Acetylierung zu untersuchen, da es eventuell auch Antikörper enthält, die nur eine der beiden Acetylierungen erkennen, und so im ChIP bei gleichbleibenden H3K9ac-Mengen ein Curcumin-bedingtes Absinken des H3K14ac-Levels nicht angemessen abgebildet wird. Aufgrund dieser Tatsachen wurden die beschriebenen ChIP-Experimente 48 h p.i. mit folgenden Antikörpern wiederholt: Statt Antikörpern gegen H3K4me2 (Transkriptions-aktivierend) und H3K9me2 (Transkriptions-reprimierend) kamen Antikörper gegen H3K4me3 (Transkriptions-aktivierend) und H3K9me3 (Transkriptions-reprimierend) zum Einsatz, der Antikörper gegen H3K9/K14ac wurde durch einen ausschließlich gegen H3K14ac (beide Transkriptions-aktivierend) gerichteten ersetzt. Die *input ratio*-Werte für ausgewählte virale und zelluläre Loci wurden jeweils auf die Werte für Gesamt-H3 normiert (siehe Abb. 3.23).

Der Acetylierungsgrad von Histon H3 ist am viralen Genom in Curcumin-behandelten Zellen etwas niedriger als in DMSO-behandelten, am zellulären RPL30 T-Locus steigt er geringfügig an (siehe Abb. 3.23 A). Im Vergleich zur H3K9/K14ac-Modifikation (vgl. Abb. 3.21) fällt der Unterschied zur Kontrollprobe bei H3K14ac allerdings geringer aus, so dass die obige Theorie bezüglich des polyklonalen Antikörpers mit Spezifität für die Doppelmodifikation wohl hinfällig ist. Ebenso wie bei der Untersuchung von H3K4me2 (vgl.

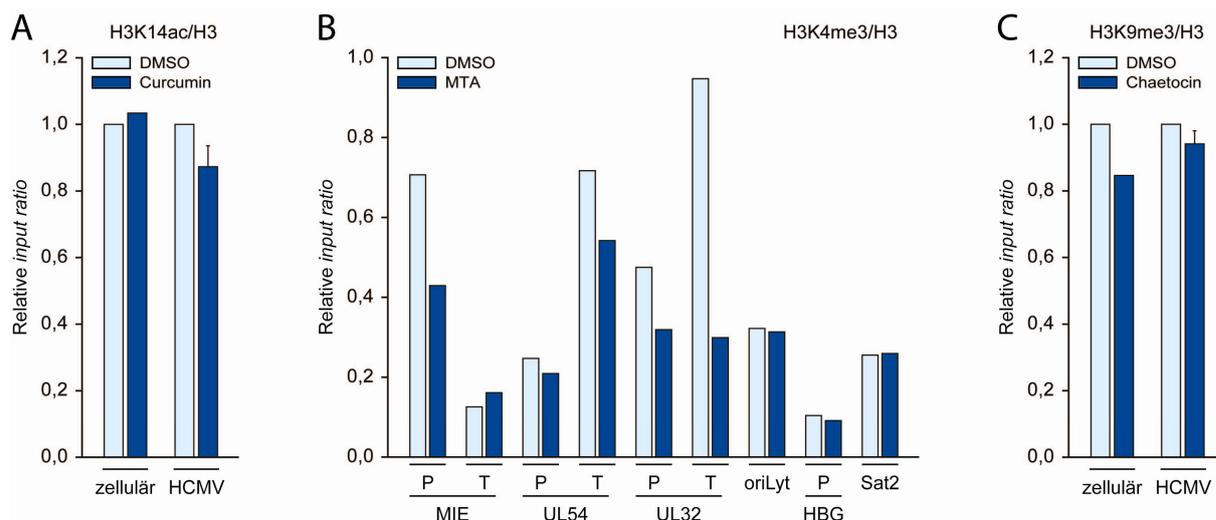


Abb. 3.23 Einfluss von Curcumin, MTA und Chaetocin auf das Histon H3-Modifikationsmuster

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden für 1 h mit DMSO (0,92% [v/v]), Curcumin (15 μ M, 0,66% [v/v] DMSO) (A), MTA (1,2 mM, 0,92% [v/v] DMSO) (B) und Chaetocin (15 nM, 0,66% [v/v] DMSO) (C) vorbehandelt, für 2 h in Anwesenheit der Inhibitoren mit HCMV infiziert (MOI = 0,5 PFU/Zelle), bis 48 h p.i. weiter mit den Inhibitoren inkubiert (Mediumwechsel 24 h p.i.) und durch ChIP mit Antikörpern gegen Histon H3, H3K14ac, H3K4me3 und H3K9me3 analysiert. Die *input ratio*-Werte von H3K14ac (A), H3K4me3 (B) und H3K9me3 (C) sind jeweils normiert auf die Gesamt-H3-Werte dargestellt; in (A) und (C) sind der RPL30 T-Locus (zellulär) und der Mittelwert aus 3 viralen Loci abgebildet, wobei die DMSO-Werte jeweils gleich 1 gesetzt wurden.

Abb. 3.22) ist auch bei der trimethylierten Form H3K4me3 eine deutliche Verminderung des Modifikations-Levels durch die MTA-Behandlung an fast allen untersuchten viralen Loci festzustellen, jedoch fällt auch hier der Unterschied etwas geringer aus als bei der dimethylierten Form (siehe Abb. 3.23 B). Bei der Chaetocin-behandelten Probe fällt auf, dass der Anteil von H3K9me3 im Gegensatz zu H3K9me2 (vgl. Abb. 3.21) im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen sowohl am viralen als auch am zellulären Genom geringfügig absinkt (siehe Abb. 3.23 C).

Die Untersuchung der Veränderungen des H3-Modifikationsmusters nach Behandlung mit vier Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme ergab damit zumindest bei einigen Inhibitoren Hinweise auf einen epigenetischen Wirkmechanismus ihres antiviralen Effekts: Curcumin führte zu einer Verminderung des H3-Acetylierungsgrades, allerdings nicht an allen viralen Loci; der zweite Acetyltransferase-Inhibitor, Anacardinsäure, hatte hingegen keinen Effekt auf die Menge an H3K9/K14ac. Der SUV39H-Inhibitor Chaetocin führte erwartungsgemäß zu einem Absinken der Menge der von SUV39H katalysierten H3K9me3-Modifikation, während die Menge der dimethylierten Form vor allem am viralen Genom anstieg – allerdings waren die Änderungen bei beiden Modifikationen eher gering. MTA führte zu einer deutlichen Abnahme von H3K4me2 und H3K4me3 an nahezu allen untersuchten viralen Loci. Es muss bei dieser Betrachtung auch im Auge behalten werden,

dass mit den untersuchten Modifikationen nur ein Bruchteil des epigenetischen Musters abgedeckt ist, so dass die Wirkung der Inhibitoren sich eventuell an anderen Histonen oder Aminosäure-Seitenketten abspielt. Damit sind die durch die Inhibitoren ausgelösten Veränderungen des H3-Modifikationsmusters am viralen bzw. auch zellulären Genom durchaus eine plausible Ursache für den beobachteten antiviralen Effekt der vier Inhibitoren. Allerdings sind durchaus noch zusätzliche, nicht epigenetische Wirkmechanismen möglich, im Falle der Anacardinsäure scheinen diese alternativen Mechanismen sogar zu überwiegen.

3.2.5 Zusammenfassung

Ebenso wie die Nukleosomen-Besetzung durchläuft auch das Histon-Modifikationsmuster am HCMV-Genom im Verlauf der lytischen Infektion deutliche Veränderungen, die mit der transkriptionellen Aktivierung der viralen Gene verschiedener kinetischer Klassen korrelieren, so dass sich die epigenetische Signatur der viralen DNA von heterochromatisch zu euchromatisch wandelt. Die Veränderungen der Histon-Modifikationen sind dabei weitgehend DNA-Replikations-unabhängig. Um das epigenetische Modifikationsmuster an der HCMV-DNA zu manipulieren, wurden zudem vier Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme eingesetzt. Die Substanzen zeigten starke antivirale Effekte, die zumindest im Falle von MTA auch zum Teil auf epigenetischen Veränderungen beruhen dürften.

4 Diskussion

Als nukleär replizierendes DNA-Virus ist HCMV ebenso wie andere Herpesviren der eukaryotischen Chromatinisierung unterworfen, die Möglichkeiten zur positiven wie zur negativen Regulation der viralen Replikation mit sich bringt.

Im Folgenden werden die Chromatinisierung (siehe 4.1) und die Histon-Modifikationen (siehe 4.2) getrennt diskutiert und abschließend in einem Modell zur epigenetischen Regulation der lytischen HCMV-Infektion zusammengeführt (siehe 4.3). Abschnitt 4.4 liefert einen Ausblick auf weiterführende Untersuchungen zum Thema.

4.1 Chromatinisierung des HCMV-Genoms

Nachdem zu Beginn des Jahres 2006 der Wissensstand zur Chromatinisierung des HCMV-Genoms während der lytischen Infektion noch recht begrenzt war, konnten im Verlauf dieser Arbeit überraschende neue Erkenntnisse gewonnen werden, aus denen sich ein vierphasiges Chromatinisierungs-Modell ableiten lässt (siehe Abb. 4.1):

- **Phase I: Initiale Chromatinisierung (0 h - 0,5 h p.i.)**

Direkt nach Eintritt des im Kapsid noch Histon-freien viralen Genoms in den Kern der Wirtszelle setzt die initiale Chromatinisierung ein. Dabei wird die HCMV-DNA mit Nukleosomen besetzt, die genau wie die zellulären Nukleosomen aus äquimolaren Mengen der *core*-Histone H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut sind (siehe Abb. 3.1) und die ebenso wie ihre Pendants auf dem Wirtszellgenom ein ca. 146 bp langes DNA-Fragment vor MNase-Verdau schützen (siehe Abb. 3.3). Allerdings ist die Nukleosomen-Besetzungsdichte der viralen DNA vor allem zu Beginn der Infektion deutlich geringer als die der Wirts-DNA (siehe Abb. 3.1, 3.6, 3.8, 3.9) – entsprechend scheint es am HCMV-Genom vorwiegend einzelne Nukleosomen sowie Di- und Trinukleosomen-Elemente zu geben und weniger die auf eukaryotischer DNA üblichen, langen regelmäßigen Nukleosomen-Reihen (siehe Abb. 3.3). Neben dieser generellen Nukleosomen-Unterbesetzung der viralen DNA ist auch das *linker*-Histon H1 ein Stück weit unterrepräsentiert, was wegen der Funktion von H1 beim Aufbau von stärker verdichteten Chromatin-Stukturen auf eine vergleichsweise aufgelockerte Chromatinisierung des HCMV-Genoms hinweisen könnte (siehe Abb. 3.1). Eine Unterrepräsentation von H1 wurde auch an transient transfizierter Plasmid-DNA festgestellt, deren Chromatinisierung womöglich nach denselben Mechanismen erfolgt wie in der frühen Phase der HCMV-Infektion (Hebbar & Archer, 2008). Die Besetzung der viralen DNA mit Nukleosomen unmittelbar nach Eintritt in den Wirtszellkern ist unabhängig von einer

möglicherweise durch virale oder zelluläre DNA-Polymerasen katalysierten DNA-Replikation (siehe Abb. 3.11).

- **Phase II: Aufrechterhaltung des geringen Chromatinisierungsgrades (0,5 h - 16 h p.i.)**

Nach der initialen Chromatinisierung folgt von 0,5 h bis 16 h p.i. eine Phase mit relativ niedriger Histon-Besetzung – an einigen viralen Loci, vor allem am oriLyt, konnte eine leichte Abnahme der Chromatinisierungsdichte über diesen Zeitraum hinweg beobachtet werden (siehe Abb. 3.10). Möglicherweise werden die zu Beginn der Infektion dort deponierten Histone nun entfernt, um den Replikationsursprung auf seine Aktivierung vorzubereiten, indem die an der Replikations-Initiation beteiligten viralen Proteine des Primase-Helikase-Komplexes (IE2, ppUL44, pUL54, ppUL57, pUL70, pUL84, pUL102,

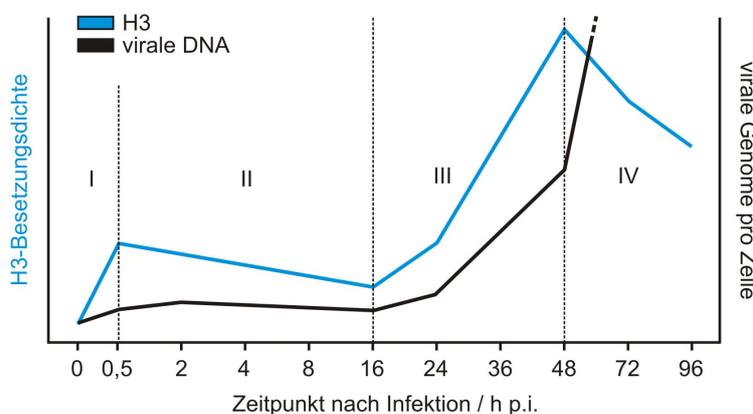


Abb. 4.1 Schema der Chromatinisierung des HCMV-Genoms

Schematische Darstellung der durchschnittlichen Histon H3-Besetzung des HCMV-Genoms (vgl. Abb. 3.10; Mittelwert aller untersuchten viralen Loci, die Details des Verlaufs zwischen 0,5 h und 16 h p.i. wurden weggelassen) sowie der Anzahl der viralen Genome pro Zelle (vgl. Abb. 3.11) im Verlauf der lytischen Infektion (relative Unterschiede sind maßstabsgetreu dargestellt); die römischen Ziffern bezeichnen die vier Phasen des Chromatinisierungsmodells.

