

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Labor für pädiatrische Molekularbiologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# **Regulation des Zellzyklus durch das Maus- und Ratten-Zytomegalievirus**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Anke Neuwirth  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. C. Hagemeyer
2. Priv.-Doz. Dr. med. Chr. Sinzger
3. Prof. Dr. R. Heilbronn

**DATUM DER PROMOTION: 21.11.2005**

**Diese Arbeit widme ich meinen Eltern und meiner Schwester.**

## INHALT

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Familie der <i>Herpesviridae</i></b>	<b>7</b>
<b>1.2 Zytomegalieviren</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Humanes Zytomegalievirus</b>	<b>9</b>
1.3.1 Epidemiologie, Transmission	10
1.3.2 Klinik der HCMV Infektion	10
1.3.3 CMV als Ursache hyperproliferativer Erkrankungen	11
<b>1.4 Der Zellzyklus</b>	<b>12</b>
1.4.1 Regulation des Zellzyklus	12
1.4.2 Einfluss des humanen CMV auf den Zellzyklus	15
<b>1.5 Tiermodelle für die HCMV Infektion</b>	<b>18</b>
1.5.1 Ratten-Zytomegalievirus	19
1.5.2 Murines Zytomegalievirus	19
1.5.3 Nager-CMV als Tiermodell	19
<b>1.6 Fragestellung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Lösungen</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Zellkulturmedien</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Zellkultur</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Virusanzucht und Virustiterung</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Infektionen</b>	<b>23</b>
<b>2.6 Synchronisation der Zellpopulationen</b>	<b>24</b>
2.6.1 Serumentzug	24
2.6.2 Behandlung mit Nocodazol	24
<b>2.7 Zellernte</b>	<b>25</b>

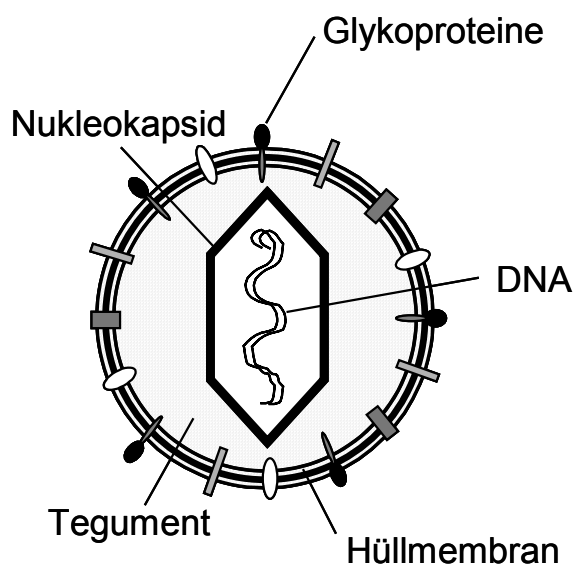
<b>2.8</b>	<b>Durchflußzytometrische Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts</b>	<b>25</b>
<b>2.9</b>	<b>Zellextraktion</b>	<b>25</b>
<b>2.10</b>	<b>Chromatinextraktion</b>	<b>26</b>
<b>2.11</b>	<b>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</b>	<b>26</b>
<b>2.12</b>	<b>Immunoblot-Analysen</b>	<b>27</b>
<b>2.13</b>	<b>Comassiefärbung</b>	<b>29</b>
<b>2.14</b>	<b>Bestimmung von Zyklin-assozierten Kinaseaktivitäten</b>	<b>29</b>
<b>2.15</b>	<b>BrdU-Einbauexperimente / Bestimmung der Histon H3 Phosphorylierung</b>	<b>30</b>
<b>2.16</b>	<b>Behandlung mit Lambda Phosphatase</b>	<b>30</b>
<b>2.17</b>	<b>Chromosomenpräparation</b>	<b>30</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Inhibition der Zellproliferation durch MCMV und RCMV</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Blockierung der Zellzyklusprogression durch MCMV und RCMV</b>	<b>32</b>
<b>3.3</b>	<b>Der späte Zellzyklusarrest liegt in der G2-Phase und nicht in der Mitose</b>	<b>40</b>
<b>3.4</b>	<b>MCMV und RCMV replizieren sowohl in G1 als auch in G2</b>	<b>41</b>
<b>3.5</b>	<b>Deregulation molekularer Zellzyklusregulatoren durch M/RCMV</b>	<b>46</b>
3.5.1	Repression der Zyklin D1-assozierten Kinaseaktivität	46
3.5.2	Einfluss von MCMV und RCMV auf die Zyklin E Expression	49
3.5.3	Einfluss von MCMV und RCMV auf Zyklin A, Zyklin B1 und CDK1	51
<b>3.6</b>	<b>RCMV, aber nicht MCMV verhindert <i>replication licensing</i></b>	<b>54</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Inhibition der Zellproliferation und Position des Arrestes im Zellzyklus</b>	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b>Mechanismus des neuartigen durch M/RCMV verursachten G2-Arrestes</b>	<b>57</b>
<b>4.3</b>	<b>Virale Repression von Zyklin D1</b>	<b>58</b>