2004) oder das IE1-Protein, dessen Fehlen während des gesamten HCMV-Infektionszyklus eine erhöhte H3-Besetzung (als Surrogat für die Nukleosomen-Besetzung) des viralen Genoms zur Folge hat (Winterling, 2009).

Während dieser frühen Phase der lytischen Infektion gibt es zumindest im Hinblick auf das MIE-Gen wenigstens zwei verschiedene Populationen an HCMV-Genomen, da sowohl der Promotor als auch die transkribierte Region jeweils in einer weniger stark und einer stärker chromatinisierten Form auftreten: Bezüglich des MIE P-Locus existiert eine in etwas geringerem Maße besetzte Nebenpopulation, der MIE T-Locus ist in den meisten Fällen eher gering besetzt, eine kleine Population hingegen ist deutlich stärker chromatinisiert. Im

pUL105; Pari, 2008) sich dort sammeln. Da dicht gepacktes Chromatin eine gewisse Barriere für die Transkription darstellt, könnten durchaus auch virale Proteine dazu beitragen, den geringen Chromatinisierungsgrad früh in der lytischen Infektion aufrechtzuerhalten – Kandidaten wären z. B. das Tegumentprotein pp71 in Analogie zum HSV-Protein VP16 (Herrera & Triezenberg,

späteren Verlauf der Infektion gehen bezüglich beider Loci alle Genome in eine einheitliche stärker besetzte Population über (siehe Abb. 3.6).

- **Phase III: DNA-Replikations-abhängige Chromatinisierung (16 h - 48 h p.i.)**

Mit dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation zwischen 16 h und 24 h p.i. beginnt die dritte Phase im Modell der HCMV-Chromatinisierung: ein starker Anstieg der Histon-Besetzung an weiten Teilen des viralen Genoms, der in hohem Maße von der viralen DNA-Replikation abhängt und bis 48 h p.i. andauert (siehe Abb. 3.4, 3.8, 3.9, 3.11). Damit beruhen die beiden Chromatinisierungsphasen des HCMV-Genoms auf unterschiedlichen Prozessen: einem DNA-Replikations-unabhängigen Mechanismus, der die initiale Chromatinisierung bei Eintritt in den Wirtszellkern auslöst (Phase I), sowie einem DNA-Replikations-abhängigen Mechanismus für den zweiten – und deutlich stärkeren – Besetzungsanstieg (Phase III). Der DNA-Replikations-unabhängige Mechanismus bleibt möglicherweise während der gesamten Virusinfektion aktiv, was erklären würde, weshalb eine Blockierung der viralen DNA-Replikation den zweiten Besetzungsanstieg nicht komplett unterbindet (siehe Abb. 3.11). Während der Phase II des Modells, in der die Nukleosomen-Menge konstant bleibt, wäre in diesem Fall ein weiterer (viraler?) Mechanismus zu postulieren, der dem Besetzungsanstieg konstant entgegenwirkt (siehe oben). Da z. B. bei geringer MOI oder bei Fehlen des IE1-Proteins in dieser Phase durchaus auch höhere Besetzungsdichten am viralen Genom erreicht werden (Winterling, 2009), kann wohl ausgeschlossen werden, dass die DNA-Replikations-unabhängige Chromatinisierungsmaschinerie nur eine geringe Besetzungsdichte zu erzeugen in der Lage ist.

Wahrscheinlich wird analog zu HSV-1 während der initialen Chromatinisierungsphase hauptsächlich die Transkriptions-aktivierende H3-Variante H3.3 eingebaut (z. B. über das Chaperon HIRA), während die DNA-Replikations-abhängige Maschinerie vor allem das kanonische H3.1 als Substrat nutzt (Placek *et al.*, 2009) – da der in der vorliegenden Arbeit benutzte Antikörper gegen Histon H3 jedoch gegen ein in H3.1 und H3.3 identisches Peptid gerichtet ist, kann nicht zwischen den beiden Histon-Varianten differenziert werden.

Durch konfokale Immunfluoreszenzanalysen wurden Hinweise auf die Beteiligung der zellulären Proteine CAF-1, PCNA und ASF1a an der DNA-Replikations-abhängigen späten Chromatinisierungsphase erbracht: PCNA und ASF1a lokalisieren ab 24 h p.i., CAF-1 sogar bereits ab 8 h p.i. in bzw. nahe bei den viralen Replikationszentren (siehe Abb. 3.12). Die auch an der zellulären DNA-Replikations-abhängigen Chromatinisierung beteiligten Chaperone CAF-1 und ASF1a werden also möglicherweise von viralen Proteinen zum Ort der viralen DNA-Replikation rekrutiert, um dort ihre Funktion bei der Nukleosomen-Besetzung

des HCMV-Genoms auszuüben. PCNA ist wohl nicht direkt an der Replikation beteiligt, da HCMV mit ppUL44 ein Struktur- und Funktions-Analogon besitzt, womöglich wird es aber wegen seiner Rekrutierungsfunktion (z. B. für CAF-1) ebenfalls in die viralen Replikationszentren gelotst.

Während sich in der ChIP-Analyse die maximale Histon H3-Besetzung an einigen viralen Loci den Werten der zellulären Genombereiche annähert, ist das virale Genom im FAIRE-Experiment trotz des starken Besetzungsanstiegs immer noch deutlich geringer besetzt als das zelluläre Genom (siehe Abb. 3.8, 3.10). Die Erklärung für dieses Phänomen muss in den Unterschieden zwischen beiden Techniken begründet liegen: Eine Möglichkeit wäre die Tatsache, dass ChIP die tatsächliche Histon-Besetzung methodisch bedingt überschätzen kann. Ein DNA-Fragment mit einem oder mehreren Nukleosomen darauf wird im ChIP eventuell mit ähnlicher Effizienz immunpräzipitiert, während das Fragment im FAIRE möglicherweise mit steigender Nukleosomenanzahl mit höherer Wahrscheinlichkeit in die organische Phase gezogen wird. Ausnahmen vom starken Besetzungsanstieg in dieser Phase bilden der MIE P- und der oriLyt-Locus, deren Histon-Besetzung im späteren Infektionsverlauf weitgehend konstant bleibt. Der Grund hierfür könnte eine Assoziation dieser regulatorisch bedeutsamen Genombereiche mit Nicht-Histon-Proteinen wie etwa IE2 sein, für das beide Loci eine Bindestelle besitzen. Diese Theorie passt zu der Tatsache, dass im FAIRE-Experiment die Unterschiede zwischen MIE P/oriLyt und den übrigen viralen Loci deutlich geringer ausgeprägt sind als im ChIP, da im ChIP spezifisch die Besetzung mit Histon H3 untersucht wird, während die FAIRE-Technik ein Maß für die Gesamt-Protein-Besetzung der DNA liefert (siehe Abb. 3.8, 3.10).

- **Phase IV: Partielle Dechromatinisierung (48 h - 96 h p.i.)**

Die vierte Phase beinhaltet einen deutlichen Rückgang der Nukleosomen-Besetzung an weiten Teilen des HCMV-Genoms zwischen 48 h und 96 h p.i. (siehe Abb. 3.10). Aufgrund der zeitlichen Korrelation mit der Enkapsidierung viraler Genome bei der Assemblierung neuer Viruspartikel liegt ein Zusammenhang zwischen beiden Vorgängen nahe. Da die HCMV-DNA im Virion Histon-frei vorliegt, muss entweder ein Teil der neu replizierten Genome bis zur Verpackung Nukleosomen-frei gehalten werden oder die zur Enkapsidierung bestimmten Genome müssen vor oder während der Verpackung von den zuvor dort positionierten Nukleosomen befreit werden. Zwischen den beiden Möglichkeiten kann weder mit ChIP noch mit FAIRE differenziert werden, da diese Techniken jeweils einen Querschnitt über alle Genome liefern. Eine Alternative bestünde hier in der Psoralen-Quervernetzungsanalyse, mit der sich feststellen ließe, ob zu verschiedenen Zeitpunkten ab 48 h p.i.

unterschiedlich besetzte HCMV-Genom-Populationen vorliegen – die frisch replizierten Genome könnte man dabei z. B. radioaktiv markieren. Die 48 h p.i. durchgeführten Psoralen-Studien erbrachten allerdings keinen Hinweis auf eine Subpopulation von unbesetzten Genomen – es werden also wohl zumindest nicht über längere Zeit hinweg Nukleosomenfreie Genome für die Verpackung bereitgehalten (siehe Abb. 3.6). Diese Tatsache widerspricht auch der These, der Rückgang der H3-Besetzung ab 48 h p.i. sei auf eine Erschöpfung des Vorrats an verfügbaren Histonen in der Zelle zurückzuführen, denn auch in diesem Fall müssten im späten Infektionsverlauf unterschiedlich besetzte Genompopulationen entstehen (vgl. Oh & Fraser, 2008; Nitzsche *et al.*, 2008). Aber auch eine Überlagerung mehrerer Mechanismen ist durchaus denkbar. Da in den ChIP-Analysen bei 48 h p.i. das Maximum der H3-Besetzung auftritt, kann allerdings nur durch Untersuchungen nach diesem Zeitpunkt Klarheit über die Ursachen des Besetzungsrückgangs gewonnen werden.

Im FAIRE-Experiment fällt der Besetzungsrückgang in der späten Phase nicht so eindeutig aus wie im H3-ChIP – an manchen Loci ist er überhaupt nicht zu erkennen. Erklärungsmöglichkeiten sind entweder die Anwesenheit von Nicht-Histon-Proteinen (z. B. DNA-Bindeproteinen) auf den von Histonen befreiten Genomen oder auch eine mögliche Formaldehyd-Quervernetzung der DNA mit Kapsid-Proteinen während des Verpackungsvorgangs (siehe Abb. 3.8).

In aktuellen Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen wurde der Chromatinisierung des HCMV-Genoms während der lytischen Infektion eher am Rande Beachtung geschenkt. Bei Experimenten mit einer MOI von 3 PFU/Zelle (in der vorliegenden Arbeit wurde eine MOI von 5 PFU/Zelle verwendet) stellte die Gruppe von Thomas Shenk an acht viralen Loci, darunter der MIE P- und der UL44 P-Locus, in einem sechsstufigen Zeitverlauf von 3 h bis 72 h p.i. maximal 2-fache Änderungen der Histon H3-Besetzung mit einem Maximum bei 12 h p.i. fest (Cuevas-Bennett & Shenk, 2008). Mögliche Ursachen könnten Unterschiede in der Chromatinisierung des HCMV-Genoms bei etwas niedrigerer MOI oder die Verwendung eines anderen gegen H3 gerichteten Antikörpers als in der vorliegenden Arbeit sein. Zudem wurde aktuell gezeigt, dass stark chromatinisierte DNA-Bereiche sich vergleichsweise schlecht durch Ultraschall scheren lassen und daher in ChIP-Proben selektiv angereichert werden (Teytelman *et al.*, 2009) – Unterschiede in der Probenaufarbeitung könnten also ebenfalls eine Ursache der Abweichungen sein. Die Arbeitsgruppe von John Sinclair ermittelte bei einer deutlich geringeren MOI von 0,1 PFU/Zelle eine Halbierung der Histon H3-Besetzung am MIE P-Locus zwischen 8 h und 72 h p.i. (Groves *et al.*, 2009), während in

der vorliegenden Arbeit ein Besetzungsanstieg gemessen wurde (siehe Abb. 3.10). Die Autoren schließen daraus (übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit), dass neu replizierte HCMV-Genome nicht komplett Nukleosomen-frei sein können, da sonst der Besetzungsabfall deutlicher sein müsste. Auch hier besteht die Möglichkeit, dass die Chromatinisierung der viralen DNA bei niedriger MOI etwas unterschiedlich abläuft: Falls tatsächlich virale Tegumentproteine daran beteiligt sind, die Nukleosomen-Besetzung des HCMV-Genoms in der frühen Infektionsphase niedrig zu halten, würde bei niedriger MOI die verringerte Menge dieser Tegumentproteine womöglich nicht ausreichen, um ihre Funktion zu erfüllen, so dass die H3-Besetzung zu diesem Zeitpunkt vergleichsweise hoch ausfiele, wodurch sich auch der Besetzungsabfall zwischen 8 h und 72 h p.i. erklären ließe. Tatsächlich konnte 8 h p.i. eine reziproke Abhängigkeit der Nukleosomen-Besetzung von der MOI gezeigt werden, als Ursache wurde vermutet, dass ein Tegumentprotein (z. B. pp71) gemeinsam mit IE1 eine Erhöhung der Histon-Besetzung in dieser Phase der Infektion verhindert (Winterling, 2009). Auch bei eigenen Experimenten mit einer MOI von 0,5 PFU/Zelle wurde 8 h p.i. eine erhöhte H3-Besetzung des viralen Genoms im Vergleich zu 2 h und 24 h p.i. festgestellt (Daten nicht gezeigt), so dass eine erhöhte Chromatinisierung des HCMV-Genoms in der frühen Phase der Infektion bei niedriger MOI durchaus plausibel ist.