<b>4.4 Neuartige Zyklin E- Phosphorylierung in Nager-CMV infizierten Zellen</b>	<b>59</b>
<b>4.5 Zyklin A, Zyklin B und CDK1</b>	<b>60</b>
<b>4.6 G1-Arrest als gemeinsames Merkmal aller CMV</b>	<b>63</b>
<b>4.7 Tiermodell für HCMV- Zellzyklusregulation, ein Ausblick</b>	<b>65</b>
<b>5. LITERATUR</b>	<b>67</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>79</b>
<b>7. ANHANG</b>	<b>81</b>
<b>7.1 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>7.2 Publikationen</b>	<b>83</b>
<b>7.3 Selbständigkeitserklärung</b>	<b>84</b>
<b>7.4 Danksagung</b>	<b>85</b>
<b>7.5 Lebenslauf</b>	Fehler! Textmarke nicht definiert.

## 1. Einleitung

### 1.1 Familie der *Herpesviridae*

Die Zugehörigkeit eines Virus zur Familie der *Herpesviridae* wird durch den Aufbau seines Virions bestimmt. Das *Virus-Core* besteht aus einer fibrillären Proteinmatrix, welche mit der linear doppelsträngigen DNA assoziiert ist und in einem ikosaedrischen Kapsid liegt. Dieses wird von einer unstrukturierten Proteinmatrix dem Tegument umgeben und von einer Hüllmembran, die mehrere virale Glykoproteine enthält, begrenzt (Roizman und Pellett, 2001).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des allgemeinen Aufbaus eines Herpesvirion.

Bis heute wurden ca. 130, in der Natur weitverbreitete, Herpesviren identifiziert. Die Familie der *Herpesviridae* wird unterteilt in die Subfamilien  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Sie unterscheiden sich in ihrem Wirtsspektrum, der Dauer des Replikationszyklus sowie in ihren spezifischen Interaktionen mit der Wirtszelle. Zu den humanpathogenen Herpesviren zählen: Herpes simplex Virus Typ 1 und 2 (HSV-1/ HSV-2), Varicella Zoster Virus (VZV), Epstein-Barr Virus (EBV), die humanen Herpesviren 6A, 6B, 7 und 8 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 und HHV-8) und das humane Zytomegalievirus (HCMV; in der gesamten Arbeit wird die anerkannte, gebräuchliche Abkürzung verwendet, die dem englischen Sprachgebrauch entstammt).

Die bekannten Herpesviren teilen folgende biologische Eigenschaften:

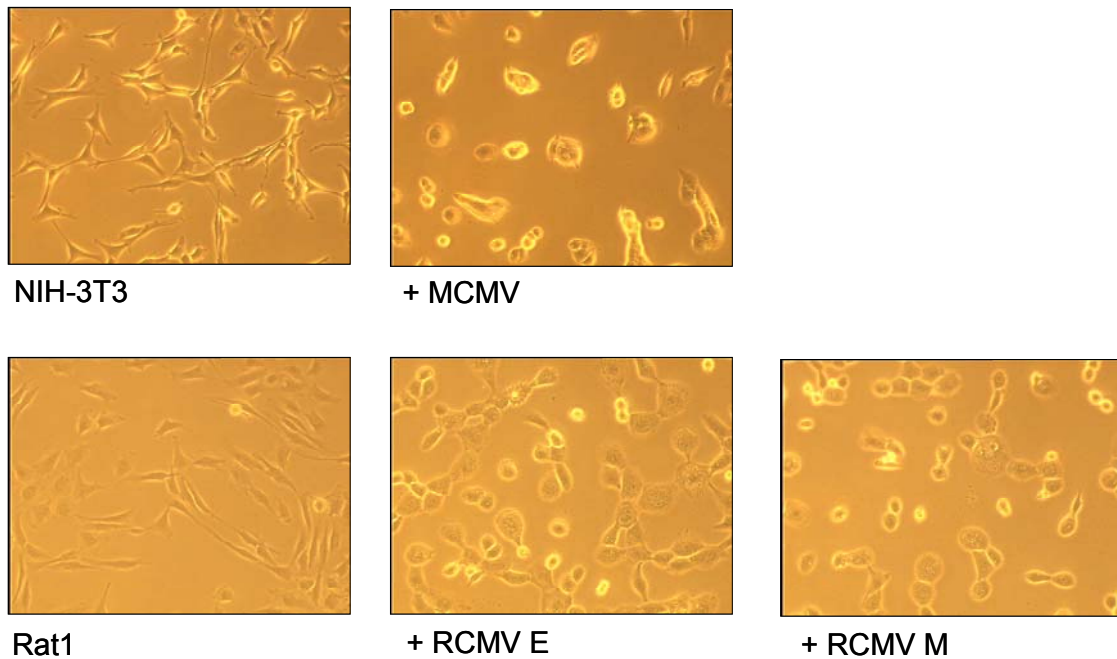
- Sie verfügen über eine Reihe an Enzymen, die am Nukleinsäurestoffwechsel, der DNA-Synthese und der Proteinprozessierung beteiligt sind.

- Die Synthese viraler DNA und der Zusammenbau des Kapsids geschieht im Nukleus. Durch die Produktion infektiöser Nachkommen wird die Wirtszelle zerstört.
- Nach der Primärinfektion persistieren Herpesviren lebenslang im Wirtsorganismus. Herpesviren finden sich in ihrer Latenz in verschiedenen Zelltypen (HSV in sensorischen Nervenganglien, EBV in B-Lymphozyten) und können durch bestimmte Voraussetzungen, wie Immunsuppression, aus ihrem latenten Status reaktiviert werden. Die Mechanismen, die zur Reaktivierung des Virus aus der Latenz führen sind bisher weitgehend ungeklärt.
- Herpesviren führen sowohl zu subklinischen als auch zu akuten, chronisch aktiven und sogar neoplastischen Verlaufsformen (siehe unten).

Während einer produktiven Infektion übernehmen bereits bei der Penetration des Virus in die Wirtszelle fertige Virionproteine regulative Funktionen. Die dann folgende Expression viraler Genprodukte wird in drei Phasen unterteilt. Die erste Phase beginnt kurz nach Eindringen des Virus in den Zellkern mit der Expression von  $\alpha$  (*immediate-early*) Genen, die der Interaktion mit der Wirtszelle und der Transaktivierung sowohl zellulärer als auch viraler Gene dienen. Die  $\beta$  (*early*) Gen-Expression der zweiten Phase ist abhängig von der Expression der *immediate-early* Gene, geschieht aber definitionsgemäß unabhängig von viraler DNA-Synthese, an der sie teilweise selbst beteiligt ist. In der dritten Phase ist der Beginn der viralen DNA-Synthese Voraussetzungen für die Expression der  $\gamma$  (*late*) Gene. Sie kodieren überwiegend die Strukturproteine des Virions.

### 1.2 Zytomegalieviren

Die ubiquitär vorkommenden Zytomegalieviren gehören zur Gruppe der *Beta-Herpesviridae*. Ihr Genom zählt zu den größten aller bekannten Viren. Es besitzt die typische Virion-Struktur der Herpesviren und kann in seinem Wirt, wie alle anderen Herpesviren, im latenten Zustand verbleiben. Sie heben sich von den anderen Herpesviren vor allem durch ihre ausgeprägte Speziespezifität, den Befall der Speicheldrüse, die langsame Vermehrung in der Zellkultur und den charakteristischen zytopathischen Effekt (CPE) ab. Der Name „Zytomegalievirus“ weist bereits auf den CPE hin (Kytos = Zelle, megalo = gross): akut infizierte Zellen erscheinen als Riesenzellen mit Zellkern-Einschlusskörperchen, den sogenannten „Eulenaugen“ (siehe Abb. 2) (Mocarski, 2001).