HSV-1 weist in seinen viralen Mechanismen einige Parallelen zu HCMV auf – zudem ist es das Herpesvirus mit der am besten untersuchten Chromatinisierung des viralen Genoms während der lytischen Infektion. In der Literatur wird größtenteils übereinstimmend über eine im Vergleich zum zellulären Genom relativ niedrige Nukleosomen-Besetzung des HSV-1-Genoms bei MOIs zwischen 1 und 5 PFU/Zelle berichtet (zusammengefasst in Ingvarsdottir & Blaho, 2009 und Lu & Triezenberg, 2009) – eine Veröffentlichung beschreibt allerdings eine dem zellulären Genom vergleichbare Besetzung in der frühen Infektionsphase (3 h p.i.) bei einer deutlich geringeren MOI von 0,1 PFU/Zelle (Cliffe & Knipe, 2008). Damit gibt es auch bei HSV-1 Hinweise auf einen reziproken Zusammenhang zwischen der MOI und der Nukleosomen-Besetzungsdichte am viralen Genom zu Beginn der lytischen Infektion. Passend dazu wurde neben IE-Proteinen wie ICP0 und der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription auch das Tegumentprotein VP16 mit dem Aufrechterhalten der niedrigen Histon-Besetzung in Verbindung gebracht (Cliffe & Knipe, 2008; Kutluay & Triezenberg, 2009), so dass ein ähnlicher Mechanismus wie oben für HCMV vorgeschlagen denkbar wäre. Im späteren Infektionsverlauf scheinen sich HCMV und HSV-1 hingegen wieder deutlich zu unterscheiden, da mehrere Veröffentlichungen von gleichbleibenden Histon-Mengen bzw. sogar von einem starken Abfall der Besetzung des viralen Genoms berichten, der unabhängig

von der viralen DNA-Replikation vonstatten geht (Kutluay & Triezenberg, 2009; Cliffe & Knipe, 2008; Oh & Fraser, 2008). Als Ursache für die sinkende Nukleosomen-Besetzung favorisieren die Autoren das Freihalten eines Teils der neu replizierten Genome von Chromatin durch unbekannte (virale) Mechanismen, wohingegen eine Limitierung durch die Menge an verfügbaren Histon-Proteinen eher für unwahrscheinlich gehalten wird. In der späten Phase der lytischen Infektion nutzen die beiden Viren also vermutlich unterschiedliche Regulationsmöglichkeiten im Zusammenhang mit der Chromatinisierung. Eine aktuelle Veröffentlichung konnte allerdings eine DNA-Replikations-abhängige starke Zunahme der Assoziation des HSV-1-Genoms mit der kanonischen Histonvariante H3.1 zwischen 3 h und 6 h p.i. nachweisen, während die DNA-Replikations-unabhängig eingebaute Variante H3.3 schon zu Beginn der Infektion auf der viralen DNA nachweisbar war (Placek *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse lassen wiederum einige Ähnlichkeit zu den in der vorliegenden Arbeit ermittelten HCMV-Daten erkennen. Zudem wurde in einer weiteren aktuellen Veröffentlichung die Besetzungsdichte des HSV-1-Genoms 5 h p.i. bei einer MOI von 1 PFU/Zelle als ähnlich derjenigen zellulärer DNA beschrieben – die Autoren postulieren hier instabile, ihre Position rasch verändernde Nukleosomen auf dem viralen Genom, die bei manchen Techniken zu einer Unterschätzung der Besetzungsdichte führen (Lacasse & Schang, 2009).

4.2 Histon-Modifikationsmuster am HCMV-Genom

Die Ergebnisse zum Modifikationsmuster am HCMV-Genom während der lytischen Infektion erlauben ebenfalls eine Einteilung des Infektionsverlaufs in mehrere Abschnitte; diese sind jedoch nur teilweise synchron mit den in 4.1 postulierten vier Chromatinisierungsphasen (siehe Abb. 4.2):

- **Phase A: Heterochromatin-artiges Modifikationsmuster (0,5 h - 2 h p.i.)**

Zu Beginn der Infektion zeigt das HCMV-Genom eine Heterochromatin-artige Modifikations-Signatur im Vergleich zu aktiven zellulären Genen. Dabei treten die Transkriptions-aktivierenden Marker H3K9/K14ac und H3K4me2 in vergleichsweise geringen Mengen und der Transkriptions-reprimierende Marker H3K9me2 in hohen Mengen auf, wobei letzterer zwischen 0,5 h und 2 h p.i. sogar merklich ansteigt, was hauptsächlich auf die Veränderungen am MIE-Locus zurückzuführen ist.

- **Phase B: Erste Zunahme der aktivierenden Modifikationen (2h - 16h p.i.)**

Ab 2h p.i. beginnt der erste starke Anstieg von H3K9/K14ac – zunächst vor allem am MIE-Gen – gefolgt von einem eher kontinuierlich verlaufenden Anstieg der zweiten aktivierenden Modifikation H3K4me2. Dieser Anstieg der Aktivierungs-Marker fällt mit dem Beginn der viralen Transkription vor allem der IE-Gene zusammen. Gleichzeitig bleibt jedoch die reprimierende H3K9me2-Modifikation auf ihrem hohen Niveau, was möglicherweise durch epigenetische antivirale Abwehrmechanismen der Wirtszelle verursacht wird, die vermutlich gezielt die Aktivierung des regulatorisch bedeutsamen MIE-Locus zu verhindern versuchen.

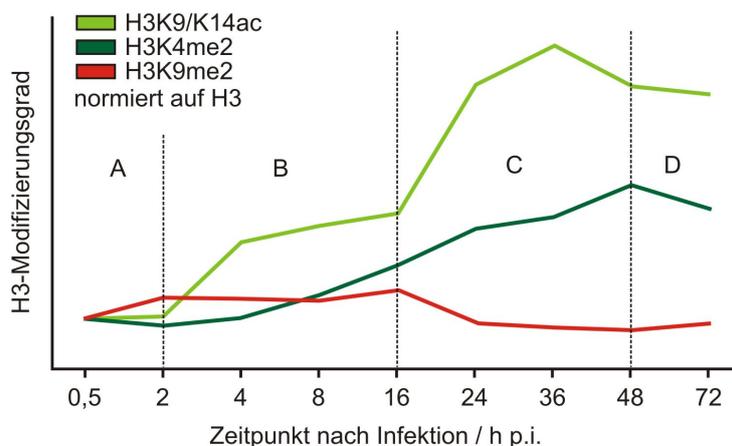


Abb. 4.2 Schema des H3-Modifikationsmusters des HCMV-Genoms

Schematische Darstellung der durchschnittlichen Histon H3-Modifikationen des HCMV-Genoms normiert auf die Gesamt-H3-Menge (vgl. Abb. 3.15; jeweils Mittelwert aller untersuchten viralen Loci) im Verlauf der lytischen Infektion (relative Unterschiede sind maßstabsgetreu dargestellt); die Buchstaben bezeichnen die vier Phasen des Modifikationsmodells.

PML-Körper beschrieben (siehe 1.3). Das zeitgleiche Auftreten von Transkriptions-aktivierenden und -reprimierenden H3-Modifikationen vor allem am MIE-Locus in der frühen Infektionsphase deutet ebenso wie die generelle H3-Besetzung (siehe oben) mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Existenz zweier unterschiedlicher Genompopulationen hin: eine (von der Wirtszelle) inhibierte und eine, die den Abwehrmechanismen entkommen konnte und im Folgenden die lytische Infektion anstößt.

- **Phase C: Zunehmend Euchromatin-artigeres Modifikationsmuster (16h - 48h p.i.)**

Mit Beginn der viralen DNA-Replikation 16h p.i. – allerdings von dieser weitgehend unabhängig (siehe Abb. 3.16) – steigen die Mengen der beiden Transkriptions-aktivierenden Modifikationen weiter an, insbesondere H3K9/K14ac in einem zweiten steilen Sprung zwischen 16h und 24h p.i., der hauptsächlich durch den Anstieg an den E- und L-Genen

Da die viralen Genome sich in der frühen Phase der Infektion an den mit antiviralen Effekten in Verbindung gebrachten PML-Körpern (siehe 1.3) aufhalten, ist dort auch der antivirale Abwehrmechanismus zu vermuten – für die Daxx-vermittelte HDAC-abhängige epigenetische Reprimierung des MIE-Locus zu Beginn der HCMV-Infektion wurde dieser Zusammenhang schon gezeigt, zudem wurden auch Methyltransferasen als Bestandteil der

verursacht wird, deren transkriptionelle Aktivierung in diese Phase fällt. Gleichzeitig sinken die H3K9me2-Mengen merklich ab, so dass das Gesamtbild der H3-Modifikationen nun eindeutig Euchromatin-artig geprägt ist. Auch der Acetylierungsgrad der übrigen *core*-Histone am viralen Genom ist 48 h p.i. im Vergleich zum Beginn der Infektion deutlich erhöht (siehe Abb. 3.13).

Der Einsatz von Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme wie Curcumin und MTA konnte in dieser Infektionsphase (bei einer MOI von 0,5 PFU/Zelle) eine zum Teil deutliche Verminderung der Transkriptions-aktivierenden Modifikationen am HCMV-Genom hervorrufen, zudem waren die virale Genexpression und DNA-Replikation und damit auch die Produktion infektiöser Nachkommenviren stark beeinträchtigt (siehe 3.2.3, 3.2.4). MTA hatte 8 h p.i. nur einen kleinen negativen Effekt auf die H3K4me2-Menge, wobei zu diesem Zeitpunkt der Anstieg dieser Modifikation auch noch relativ gering war, so dass die Inhibition der beteiligten Methyltransferasen durch MTA keinen sonderlich starken Effekt hätte erzeugen können. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Histon-Modifikationsmuster am HCMV-Genom eine wichtige Rolle für die Regulation der Virusreplikation spielt. Die antivirale Wirkung von Anacardinsäure und Chaetocin scheint aufgrund der geringen Veränderungen im H3-Modifikationsmuster hingegen hauptsächlich über nicht-epigenetische Mechanismen abzulaufen. Chaetocin könnte seine antivirale Wirkung aber möglicherweise auch durch die Reduzierung des Trimethylierungsgrades von H3K9, die sich an den untersuchten Loci als Trend abzeichnet (siehe Abb. 3.23), und eine daraus folgende Aufhebung der Reprimierung antiviraler zellulärer Gene ausüben. Diese zellulären Gene begünstigen im Gegenzug vielleicht die epigenetische Inaktivierung des HCMV-Genoms z. B. über einen Anstieg der H3K9me2-Menge, wie er in Ansätzen am viralen Genom festgestellt wurde (siehe Abb. 3.21).

- **Phase D: Leichte Abnahme der aktivierenden Modifikationen (48 h - 72 h p.i.)**

Am Ende des viralen Replikationszyklus – nach 48 h p.i., bei H3K9/K14ac sogar schon ab 36 h p.i. – sinken die Levels der beiden Transkriptions-aktivierenden Modifikationen leicht ab, während die H3K9me2-Menge leicht zunimmt. Diese Änderungen finden zu einem Großteil am MIE- und oriLyt-Locus statt und spiegeln vermutlich die transkriptionelle Inaktivierung des MIE-Gens in der späten Infektionsphase wider – beide Loci enthalten Bindestellen für das IE2-Protein, das seine autoreprimierende Wirkung auf den MIE-Locus über Wechselwirkungen mit HDAC1, G9a und SUV39H1 ausübt (Reeves *et al.*, 2006).