**Abbildung 2:** Der zytopathische Effekt von Zytomegalieviren. Mikroskopische Aufnahmen von uninfizierten NIH-3T3 und Rat1 Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit Maus- und Ratten-Zytomegalievirus (MCMV und RCMV) infiziert wurden und einen deutlichen CPE zeigen.

### 1.3 Humanes Zytomegalievirus

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) ist das bestuntersuchte Zytomegalievirus. Sein Genom umfasst 230 bis 240 kbp und beinhaltet ungefähr 180 nichtüberlappende offene Leseraster (ORFs). Die primäre HCMV Infektion des immunkompetenten Wirtes verläuft meist inapparent. Die Disseminierung des Virus erfolgt überwiegend durch Leukozyten und vaskuläre Endothelzellen (Gerna *et al.*, 1992; Turtinen *et al.*, 1987).

Üblicherweise wird HCMV durch das kompetente Immunsystem in Schach gehalten. Jedoch hat das Virus unterschiedliche Methoden entwickelt, mit der es der Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes entgehen kann. Dadurch versucht es sein eigenes Überleben und die virale Replikation zu sichern. Es wurden virale Gene identifiziert, die während der viralen Replikation durch unterschiedliche Mechanismen mit der Immunantwort des Wirtes interagieren (Übersicht in Michelson, 1999). Dies geschieht beispielsweise durch Unterbrechung oder Beeinflussung der Zytokinaktivität und Apoptose oder das Einwirken auf die MHC I Funktion (Alcami und Koszinowski, 2000).

Nach der Primärinfektion verharrt das Virus latent im Wirt. Der Latenzort von HCMV ist noch nicht genau identifiziert, latentes Virus konnte in Makrophagen- und Granulozytenvorläuferzellen im Knochenmark und in peripheren Blutmonozyten gefunden werden (Kondo *et al.*, 1994; Taylor-Wiedeman *et al.*, 1991; Soderberg-Naucler *et al.*, 1997).

Latentes Virus kann sowohl endogen z. B. durch Stress (Prösch *et al.*, 2000) als auch exogen durch Neuinfektion reaktiviert werden (Griffith *et al.*, 1990). Die produktive virale Replikation wurde in Epithel- und Endothelzellen, mesenchymalen Zellen, Hepatozyten, Granulozyten, Monozyten, glatten Muskellzellen und neuronalen Zellen beobachtet (Sinzger und Jahn, 1996), (Plachter *et al.*, 1996). Untersuchungen von Autopsiematerial durch Toorkey und Carrigan (Toorkey und Carrigan, 1989) ergaben, dass histopathologisch jedes Organ von HCMV infiziert sein kann.

Klinische Isolate von HCMV sind auch *in vitro* fähig das genannte breite Spektrum an Zellen zu infizieren, Laborstämme haben dagegen, durch häufiges Passagieren (i. d. R. in Fibroblasten), diese Fähigkeit weitgehend verloren.

### **1.3.1 Epidemiologie, Transmission**

Weltweit besteht eine große Durchseuchung mit HCMV. Mit Abnahme des sozioökonomischen Status nimmt die Durchseuchungsrate zu. In den Dritte-Welt-Ländern findet man eine Durchseuchung der Bevölkerung von bis zu 100%, in Europa umfasst die Durchseuchung ungefähr 60%. Im Rahmen der Primärinfektion ist CMV in sämtlichen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Blut, Urin, Fäkalien, Tränen- und Spermaflüssigkeit, Vaginalsekret und Muttermilch zu finden. Die Übertragung erfolgt nur bei direktem Kontakt mit infektiösem Material. Darüber hinaus kann HCMV auch vertikal übertragen werden. Nach rekurrenter oder primärer Infektion der Mutter erfolgt die Übertragung transplazental, intrapartum oder über die Muttermilch (Pass, 1985; Stagno *et al.*, 1986). Die HCMV Infektion zählt zu den häufigsten klinisch relevanten konnatalen Infektionen.