In den Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen zu Histon-Modifikationen am HCMV-Genom während der lytischen Infektion wurden als Transkriptions-reprimierende Modifikation übereinstimmend H3K9me₂, als Transkriptions-aktivierende Modifikationen H3K4me₂, H3K9ac, H3K14ac sowie H4ac untersucht.

In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2006 mit einer MOI von 1 PFU/Zelle wurden 30 h p.i. an verschiedenen viralen Loci ebenso wie am transkriptionell aktiven GAPDH-Locus vergleichsweise hohe H3K9ac- und niedrige H3K9me₂-Werte gemessen, was im Wesentlichen den Daten aus der vorliegenden Arbeit entspricht (Ioudinkova *et al.*, 2006).

Mit einer MOI von 3 PFU/Zelle lag die Arbeit der Gruppe von Thomas Shenk (Cuevas-Bennett & Shenk, 2008) am nächsten an den in der vorliegenden Arbeit gewählten Bedingungen von 5 PFU/Zelle. Übereinstimmend mit Abb. 3.15 wurde an viralen E- und L-Promotoren zwischen 12 h und 24 h p.i. ein deutlicher Anstieg der Transkriptions-aktivierenden H3K9ac- und H3K14ac-Modifikationen festgestellt – allerdings setzte sich dieser Anstieg noch bis 72 h p.i. fort, während in der vorliegenden Arbeit der Acetylierungsgrad stagnierte. Dieser Unterschied liegt möglicherweise darin begründet, dass in dieser Veröffentlichung der DNA-Replikations-abhängige H3-Besetzungsanstieg (z. B. aufgrund eines nicht optimalen Antikörpers, siehe oben) unterschätzt und daher keine Normierung der H3-Modifikations-Mengen auf die Gesamt-H3-Werte durchgeführt wurde, so dass zwar die Netto-Menge an H3ac ansteigt, der Acetylierungsgrad (H3ac/H3) aber konstant bliebe – aber auch die leicht unterschiedliche MOI könnte zu den Unterschieden beitragen. Am MIE P-Locus wurde 3 h und 6 h p.i. eine vergleichsweise hohe Menge an H3ac festgestellt, was mit den Daten der vorliegenden Arbeit übereinstimmt, wo zwischen 2 h und 4 h p.i. ein Anstieg des Acetylierungsgrades gemessen wurde. Der darauf folgende Abfall der H3ac-Werte am MIE P 12 h p.i. und ein weiterer Anstieg bis 72 h p.i. lassen sich jedoch mit den Daten in der vorliegenden Arbeit nicht zur Deckung bringen. Interessanterweise kommen die Autoren im Gegensatz zur Gruppe von John Sinclair (Groves *et al.*, 2009) und der vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 3.16) zu dem Schluss, die Anwesenheit Transkriptions-aktivierender Histon-Modifikationen in der späten Phase der Infektion sei von der DNA-Replikation abhängig, da nach PAA-Behandlung zur Unterdrückung der viralen DNA-Replikation der Anstieg von H3K9ac spät in der Infektion ausbleibt. Allerdings wurde auch hier auf eine Normierung der H3K9ac-Werte auf die Gesamtmengen von Histon H3 verzichtet – da durch PAA die DNA-Replikations-abhängige H3-Besetzung weitgehend unterbunden wird (siehe Abb. 3.11), kann also der Acetylierungsgrad (H3ac/H3) konstant bleiben, obwohl die H3K9ac-Menge nicht mehr ansteigt. Bezüglich der Transkriptions-

reprimierenden H3K9me2-Modifikation stimmen die Daten aus der Veröffentlichung der Shenk-Gruppe und aus der vorliegenden Arbeit weitgehend überein: An den E- und L-Promotoren finden sich früh in der Infektion erhöhte H3K9me2-Werte, die ab 24 h p.i. merklich absinken. Am MIE P-Locus hingegen findet sich in der späten Infektionsphase ein – womöglich über den IE2-Autoreprimierungsmechanismus vermittelter – Anstieg der entsprechenden Modifikation, woraus die Autoren auf zwei Genom-Populationen schließen: eine mit Transkriptions-aktivierenden und eine mit Transkriptions-reprimierenden Histon-Modifikationen. Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen allerdings sowohl aufgrund der Nucleosomen-Besetzung (siehe Abb. 3.6) als auch aufgrund des H3-Modifikationsmusters (siehe Abb. 3.14) darauf hin, dass eher in der frühen als in der späten Infektionsphase zwei verschiedene Genom-Populationen vorliegen – der ausgeprägte transiente Anstieg der H3K9me2-Modifikation am MIE P zwischen 2 h und 8 h p.i. fehlt allerdings in der Veröffentlichung der Shenk-Arbeitsgruppe.

Die aktuellste Arbeit zu Histon-Modifikationen während der lytischen HCMV-Infektion stammt aus der Arbeitsgruppe von John Sinclair (Groves *et al.*, 2009). Bei einer MOI von 0,1 PFU/Zelle wurde an IE- und E-Genen ein Anstieg der Menge an Transkriptions-aktivierendem H4ac zwischen 3 h und 24 h p.i. festgestellt, gefolgt von einer Abnahme bis 96 h p.i. – am untersuchten L-Gen stieg das H4ac-Niveau erst zwischen 24 h und 96 h p.i. an. Diese Ergebnisse korrelieren mit den für die verschiedenen kinetischen Klassen erwarteten Aktivierungszeitpunkten – bei sehr geringer MOI verläuft die Infektion etwas verzögert, so dass die im Vergleich mit den H3K9/K14ac-Daten der vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 3.15) verspäteten Anstiege der Transkriptions-aktivierenden Modifikation durchaus plausibel sind. Ein ähnliches Bild wurde für die H3K4me2-Modifikation erhalten, deren Menge am MIE P bis 24 h p.i. anstieg und danach wieder abfiel, während der Anstieg an einem E-Gen erst 24 h p.i. begann. Auch hier lief die Aktivierung der beiden Gene wohl aufgrund der deutlich geringeren MOI im Vergleich zur vorliegenden Arbeit etwas verspätet ab – zudem war der Abfall der Transkriptions-aktivierenden Modifikationen spät in der Infektion stärker ausgeprägt. Der Grund dafür könnte neben der MOI auch die fehlende Normierung auf die Gesamt-H3-Menge sein – wie oben erläutert ist die H3-Besetzungsdichte des viralen Genoms zumindest in der frühen Infektionsphase bei niedriger MOI deutlich erhöht, wodurch spät in der Infektion vielleicht auch am MIE-Locus ein Besetzungsabfall entsteht, der trotz gleichbleibendem Modifizierungsgrad der Histone bei fehlender Normierung ein Absinken der absoluten Modifikationsmenge erzeugt (vgl. auch obige Erwägungen zum Acetylierungsgrad). Übereinstimmend mit den Daten der vorliegenden Arbeit (siehe Abb.

3.15) wurden in der Veröffentlichung früh in der Infektion erhöhte H3K9me2-Mengen am viralen Genom, vor allem jedoch am MIE P, festgestellt, was die Autoren auf eine initiale Reprimierung z. B. durch Bestandteile der PML-Körper zurückführen.

Die Veröffentlichungen über Histon-Modifikationen am HSV-1-Genom lassen zumindest teilweise auf ähnliche Mechanismen schließen wie bei HCMV: Die Mengen der Transkriptions-aktivierenden Modifikationen H3K9ac und H3K4me3 korrelieren mit den Zeitpunkten der Aktivierung der untersuchten Gene aus den drei kinetischen Klassen, die Transkriptions-reprimierende Modifikation H3K9me2 ist kaum vertreten – abgesehen vom ICP0-Locus spät in der Infektion, was zu dessen transkriptioneller Abschaltung passt (Kent *et al.*, 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ICP0 für den erhöhten H3-Acetylierungsgrad in der späten Infektionsphase (mit)verantwortlich ist (Cliffe & Knipe, 2008).

Mit HSV-1 wurden ebenfalls Studien zum Einfluss von Curcumin und MTA auf die virale Replikation durchgeführt (zusammengefasst in Lu & Triezenberg, 2009). Der Einsatz von Curcumin (20 µM) verminderte die Anzahl infektiöser Nachkommenviren bei einer MOI von 1 PFU/Zelle deutlich (Kutluay *et al.*, 2008), allerdings konnte im Unterschied zur vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 3.21, 3.23) keine Verminderung des Acetylierungsgrades von Histon H3 an Lysin 9 oder Lysin 14 festgestellt werden – möglicherweise wurde der Curcumin-Effekt hier aufgrund der in diesem Experiment höheren MOI von 5 PFU/Zelle durch die vermehrte Aktivität von Acetylierungs-fördernden Proteinen wie ICP0 (vgl. Cliffe & Knipe, 2008) geschmälert. Die Autoren schlussfolgern, die Wirkung von Curcumin beruhe nicht auf der Inhibition der Acetyltransferasen p300 und CBP sondern auf unbekanntem Mechanismen, welche die Assoziation viraler IE-Gene mit der RNA-Polymerase II stören. Auch MTA (1 mM) war in der Lage, die virale DNA-Replikation und Genexpression während einer HSV-1-Infektion mit einer MOI von 5 PFU/Zelle deutlich zu inhibieren (Huang *et al.*, 2006). Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 3.23) konnte passend dazu 1 h p.i. ein Rückgang der Transkriptions-aktivierenden Modifikation H3K4me3 an verschiedenen viralen Loci festgestellt werden, der anscheinend auf einer MTA-bedingten Inhibition der Methyltransferase Set1 beruht. Die Menge an H3K4me2 wurde allerdings durch MTA nicht beeinflusst (vgl. Abb. 3.22). Die Unterschiede zwischen den beiden Publikationen und der vorliegenden Arbeit liegen vermutlich entweder in Unterschieden bei der gewählten MOI und den untersuchten Zeitpunkten nach Infektion oder in von HCMV bzw. HSV-1 verschiedenartig beeinflussten epigenetischen Mechanismen begründet.

4.3 Modell für die epigenetische Regulation der lytischen HCMV-Infektion

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit und verschiedenen Veröffentlichungen zum Thema lässt sich ein vorläufiges Modell für die epigenetische Regulation des lytischen HCMV-Infektionszyklus entwickeln (siehe Abb. 4.3):

Nach Infektion der Wirtszelle wird die Histon-freie DNA aus dem Kapsid in den Zellkern entlassen. Dort beginnt sofort die DNA-Replikations-unabhängige Besetzung mit Nukleosomen, wobei die Besetzungsdichte deutlich unter der des zellulären Genoms bleibt (Phase I). Eventuell ist die Assoziation mit einer gewissen Menge an Nukleosomen günstig für die virale Replikation, da sie die DNA stabilisiert (Hahn, 1965) und epigenetische Regulationsmöglichkeiten bietet; andererseits birgt die Chromatinisierung auch das Risiko transkriptioneller Reprimierung – allerdings ist es für virale Faktoren vielleicht schlicht nicht möglich, eine Besetzung des großen Genoms komplett zu verhindern. Das Modifikationsmuster entspricht in dieser Phase großteils zellulärem Heterochromatin (Phase A). Zu Beginn der Infektion assoziiert zudem ein Teil der Genome mit PML-Körpern, deren Rolle für den Verlauf der Infektion sich schwer beschreiben lässt, da sie sowohl negativen als auch positiven Einfluss zu haben scheinen (Everett & Chelbi-Alix, 2007): HCMV löst – wie auch andere Herpesviren – etwa 4 h p.i. die PML-Körper auf, so dass sich die darin enthaltenen Proteine diffus im Zellkern verteilen (Korioth *et al.*, 1996). Andererseits finden Transkription und DNA-Replikation ebenso wie bei HSV-1 ausschließlich an PML-Körper-assoziierten HCMV-Genomen statt (Ishov *et al.*, 1997; Ahn & Hayward, 2000; Sourvinos & Everett, 2002). Möglicherweise sind die PML-Körper sowohl der Ursprung einer epigenetischen antiviralen Strategie der Zelle, die zur Inaktivierung der HCMV-Genome führen soll, als auch Bestandteil Transkriptions-aktiver Regionen des Zellkerns – auch über eine unterschiedliche funktionelle Ausrichtung verschiedener PML-Körper innerhalb eines Zellkerns wird spekuliert (Bernardi & Pandolfi, 2007). Während die Zelle die eingedrungenen viralen Genome z. B. durch Daxx-vermittelte Reprimierung des MIE-Locus (siehe 1.3) stillzulegen versucht, zielt das Virus eventuell darauf ab, die Transkriptions-aktivierenden Funktionen der PML-Körper zu nutzen, bevor es diese Strukturen mit Hilfe von IE1 komplett auflöst. Je nach Ausgang dieses Interessenkonflikts entstehen in der frühen Phase der Infektion möglicherweise zwei Arten von PML-Körper-assoziierten HCMV-Genomen, die sich in ihrer Nukleosomen-Besetzung und ihrem Histon-Modifikationsmuster unterscheiden: einerseits eine durch die Zelle transkriptionell reprimierte Population mit hohen Mengen von z. B. H3K9me2 – womöglich sind es auch diese Genome, die zumindest am MIE-Locus eine

erhöhte Besetzungsdichte aufweisen, was die Transkriptions-Aktivität zusätzlich vermindern kann. Die zweite postulierte Population ist hingegen von Transkriptions-aktivierenden Histon-Modifikationen an den IE-Genen gekennzeichnet und könnte daher die Hauptquelle viraler Genexpression darstellen. Die zumindest auf Besetzungsebene eindeutig nachgewiesene

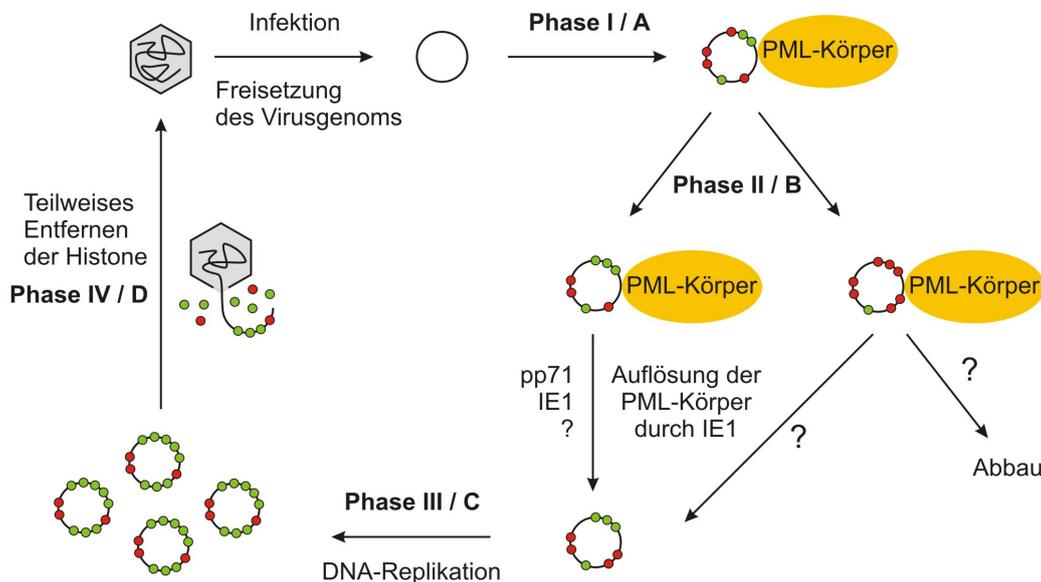


Abb. 4.3 Modell der epigenetischen Regulation der lytischen HCMV-Infektion

Nach Eintritt des HCMV-Genoms in den Wirtszellkern beginnt die initiale Chromatinisierung, das Histon-Modifikationsmuster ist vorwiegend Heterochromatin-artig. Nach Assoziation mit PML-Körpern entwickeln sich vermutlich zwei verschiedene Genompopulationen: eine epigenetisch reprimierte, womöglich stärker chromatinisierte (die später möglicherweise abgebaut wird oder nach Auflösung der PML-Körper in der zweiten Population aufgeht) und eine epigenetisch aktivierte. Im weiteren Verlauf der Infektion wird die Besetzungsdichte wahrscheinlich durch virale Faktoren (z. B. pp71, IE1) gering gehalten, durch IE1 kommt es zur Auflösung der PML-Körper. Mit der DNA-Replikation steigt auch die Nukleosomen-Dichte am HCMV-Genom, das Histon-Modifikationsmuster wird zunehmend Euchromatin-ähnlich. Schließlich werden die Histone von einem Teil der Genome entfernt und es kommt zur erneuten Enkapsidierung und Bildung von Nachkommenviren.

zweite Population könnte allerdings auch aus HCMV-Genomen bestehen, die zu Beginn der Infektion nicht mit PML-Körpern assoziieren. Im weiteren Verlauf der Infektion werden die PML-Körper aufgelöst – womöglich gleichen sich die beiden unterschiedlichen Populationen dann allmählich wieder an, sofern nicht die reprimierten Genome durch Abbau verloren gehen. Bis zum Einsetzen der viralen DNA-Replikation wird die Nukleosomen-Besetzung Hinweisen zufolge durch virale Proteine wie IE1 oder pp71 aktiv niedrig gehalten, um trotz des immer noch eher Heterochromatin-artigen Modifikations-Musters die virale Genexpression zu ermöglichen (Phase II/B). Bei niedriger MOI scheint dieser virale Mechanismus – vielleicht wegen der geringeren Tegument-Menge – nicht seine volle Leistungsfähigkeit zu erreichen, so dass die Nukleosomenbesetzung der viralen DNA erhöht ist, was vielleicht auch zur Verzögerung des Replikationszyklus unter diesen Bedingungen beiträgt. Mit Einsetzen der viralen DNA-Replikation kommt es dann zu einem starken

Anstieg der Nukleosomenbesetzung, der von einer in hohem Maße DNA-Replikations-abhängigen Maschinerie katalysiert wird – die Beteiligung zellulärer Faktoren wie etwa der Histon-Chaperone CAF-1 und ASF1a oder des PCNA-Proteins scheint möglich (Phase III). Zeitgleich mit diesem Besetzungsanstieg, allerdings weitgehend unabhängig von der DNA-Replikation, steigt auch die Menge an Transkriptions-aktivierenden Histon-Modifikationen am viralen Genom – vor allem an den E- und L-Genen – deutlich an, während die Menge an Transkriptions-reprimierendem H3K9me2 absinkt, so dass das Modifikationsmuster nun stark zellulärem Euchromatin ähnelt (Phase C). Dieser Wandel im Histon-Modifikationsmuster könnte die Ursache dafür sein, dass die in der späten Infektionsphase vorliegende dichte Nukleosomenbesetzung kein Hindernis für die virale Genexpression darstellt. Das H3K9me2-Niveau am HCMV-Chromatin bleibt jedoch auch in dieser Phase merklich höher als an transkriptionell aktiven zellulären Genen, möglicherweise ein Hinweis auf weitere, PML-Körper-unabhängige epigenetische Abwehrmechanismen der Zelle. Gegen Ende des viralen Replikationszyklus wird ein Teil der Genome in neu assemblierte Kapside verpackt – da die DNA im Viruspartikel Histon-frei vorliegt, müssen die für die Verpackung bestimmten Genome also komplett von den assoziierten Proteinen befreit werden (Phase IV/D). Mögliche Mechanismen sind ein passives Absinken der Besetzung der replizierten DNA durch die begrenzte Menge an mobilisierbaren Histonen oder ein aktives Freihalten eines Teils der replizierten Genome durch virale Proteine. Am plausibelsten scheint jedoch ein Mechanismus, der die HCMV-DNA kurz vor oder während des Enkapsidierungsprozesses von ihren Nukleosomen befreit, etwa durch ein an der Kapsid-Pore positioniertes Protein.

4.4 Ausblick

Nachdem im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Grundlagen der Chromatinisierung des HCMV-Genoms sowie des Histon-Modifikationsmusters der viralen DNA im Verlauf der lytischen Infektion erarbeitet wurden, stellen sich nun viele Fragen zum detaillierteren Verständnis einiger Mechanismen.

So sollte man die beiden aufgrund der Besetzungsdichte am MIE-Locus differenzierbaren Genompopulationen näher charakterisieren: Erstreckt sich der Besetzungsunterschied über das gesamte Genom oder ist der Effekt auf den MIE-Locus begrenzt? Korrelieren die unterschiedlich stark chromatinisierten Populationen mit den postulierten unterschiedlich modifizierten Populationen? Wie ist die Lokalisation der Populationen in Bezug auf die PML-Körper? Wodurch unterscheiden sich die PML-Körper, die möglicherweise mit der aktiven

bzw. der reprimierten HCMV-Genom-Population assoziiert sind? Wie entscheidet sich, welche Genome aktiviert bzw. reprimiert werden, und lässt sich dieser Prozess zugunsten der Reprimierung beeinflussen, um die zelluläre antivirale Abwehr zu unterstützen?

Auch bezüglich des Mechanismus der Nukleosomen-Entfernung am Ende des viralen Replikationszyklus besteht noch Unklarheit. Sofern auch zu diesem Zeitpunkt unterschiedlich besetzte Genompopulationen existieren, könnte das die Theorie der aktiv (durch virale Proteine) oder passiv (durch Mangel an Histonen) von Histonen freigehaltenen replizierten HCMV-Genome erhärten. Andernfalls rückt die Theorie der Histon-Entfernung bei der Enkapsidierung wieder näher in den Brennpunkt: In diesem Zusammenhang wäre die Suche nach dem oder den beteiligten viralen Protein(en) der nächste Schritt – vermutlich besitzt dieser postulierte Faktor eine ATP-Bindedomäne oder auch eine Helikase-Funktion, um die Histone von der DNA entfernen zu können, zudem lokalisiert er in der späten Infektionsphase wohl in der Nähe der Kapside. Auch Untersuchungen zur Histon-Besetzung mit einer HCMV-Mutante ohne funktionelle Kapsid-Proteine könnten bezüglich des Histon-Entfernungs-Mechanismus aufschlussreich sein.

Die Analyse der Histon-Modifikationen und ihrer Beeinflussung durch Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme sollte ebenfalls noch vertieft werden. So sollten die Daten zum Einfluss der Inhibitoren auf das Histon-Modifikationsmuster reproduziert werden, um mehr Sicherheit bezüglich der epigenetischen Wirkung der Stoffe zu gewinnen – möglicherweise können so auch Locus- oder Gengruppen-spezifische Effekte erkannt werden. Aber auch die wohl vorhandenen nicht-epigenetischen Wirkmechanismen der Inhibitoren zu beleuchten könnte interessant sein – für einen möglichen zukünftigen Einsatz als antivirale Medikamente sind diese Mechanismen vielleicht sogar geeigneter, da sie eventuell Virus-spezifischer sind als die generelle Hemmung von zellulären Histon-modifizierenden Enzymen. Alternativ ließen sich auch einzelne oder Gruppen dieser Enzyme z. B. mittels siRNA ausschalten, um einen gezielteren Effekt auf die Histon-Modifikations-Maschinerie zu erreichen, als es mit den vier verwendeten Inhibitoren möglich war.

Auf der Grundlage der vorliegenden Arbeit bieten epigenetische Prozesse jedenfalls eine Reihe interessanter neuer Eingriffsmöglichkeiten, die langfristig einen wichtigen Beitrag zur Prävention und/oder Therapie von HCMV-assoziierten Krankheiten leisten könnten.

5 Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

- Ahn, J. & Hayward, G. S.** (2000). Disruption of PML-Associated Nuclear Bodies by IE1 Correlates with Efficient Early Stages of Viral Gene Expression and DNA Replication in Human Cytomegalovirus Infection. *Virology* **274**, 39-55.
- Allis, C. D., Berger, S. L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhhattar, R., Shilatifard, A., Workman, J. & Zhang, Y.** (2007). New Nomenclature for Chromatin-Modifying Enzymes. *Cell* **131**, 633-636.
- Avila, M. A., García-Trevijano, E. R., Lu, S. C., Corrales, F. J. & Mato, J. M.** (2004). Methylthioadenosine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 2125-2130.
- Avolio-Hunter, T. M., Lewis, P. N. & Frappier, L.** (2001). Epstein-Barr nuclear antigen 1 binds and destabilizes nucleosomes at the viral origin of latent DNA replication. *Nucleic Acids Research* **29**, 3520-3528.
- Balasubramanyam, K., Swaminathan, V., Ranganathan, A. & Kundu, T. K.** (2003). Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 19134-19140.
- Balasubramanyam, K., Varier, R. A., Altaf, M., Swaminathan, V., Siddappa, N. B., Ranga, U. & Kundu, T. K.** (2004). Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 51163-51171.
- Barbera, A. J., Chodaparambil, J. V., Kelley-Clarke, B., Joukov, V., Walter, J. C., Luger, K. & Kaye, K. M.** (2006). The Nucleosomal Surface as a Docking Station for Kaposi's Sarcoma Herpesvirus LANA. *Science* **311**, 856-861.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. & Zhao, K.** (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* **129**, 823-837.
- Benson, L. J., Gu, Y., Yakovleva, T., Tong, K., Barrows, C., Strack, C. L., Cook, R. G., Mizzen, C. A. & Annunziato, A. T.** (2006). Modifications of H3 and H4 during Chromatin Replication, Nucleosome Assembly, and Histone Exchange. *J. Biol. Chem.* **281**, 9287-9296.
- Bernardi, R. & Pandolfi, P. P.** (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 1006-1016.
- Bernstein, B. E., Meissner, A. & Lander, E. S.** (2007). The Mammalian Epigenome. *Cell* **128**, 669-681.
- Bernstein, E. & Hake, S. B.** (2006). The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* **84**, 505-517.
- Bhende, P. M., Seaman, W. T., Delecluse, H. & Kenney, S. C.** (2004). The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat Genet* **36**, 1099-1104.
- Bird, A.** (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* **16**, 6-21.
- Brown, C. J. & Grealley, J. M.** (2003). A stain upon the silence: genes escaping X inactivation. *Trends in Genetics* **19**, 432-438.
- Cairns, B. R.** (2009). The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* **461**, 193-198.
- Carey, M., Li, B. & Workman, J. L.** (2006). RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation. *Molecular Cell* **24**, 481-487.

- Cedar, H. & Bergman, Y.** (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* **10**, 295-304.
- Chadee, D. N., Taylor, W. R., Hurta, R. A. R., Allis, C. D., Wright, J. A. & Davie, J. R.** (1995). Increased Phosphorylation of Histone H1 in Mouse Fibroblasts Transformed with Oncogenes or Constitutively Active Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 20098-20105.
- Chen, J., Ueda, K., Sakakibara, S., Okuno, T., Parravicini, C., Corbellino, M. & Yamanishi, K.** (2001). Activation of latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by demethylation of the promoter of the lytic transactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4119-4124.
- Chow, J. & Heard, E.** (2009). X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 359-366.
- Clapier, C. R. & Cairns, B. R.** (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual Review of Biochemistry* **78**, 273-304.
- Clarke, J. R. & Tyms, A. S.** (1991). Polyamine biosynthesis in cells infected with different clinical isolates of human cytomegalovirus. *Journal of Medical Virology* **34**, 212-216.
- Cler, E., Papai, G., Schultz, P. & Davidson, I.** (2009). Recent advances in understanding the structure and function of general transcription factor TFIID. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **66**, 2123-2134.
- Cliffe, A. R., Garber, D. A. & Knipe, D. M.** (2009). Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. *Journal of Virology* **83**, 8182-8190.
- Cliffe, A. R. & Knipe, D. M.** (2008). Herpes Simplex Virus ICP0 Promotes both Histone Removal and Acetylation on Viral DNA during Lytic Infection. *Journal of Virology* **82**, 12030-12038.
- Cordaux, R. & Batzer, M. A.** (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* **10**, 691-703.
- Corpet, A. & Almouzni, G.** (2009). Making copies of chromatin: the challenge of nucleosomal organization and epigenetic information. *Trends in Cell Biology* **19**, 29-41.
- Cotter, M. A. & Robertson, E. S.** (1999). The Latency-Associated Nuclear Antigen Tethers the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome to Host Chromosomes in Body Cavity-Based Lymphoma Cells. *Virology* **264**, 254-264.
- Countryman, J. K., Gradoville, L. & Miller, G.** (2008). Histone hyperacetylation occurs on promoters of lytic cycle regulatory genes in Epstein-Barr virus-infected cell lines which are refractory to disruption of latency by histone deacetylase inhibitors. *Journal of Virology* **82**, 4706-4719.
- Crough, T. & Khanna, R.** (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical Microbiology Reviews* **22**, 76-98, Table of Contents.
- Cuevas-Bennett, C. & Shenk, T.** (2008). Dynamic Histone H3 Acetylation and Methylation at Human Cytomegalovirus Promoters during Replication in Fibroblasts. *Journal of Virology* **82**, 9525-9536.
- Damato, E. G. & Winnen, C. W.** (2002). Cytomegalovirus infection: perinatal implications. *Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing: JOGNN / NAACOG* **31**, 86-92.
- 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. *J Gen Virol* **84**, 17-28.

- Day, L., Chau, C. M., Nebozhyn, M., Rennekamp, A. J., Showe, M. & Lieberman, P. M. (2007). Chromatin Profiling of Epstein-Barr Virus Latency Control Region. *Journal of Virology* **81**, 6389–6401.
- De Koning, L., Corpet, A., Haber, J. E. & Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**, 997–1007.
- Deshmane, S. L. & Fraser, N. W. (1989). During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *Journal of Virology* **63**, 943–947.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., Zhou, M. & Zhou, M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491–496.
- Eissenberg, J. C. (2001). Molecular biology of the chromo domain: an ancient chromatin module comes of age. *Gene* **275**, 19–29.
- Eitoku, M., Sato, L., Senda, T. & Horikoshi, M. (2008). Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **65**, 414–444.
- Everett, R. D. & Chelbi-Alix, M. K. (2007). PML and PML nuclear bodies: Implications in antiviral defence. *Biochimie* **89**, 819–830.
- Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O. & Orth, G. (1977). Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *Journal of Virology* **21**, 1205–1209.
- Fejer, G., Koroknai, A., Banati, F., Gyory, I., Salamon, D., Wolf, H., Niller, H. H. & Minarovits, J. (2008). Latency type-specific distribution of epigenetic marks at the alternative promoters Cp and Qp of Epstein-Barr virus. *J Gen Virol* **89**, 1364–1370.
- Ferenczy, M. W. & DeLuca, N. A. (2009). Epigenetic Modulation of Gene Expression from Quiescent Herpes Simplex Virus Genomes. *J. Virol.* **83**, 8514–8524.
- Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H. & Allis, C. D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**, 1116–1122.
- Gandhi, M. K. & Khanna, R. (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet Infectious Diseases* **4**, 725–738.
- Garcia, B. A., Barber, C. M., Hake, S. B., Ptak, C., Turner, F. B., Busby, S. A., Shabanowitz, J., Moran, R. G., Allis, C. D. & Hunt, D. F. (2005). Modifications of human histone H3 variants during mitosis. *Biochemistry* **44**, 13202–13213.
- Gibson, W. & Roizman, B. (1971). Compartmentalization of Spermine and Spermidine in the Herpes Simplex Virion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 2818–2821.
- Giresi, P. G., Kim, J., McDaniell, R. M., Iyer, V. R. & Lieb, J. D. (2007). FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Research* **17**, 877–885.
- Goldberg, A. D., Allis, C. D. & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* **128**, 635–638.
- Greaves, R. F. & Mocarski, E. S. (1998). Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus iel1 mutant. *Journal of Virology* **72**, 366–379.
- Greiner, D., Bonaldi, T., Eskeland, R., Roemer, E. & Imhof, A. (2005). Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat Chem Biol* **1**, 143–145.

- Groth, A., Ray-Gallet, D., Quivy, J., Lukas, J., Bartek, J. & Almouzni, G. (2005). Human Asf1 regulates the flow of S phase histones during replicational stress. *Molecular Cell* **17**, 301-311.
- Groth, A., Rocha, W., Verreault, A. & Almouzni, G. (2007). Chromatin Challenges during DNA Replication and Repair. *Cell* **128**, 721-733.
- Groves, I. J., Reeves, M. B. & Sinclair, J. H. (2009). Lytic infection of permissive cells with human cytomegalovirus is regulated by an intrinsic 'pre-immediate-early' repression of viral gene expression mediated by histone post-translational modification. *J Gen Virol* **90**, 2364-2374.
- Guermah, M., Kim, J. & Roeder, R. G. (2009). Transcription of in vitro assembled chromatin templates in a highly purified RNA polymerase II system. *Methods (San Diego, Calif.)* **48**, 353-360.
- Gwack, Y., Byun, H., Hwang, S., Lim, C. & Choe, J. (2001). CREB-binding protein and histone deacetylase regulate the transcriptional activity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50. *Journal of Virology* **75**, 1909-1917.
- Gwack, Y., Baek, H. J., Nakamura, H., Lee, S. H., Meisterernst, M., Roeder, R. G. & Jung, J. U. (2003). Principal Role of TRAP/Mediator and SWI/SNF Complexes in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus RTA-Mediated Lytic Reactivation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2055-2067.
- Hahn, H. (1965). Stabilization of DNA structure by histones against thermal denaturation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **21**, 90-91.
- Happel, N. & Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* **431**, 1-12.
- Hebbar, P. B. & Archer, T. K. (2008). Altered Histone H1 Stoichiometry and an Absence of Nucleosome Positioning on Transfected DNA. *J. Biol. Chem.* **283**, 4595-4601.
- Heider, J. A., Bresnahan, W. A. & Shenk, T. E. (2002). Construction of a rationally designed human cytomegalovirus variant encoding a temperature-sensitive immediate-early 2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 3141-3146.
- Herrera, F. J. & Triezenberg, S. J. (2004). VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection. *Journal of Virology* **78**, 9689-9696.
- Hoelzer, K., Shackelton, L. A. & Parrish, C. R. (2008). Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. *Nucleic Acids Research* **36**, 2825-2837.
- Hogan, G. J., Lee, C. & Lieb, J. D. (2006). Cell Cycle-Specified Fluctuation of Nucleosome Occupancy at Gene Promoters. *PLoS Genetics* **2**, e158.
- Hollenbach, A. D., McPherson, C. J., Mientjes, E. J., Iyengar, R. & Grosveld, G. (2002). Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *Journal of Cell Science* **115**, 3319-3330.
- Honess, R. W., Gompels, U. A., Barrell, B. G., Craxton, M., Cameron, K. R., Staden, R., Chang, Y. N. & Hayward, G. S. (1989). Deviations from expected frequencies of CpG dinucleotides in herpesvirus DNAs may be diagnostic of differences in the states of their latent genomes. *The Journal of General Virology* **70 (Pt 4)**, 837-855.
- Huang, J., Kent, J. R., Placek, B., Whelan, K. A., Hollow, C. M., Zeng, P., Fraser, N. W. & Berger, S. L. (2006). Trimethylation of Histone H3 Lysine 4 by Set1 in the Lytic Infection of Human Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* **80**, 5740-5746.

- Iberg, A. N., Espejo, A., Cheng, D., Kim, D., Michaud-Levesque, J., Richard, S. & Bedford, M. T. (2008). Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector binding. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 3006-3010.
- Ikegami, K., Ohgane, J., Tanaka, S., Yagi, S. & Shiota, K. (2009). Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development. *The International Journal of Developmental Biology* **53**, 203-214.
- Ingvarsdottir, K. & Blaho, J. A. (2009). Role of viral chromatin structure in the regulation of herpes simplex virus 1 gene expression and replication. *Future Microbiology* **4**, 703-712.
- Ioudinkova, E., Arcangeletti, M. C., Rynditch, A., De Conto, F., Motta, F., Covan, S., Pinardi, F., Razin, S. V. & Chezzi, C. (2006). Control of human cytomegalovirus gene expression by differential histone modifications during lytic and latent infection of a monocytic cell line. *Gene* **384**, 120-128.
- Ishov, A. M., Stenberg, R. M. & Maul, G. G. (1997). Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *The Journal of Cell Biology* **138**, 5-16.
- Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R. & Kadonaga, J. T. (1996). Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 3112-3124.
- Ito, T., Ikehara, T., Nakagawa, T., Kraus, W. L. & Muramatsu, M. (2000). p300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone. *Genes & Development* **14**, 1899-1907.
- Ito, T. (2007). Role of Histone Modification in Chromatin Dynamics. *J Biochem* **141**, 609-614.
- Izzo, A., Kamieniarz, K. & Schneider, R. (2008). The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biological Chemistry* **389**, 333-343.
- Jacobs, J. P., Jones, C. M. & Baille, J. P. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* **227**, 168-170.
- Jiang, C. & Pugh, B. F. (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nature Reviews. Genetics* **10**, 161-172.
- Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K. & Felsenfeld, G. (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nature Genetics* **41**, 941-945.
- Jones, P. A. & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**, 415-428.
- Kent, J. R., Zeng, P., Atanasiu, D., Gardner, J., Fraser, N. W. & Berger, S. L. (2004). During Lytic Infection Herpes Simplex Virus Type 1 Is Associated with Histones Bearing Modifications That Correlate with Active Transcription. *Journal of Virology* **78**, 10178-10186.
- Kim, J., Daniel, J., Espejo, A., Lake, A., Krishna, M., Xia, L., Zhang, Y. & Bedford, M. T. (2006). Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Reports* **7**, 397-403.
- Kimura, H. & Cook, P. R. (2001). Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *The Journal of Cell Biology* **153**, 1341-1353.
- Knipe, D. M. & Cliffe, A. (2008). Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nature Reviews. Microbiology* **6**, 211-221.
- Knipe, D. M., Howley, P. M. & Griffin, D. E. (2006). *Fields Virology 2 Vol Set*. Parental Adviso. Lippincott Williams & Wilkins.

- Kondo, K. & Mocarski, E. S.** (1995). Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Supplementum* **99**, 63-67.
- Korioth, F., Maul, G. G., Plachter, B., Stamminger, T. & Frey, J.** (1996). The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Experimental Cell Research* **229**, 155-158.
- Kornberg, R. D.** (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science (New York, N.Y.)* **184**, 868-871.
- Kouzarides, T.** (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**, 693-705.
- Kubat, N. J., Tran, R. K., McAnany, P. & Bloom, D. C.** (2004). Specific Histone Tail Modification and Not DNA Methylation Is a Determinant of Herpes Simplex Virus Type 1 Latent Gene Expression. *Journal of Virology* **78**, 1139-1149.
- Kutluay, S. B., Doroghazi, J., Roemer, M. E. & Triezenberg, S. J.** (2008). Curcumin inhibits herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity. *Virology* **373**, 239-247.
- Kutluay, S. B. & Triezenberg, S. J.** (2009). Regulation of Histone Deposition on the Herpes Simplex Virus Type 1 Genome during Lytic Infection. *J. Virol.* **83**, 5835-5845.
- Kwiatkowski, D. L., Thompson, H. W. & Bloom, D. C.** (2009). The Polycomb Group Protein Bmi1 Binds to the Herpes Simplex Virus 1 Latent Genome and Maintains Repressive Histone Marks during Latency. *J. Virol.* **83**, 8173-8181.
- Lacasse, J. J. & Schang, L. M.** (2009). During lytic infections, Herpes Simplex Virus Type 1 DNA is in complexes with the properties of unstable nucleosomes. *Journal of Virology* **im Druck**.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Ledford, H.** (2008). Language: Disputed definitions. *Nature* **455**, 1023-1028.
- Lee, J. & Shilatifard, A.** (2007). A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation. *Mutation Research* **618**, 130-134.
- van Leeuwen, H., Okuwaki, M., Hong, R., Chakravarti, D., Nagata, K. & O'Hare, P.** (2003). Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 interacts with TAF-I proteins and inhibits nucleosome assembly but not regulation of histone acetylation by INHAT. *J Gen Virol* **84**, 2501-2510.
- Li, B., Carey, M. & Workman, J. L.** (2007a). The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* **128**, 707-719.
- Li, B., Gogol, M., Carey, M., Lee, D., Seidel, C. & Workman, J. L.** (2007b). Combined Action of PHD and Chromo Domains Directs the Rpd3S HDAC to Transcribed Chromatin. *Science* **316**, 1050-1054.
- Lieberman, P. M.** (2008). Chromatin organization and virus gene expression. *Journal of Cellular Physiology* **216**, 295-302.
- Lilley, C., Chaurushiya, M., Shanbhag, N., Greenberg, R. & Weitzman, M.** (2009). HSV-1 ICP0 leads to the loss of ubiquitinated H2A: implications for silencing. *Präsentation beim 34. International Herpesvirus Workshop (IHW)*.
- Lim, C., Lee, D., Seo, T., Choi, C. & Choe, J.** (2003). Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus functionally interacts with heterochromatin protein 1. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 7397-7405.

- Lomonte, P., Sullivan, K. F. & Everett, R. D.** (2001). Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 5829-5835.
- Lomonte, P., Thomas, J., Texier, P., Caron, C., Khochbin, S. & Epstein, A. L.** (2004). Functional Interaction between Class II Histone Deacetylases and ICP0 of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* **78**, 6744-6757.
- Lu, F., Zhou, J., Wiedmer, A., Madden, K., Yuan, Y. & Lieberman, P. M.** (2003). Chromatin Remodeling of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF50 Promoter Correlates with Reactivation from Latency. *Journal of Virology* **77**, 11425-11435.
- Lu, X. & Triezenberg, S. J.** (2009). Chromatin assembly on herpes simplex virus genomes during lytic infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*.
- Ludwig, A. & Hengel, H.** (2009). Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* **14**, 26-32.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J.** (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- Luijsterburg, M. S., White, M. F., van Driel, R. & Dame, R. T.** (2008). The major architects of chromatin: architectural proteins in bacteria, archaea and eukaryotes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **43**, 393-418.
- Malm, G. & Engman, M.** (2007). Congenital cytomegalovirus infections. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* **12**, 154-159.
- Marcu, M. G., Jung, Y., Lee, S., Chung, E., Lee, M., Trepel, J. & Neckers, L.** (2006). Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase. *Medicinal Chemistry (Shāriqah (United Arab Emirates))* **2**, 169-174.
- Maxwell, K. L. & Frappier, L.** (2007). Viral Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**, 398-411.
- McKittrick, E., Gafken, P. R., Ahmad, K. & Henikoff, S.** (2004). Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1525-1530.
- McVoy, M. A. & Adler, S. P.** (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *Journal of Virology* **68**, 1040-1051.
- Miller, M. S. & Hertel, L.** (2009). Onset of Human Cytomegalovirus Replication in Fibroblasts Requires the Presence of an Intact Vimentin Cytoskeleton. *J. Virol.* **83**, 7015-7028.
- Minarovits, J.** (2006). Epigenotypes of latent herpesvirus genomes. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **310**, 61-80.
- Modrow, S., Falke, D. & Truyen, U.** (2002). *Molekulare Virologie. Eine Einführung für Biologen und Mediziner*. 2. ed. Spektrum Akademischer Verlag.
- Moorman, N. J., Cristea, I. M., Terhune, S. S., Rout, M. P., Chait, B. T. & Shenk, T.** (2008). Human Cytomegalovirus Protein UL38 Inhibits Host Cell Stress Responses by Antagonizing the Tuberos Sclerosis Protein Complex. *Cell Host & Microbe* **3**, 253-262.
- Muggeridge, M. I. & Fraser, N. W.** (1986). Chromosomal organization of the herpes simplex virus genome during acute infection of the mouse central nervous system. *Journal of Virology* **59**, 764-767.

- Nevels, M., Paulus, C. & Shenk, T.** (2004). Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17234-17239.
- Niehrs, C.** (2009). Active DNA demethylation and DNA repair. *Differentiation; Research in Biological Diversity* **77**, 1-11.
- Nitzsche, A., Paulus, C. & Nevels, M.** (2008). Temporal dynamics of cytomegalovirus chromatin assembly in productively infected human cells. *Journal of Virology* **82**, 11167-80.
- Nowak, S. J. & Corces, V. G.** (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics: TIG* **20**, 214-220.
- Oh, J. & Fraser, N. W.** (2008). Temporal Association of the Herpes Simplex Virus Genome with Histone Proteins during a Lytic Infection. *Journal of Virology* **82**, 3530-3537.
- Pal, S., Vishwanath, S. N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sif, S.** (2004). Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 9630-9645.
- Pantry, S. N. & Medveczky, P. G.** (2009). Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication. *Seminars in Cancer Biology* **19**, 153-157.
- Pari, G. S.** (2008). Nuts and bolts of human cytomegalovirus lytic DNA replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **325**, 153-166.
- Park, Y. & Luger, K.** (2008). Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange. *Current Opinion in Structural Biology* **18**, 282-289.
- Pass, R. F., Stagno, S., Myers, G. J. & Alford, C. A.** (1980). Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-up. *Pediatrics* **66**, 758-762.
- Paulus, C., Nitzsche, A. & Nevels, M.** (2010). Chromatinisation of herpesvirus genomes. *Reviews in Medical Virology* **20**, 34-50.
- Placek, B. J., Huang, J., Kent, J. R., Dorsey, J., Rice, L., Fraser, N. W. & Berger, S. L.** (2009). The Histone Variant H3.3 Regulates Gene Expression during Lytic Infection with Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* **83**, 1416-1421.
- Plotkin, S. A., Furukawa, T., Zygraich, N. & Huygelen, C.** (1975). Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infection and Immunity* **12**, 521-527.
- Ponder, B. A., Crew, F. & Crawford, L. V.** (1978). Comparison of nuclease digestion of polyoma virus nucleoprotein complex and mouse chromatin. *Journal of Virology* **25**, 175-186.
- Prigent, C. & Dimitrov, S.** (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* **116**, 3677-3685.
- Probst, A. V., Dunleavy, E. & Almouzni, G.** (2009). Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 192-206.
- Puto, L. A. & Reed, J. C.** (2008). Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation. *Genes & Development* **22**, 998-1010.
- Reeves, M., Murphy, J., Greaves, R., Fairley, J., Brehm, A. & Sinclair, J.** (2006). Autorepression of the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Promoter/Enhancer at Late Times of Infection Is Mediated by the Recruitment of Chromatin Remodeling Enzymes by IE86. *Journal of Virology* **80**, 9998-10009.

- Reik, W. & Walter, J.** (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Reviews. Genetics* **2**, 21-32.
- Reinberg, D. & Sims, R. J.** (2006). de FACTo nucleosome dynamics. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 23297-23301.
- Reitberger, C.** (2008). Molekulare Untersuchungen zur Lokalisation und Modifikation von Histonen in Zytomegalievirus-infizierten humanen Fibroblasten. *Diplomarbeit, Universität Regensburg*.
- Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J. & David Allis, C.** (2007). Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 983-994.
- Saffert, R. T. & Kalejta, R. F.** (2006). Inactivating a Cellular Intrinsic Immune Defense Mediated by Daxx Is the Mechanism through Which the Human Cytomegalovirus pp71 Protein Stimulates Viral Immediate-Early Gene Expression. *J. Virol.* **80**, 3863-3871.
- Saffert, R. T. & Kalejta, R. F.** (2007). Human Cytomegalovirus Gene Expression Is Silenced by Daxx-Mediated Intrinsic Immune Defense in Model Latent Infections Established In Vitro. *J. Virol.* **81**, 9109-9120.
- Saffert, R. T. & Kalejta, R. F.** (2008). Promyelocytic leukemia-nuclear body proteins: herpesvirus enemies, accomplices, or both? *Future Virology* **3**, 265-277.
- Sakakibara, S., Ueda, K., Nishimura, K., Do, E., Ohsaki, E., Okuno, T. & Yamanishi, K.** (2004). Accumulation of heterochromatin components on the terminal repeat sequence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus mediated by the latency-associated nuclear antigen. *Journal of Virology* **78**, 7299-7310.
- Schleiss, M. R.** (2008). Cytomegalovirus vaccine development. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **325**, 361-382.
- Shahbazian, M. D. & Grunstein, M.** (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annual Review of Biochemistry* **76**, 75-100.
- Shaw, J. E., Levinger, L. F. & Jr, C. W. C.** (1979). Nucleosomal structure of Epstein-Barr virus DNA in transformed cell lines. *Journal of Virology* **29**, 657-665.
- Shi, X., Kachirskaja, I., Walter, K. L., Kuo, J. A., Lake, A., Davrazou, F., Chan, S. M., Martin, D. G. E., Fingerman, I. M., Briggs, S. D., Howe, L., Utz, P. J., Kutateladze, T. G., Lugovskoy, A. A., Bedford, M. T. & Gozani, O.** (2007). Proteome-wide analysis in *Saccharomyces cerevisiae* identifies several PHD fingers as novel direct and selective binding modules of histone H3 methylated at either lysine 4 or lysine 36. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 2450-2455.
- Shibahara, K. & Stillman, B.** (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* **96**, 575-585.
- Shilatifard, A.** (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annual Review of Biochemistry* **75**, 243-269.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J., Pazin, M. J., Davie, J. R. & Peterson, C. L.** (2006). Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. *Science* **311**, 844-847.
- Shukla, A., Chaurasia, P. & Bhaumik, S. R.** (2009). Histone methylation and ubiquitination with their crosstalk and roles in gene expression and stability. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **66**, 1419-1433.
- Silva, M. C., Yu, Q., Enquist, L. & Shenk, T.** (2003). Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. *Journal of Virology* **77**, 10594-10605.

- Sinclair, J.** (2008). Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *Journal of Clinical Virology* **41**, 180-185.
- Sinclair, J.** (2009). Chromatin structure regulates human cytomegalovirus gene expression during latency, reactivation and lytic infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms im Druck*.
- Smith, B. C. & Denu, J. M.** (2009). Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1789**, 45-57.
- Smith, C. L.** (2008). A shifting paradigm: histone deacetylases and transcriptional activation. *BioEssays* **30**, 15-24.
- Sourvinos, G. & Everett, R. D.** (2002). Visualization of parental HSV-1 genomes and replication compartments in association with ND10 in live infected cells. *The EMBO Journal* **21**, 4989-4997.
- Stedman, W., Deng, Z., Lu, F. & Lieberman, P. M.** (2004). ORC, MCM, and Histone Hyperacetylation at the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latent Replication Origin. *Journal of Virology* **78**, 12566-12575.
- Steininger, C.** (2007). Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **13**, 953-963.
- Strahl, B. D. & Allis, C. D.** (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Strahl, B. D., Briggs, S. D., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Koh, S. S., Ma, H., Cook, R. G., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Stallcup, M. R. & Allis, C. D.** (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Current Biology: CB* **11**, 996-1000.
- Strohner, R., Wachsmuth, M., Dachauer, K., Mazurkiewicz, J., Hochstatter, J., Rippe, K. & Langst, G.** (2005). A 'loop recapture' mechanism for ACF-dependent nucleosome remodeling. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 683-690.
- Szyf, M., Eliasson, L., Mann, V., Klein, G. & Razin, A.** (1985). Cellular and viral DNA hypomethylation associated with induction of Epstein-Barr virus lytic cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 8090-8094.
- Szyf, M.** (2009). Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **49**, 243-263.
- Tavalai, N. & Stamminger, T.** (2008). New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1783**, 2207-2221.
- Taylor, T. J. & Knipe, D. M.** (2004). Proteomics of Herpes Simplex Virus Replication Compartments: Association of Cellular DNA Replication, Repair, Recombination, and Chromatin Remodeling Proteins with ICP8. *J. Virol.* **78**, 5856-5866.
- Teytelman, L., Ozaydin, B., Zill, O., Lefrançois, P., Snyder, M., Rine, J. & Eisen, M. B.** (2009). Impact of chromatin structures on DNA processing for genomic analyses. *PLoS One* **4**, e6700.
- Torras-Llort, M., Moreno-Moreno, O. & Azorín, F.** (2009). Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *The EMBO Journal* **28**, 2337-2348.
- Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchock, B. A. & Blobel, G. A.** (2005). Histone H3 Lysine 9 Methylation and HP1[gamma] Are Associated with Transcription Elongation through Mammalian Chromatin. *Molecular Cell* **19**, 381-391.

- Vermeulen, M., Mulder, K. W., Denissov, S., Pijnappel, W. W. M. P., van Schaik, F. M. A., Varier, R. A., Baltissen, M. P. A., Stunnenberg, H. G., Mann, M. & Timmers, H. T. M. (2007). Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* **131**, 58-69.
- Walter, W., Clynes, D., Tang, Y., Marmorstein, R., Mellor, J. & Berger, S. L. (2008). 14-3-3 Interaction with Histone H3 Involves a Dual Modification Pattern of Phosphoacetylation. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 2840-2849.
- Wang, Q., Zhou, C., Johnson, K. E., Colgrove, R. C., Coen, D. M. & Knipe, D. M. (2005). Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16055-16059.
- Wang, Z., Schones, D. E. & Zhao, K. (2009). Characterization of human epigenomes. *Current Opinion in Genetics & Development* **19**, 127-134.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D. E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T., Peng, W., Zhang, M. Q. & Zhao, K. (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* **40**, 897-903.
- Wasyluk, B. & Chambon, P. (1979). Transcription by eukaryotic RNA polymerases A and B of chromatin assembled in vitro. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **98**, 317-327.
- Wensing, B., Stühler, A., Jenkins, P., Hollyoake, M., Karstegl, C. E. & Farrell, P. J. (2001). Variant Chromatin Structure of the oriP Region of Epstein-Barr Virus and Regulation of EBER1 Expression by Upstream Sequences and oriP. *Journal of Virology* **75**, 6235-6241.
- Winterling, C. (2009). Einfluss des Zytomegalievirus IE1-Proteins auf die virale Chromatinstruktur und die zelluläre DNA-Schadensantwort. *Diplomarbeit, Universität Regensburg*.
- Woodhall, D. L., Groves, I. J., Reeves, M. B., Wilkinson, G. & Sinclair, J. H. (2006). Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 37652-37660.
- Workman, J. L. (2006). Nucleosome displacement in transcription. *Genes & Development* **20**, 2009-2017.
- Wu, D. Y., Kalpana, G. V., Goff, S. P. & Schubach, W. H. (1996). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1. *Journal of Virology* **70**, 6020-6028.
- Wysocka, J., Allis, C. D. & Coonrod, S. (2006). Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* **11**, 344-355.
- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T. A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A. L., Roeder, R. G., Brivanlou, A. H. & Allis, C. D. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* **121**, 859-872.
- Xu, C., Cui, G., Botuyan, M. V. & Mer, G. (2008). Structural Basis for the Recognition of Methylated Histone H3K36 by the Eaf3 Subunit of Histone Deacetylase Complex Rpd3S. *Structure* **16**, 1740-1750.
- Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H. A., Chen, W., Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Serebriiskii, I. G., Canutescu, A. A., Dunbrack, R. L., Pehrson, J. R., Berger, J. M., Kaufman, P. D. & Adams, P. D. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Developmental Cell* **8**, 19-30.
- Zhu, H., Shen, Y. & Shenk, T. (1995). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *Journal of Virology* **69**, 7960-7970.

5.2 Abkürzungsverzeichnis

ASF1a	<i>anti-silencing function 1 (a-Isoform)</i>	MBD	Methyl-Bindedomäne
ATRX	<i>α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked protein</i>	MBD1/2	<i>methyl-CpG-binding domain protein 1/2</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>	MBT	<i>malignant brain tumor</i>
bp	Basenpaar(e)	MeCP2	<i>methyl-CpG-binding protein 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	MIE	<i>major immediate early</i>
BZLF1	<i>BamHI Z left frame 1</i>	MLL	<i>mixed-lineage leukaemia protein</i>
CAF-1	<i>chromatin assembly factor 1</i>	MNase	Mikrokokken-Nuklease
CBP	<i>CREB-binding protein</i>	MOI	<i>multiplicity of infection</i>
CENP-A	<i>centromere protein A</i>	MSK1/2	<i>mitogen- & stress-activated kinase 1/2</i>
CHD	<i>chromodomain, helicase, DNA binding</i>	MTA	<i>5'-Deoxy-5'-(methylthio)adenosin</i>
CLT	<i>CMV latency-associated transcript</i>	MyoD	<i>myoblast determination protein</i>
CoA	Koenzym A	MYST	<i>MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60</i>
CREB	<i>cAMP-response element-binding protein</i>	NAP-1	<i>nucleosome assembly protein 1</i>
Daxx	<i>death domain-associated protein 6</i>	NEB	New England Biolabs
DMSO	Dimethylsulfoxid	NuA4	<i>nuclear acetyltransferase complex</i>
Dnmt	DNA (Cytosin-5)-Methyltransferase	NURF	<i>nucleosome remodelling factor</i>
DOT1	<i>disruptor of telomere silencing protein 1</i>	OD	Optische Dichte
E	<i>early</i>	PAA	Phosphonoessigsäure
Eaf3	<i>ESA1-associated factor 3</i>	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
EBER	<i>EBV-encoded RNA</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
EBNA	<i>EBV nuclear antigen</i>	PCAF	<i>p300/CBP-associated factor</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus	PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PDB	<i>protein data bank</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat	PFA	Paraformaldehyd
FACT	<i>facilitator of chromatin transactions</i>	PFU	<i>plaque-forming unit</i>
Gcn5	<i>general control of amino-acid synthesis</i>	PHD	<i>plant homeodomain</i>
GNAT	<i>Gcn5-related N-acetyltransferase</i>	p.i.	post infectionem
HAT	Histon-Acetyltransferase	PML	<i>promyelocytic leukaemia protein</i>
HCMV	humanes Cytomegalievirus	ppULX	HCMV Phosphoprotein (codiert von ULX)
HDAC	Histon-Deacetylase	ppX	HCMV Phosphoprotein X
HDM	Histon-Demethylase	PRMT	Protein-Arginin-N-Methyltransferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure	pULX	HCMV Protein (codiert von ULX)
HIRA	<i>histone regulator A</i>	Rpd3S	<i>reduced potassium dependency 3</i>
HMT	Histon-Methyltransferase	RPL30	Ribosomales Protein L30
HP1	Heterochromatin-Protein 1	Rta	<i>replication and transcription activator</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
HSV-1/2	Herpes-simplex-Virus 1/2	SET	<i>Su(var)3-9, enhancer of zeste, Trithorax</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration	Snf1	<i>sucrose-nonfermenting 1</i>
ICP	<i>infected cell protein</i>	SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
IE	<i>immediate early</i>	SUV39H1/2	<i>suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>
IKK- α	I κ B kinase α	SWI/SNF	<i>switching defective/sucrose nonfermenting</i>
INO80	<i>inositol requiring 80</i>	TAF-I	<i>template activating factor I</i>
ISWI	<i>imitation switch</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
JHDM	<i>jumonji histone demethylase</i>	U	unit (1U = 16,67 nkat)
JMJD	<i>jumonji domain containing</i>	UL	<i>unique long (HCMV-Gennomenklatur)</i>
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus	VP	<i>virion protein</i>
L	<i>late</i>	WD40	<i>GHX₂₃₋₄₁ WD-Aminosäure-Motif</i>
LANA	<i>latency-associated nuclear antigen</i>	XIST-RNA	<i>X inactive-specific transcript-RNA</i>
LAT	<i>latency-associated transcript</i>	Zta (=ZEBRA)	<i>BamHI Z Epstein-Barr replication activator</i>
LMP	<i>latent membrane protein</i>		
LSD1	<i>lysine-specific histone demethylase 1</i>		
LUNA	<i>latency-associated nuclear antigen</i>		

5.3 Veröffentlichungen

Posterpräsentationen bei Fachtagungen

Nitzsche A, Paulus C, Nevels M "Chromatin Structure of Human Cytomegalovirus Genomes in Infected Fibroblasts" Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Nürnberg 2007

Paulus C, Bergbauer M, Nitzsche A, Nevels M "Global Epigenetic Host Cell Activation by Human Cytomegalovirus" Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Nürnberg 2007

Nitzsche A, Paulus C, Nevels M "Interfering with Human Cytomegalovirus Replication by Manipulating the Histone Modification Pattern of Viral Chromosomes" International Herpesvirus Workshop, Ithaca (NY) 2009

Vorträge bei Fachtagungen

Nitzsche A, Paulus C, Bergbauer M, Nevels M "Epigenetic Signature of Human Cytomegalovirus Genomes in Infected Fibroblasts" Mini-Herpesvirus Workshop, Berlin 2006

Nitzsche A, Paulus C, Bergbauer M, Nevels M "Epigenetic Regulation of CMV Infection" Mini-Herpesvirus Workshop, Berlin 2007

Nitzsche A, Paulus C, Nevels M "A Four-Phase Model of Human Cytomegalovirus Chromatin Assembly and Disassembly during Lytic Infection" Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Heidelberg 2008

Nitzsche A, Paulus C, Nevels M "Interfering with Human Cytomegalovirus Replication by Manipulating the Histone Modification Pattern of Viral Chromosomes" International Herpesvirus Workshop, Ithaca (NY) 2009

Artikel in Fachzeitschriften

Nitzsche A, Paulus C, Nevels M "Temporal dynamics of cytomegalovirus chromatin assembly in productively infected human cells" Journal of Virology 82, 11167-80

Paulus C, Nitzsche A, Nevels M "Chromatinisation of herpesvirus genomes" Reviews in Medical Virology 20, 34-50

Danksagung

Frau Dr. Christina Paulus und **Herrn PD Dr. Michael Nevels** danke ich sehr herzlich für die Förderung und die hervorragende Betreuung während jeder Phase der Arbeit. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft, ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion, ihre wertvollen Anregungen sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Herrn PD Dr. Michael Nevels danke ich außerdem für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Gernot Längst danke ich vielmals für die Übernahme des Erstgutachtens, die für eine "externe" Promotion unerlässlich war.

Besonderer Dank gebührt auch **Herrn Prof. Dr. Hans Wolf** für die guten Arbeitsbedingungen an seinem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene.

Bei allen ehemaligen und aktuellen **Mitgliedern der Arbeitsgruppe** bedanke ich mich herzlich für die große Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre, ohne die der Laboralltag deutlich weniger angenehm gewesen wäre.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. Christina Paulus und Carla Winterling für die Durchführung des Western Blots in Abb. 3.12 A, Herrn Dr. Jörg Schröer für die Hilfe bei der konfokalen Mikroskopie sowie Theresa Knoblach und Carla Winterling für die Unterstützung bei der parallelen Durchführung der Western Blots in Abb. 3.20.

Auch bei allen nicht namentlich genannten **Kolleginnen und Kollegen** am Institut möchte ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Katharina Gmelch, Ulrike Stöckl und Hannah Götze vom **Lehrstuhl für Biochemie III** danke ich für die freundliche Einweisung in die Technik der Psoralen-Quervernetzungsanalyse.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinen **Freunden** und meiner **Familie** und ganz besonders **Benedikt** für die Unterstützung während der Promotion.