### **1.3.2 Klinik der HCMV Infektion**

Der klinische Verlauf einer HCMV Infektion ist abhängig von der Immunkompetenz des Wirtes. Im immunkompetenten Patienten kommt es gelegentlich zu einer HCMV Mononukleose, die 8% aller Mononukleososen (durch EBV verursacht) ausmacht (Pass, 2001). Selten wurden periphere Neuropathien, ein Guillain-Barré Syndrom, Meningoencephalitis, Myokarditis, hämolytische Anämie, Thrombozytopenie, Retinitis, gastrointestinale Ulcera, Hepatitis oder Pneumonie beobachtet.

Besonders schwerwiegend verläuft die HCMV Infektion bei immunsupprimierten Patienten. Insbesondere sind Transplantationsempfänger, Krebspatienten die eine Chemotherapie erhalten, Patienten mit kongenitalen Immundefekten sowie HIV infizierte Patienten betroffen. In solchen Patientengruppen kann eine HCMV Infektion unter Umständen auch tödlich enden. Bei der kongenitalen HCMV Infektion sind meistens mehrere Organsysteme betroffen. Die Mehrheit (50% bis 90%) der symptomatischen Neugeborenen werden im späteren Verlauf eine Kombination aus Defiziten aufweisen, wie neurologische Zeichen eines frühkindlichen Hirnschadens, Innenohrschwerhörigkeit, Sprachstörungen, Epilepsie und Retinitis (Pass, 2001).

Durch den Fortschritt der heutigen Medizin wird die HCMV Infektion klinisch bedeutender, nicht nur die besseren Überlebenschancen der Frühgeborenen, sondern auch die Transplantationsmedizin tragen entscheidend dazu bei. Bei Stammzell-, Knochenmark- und Organtransplantationen kann eine HCMV Infektion sowohl zur Organbeteiligung (z. B. Pneumonie, Gastritis) als auch zur akuten und chronischen Abstoßung führen. Außerdem führt eine HCMV Infektion bei Transplantatempfängern zur Zunahme von Infektionen durch opportunistische Erreger. Der wichtigste Risikofaktor dieser Komplikationen ist der Serostatus des Empfängers, wobei ein seronegativer Empfänger, der ein Transplantat eines seropositiven Spenders erhält besonders gefährdet ist an einer HCMV Infektion zu erkranken (Ljungman, 2002).

### 1.3.3 CMV als Ursache hyperproliferativer Erkrankungen

CMV zählt, im Vergleich zu den kleinen DNA-Tumoviren, nicht zu den onkogenen Viren, wurde aber bisher mit folgenden Neoplasien molekular und serologisch assoziiert: zervikales Karzinom, Adenokarzinom der Prostata und des Kolons, Karposi Sarkom (Übersicht in Doniger et al., 1999), kolorektales Adenokarzinom (Harkins *et al.*, 2002), nicht-melanöse Karzinome (Zafiroopoulos *et al.*, 2003) und maligne Gliome (Cobbs *et al.*, 2002). Außerdem wird die Bedeutung einer Beteiligung von CMV an der Pathogenese der Arteriosklerose (Melnick *et al.*, 1995) und der koronaren Restenose (Speir *et al.*, 1994) diskutiert.

Die letztendliche onkogene Bedeutung von HCMV ist aufgrund der hohen Durchseuchungsrate und dem ubiquitären Vorkommen des Virus allerdings schwierig zu beurteilen; es konnten in diesem Zusammenhang bisher keine kausalen Verknüpfungen hergestellt werden.

Neben diesen klinischen Gesichtspunkten ist durchaus bekannt, dass HCMV Faktoren kodiert, die wichtige Tumorsuppressoren, wie p53 und pRb binden und funktionell inaktivieren (Hagemeier *et al.*, 1994; Speir *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurde durch die Infektion mit HCMV eine transkriptionelle Aktivierung von Protoonkogenen, wie *c-fos*, *jun* und *myc* beobachtet (Boldogh *et al.*, 1990). Des weiteren wurde eine Sequenz Namens *mtrII* (*morphological transforming region*) im Genom von HCMV identifiziert, die möglicherweise zu maligner Transformierung führt (Muralidhar *et al.*, 1996; Razzaque *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1994). Durch HCMV transformierte Zellen enthalten sowohl die DNA-Sequenz von *mtrII* als auch das exprimierte Protein. Ähnlich wie die Onkogene kleiner DNA Viren bindet MTRII *in vitro* und *in vivo* an p53 und verhindert die p53 abhängige Transkription. Die biologische Relevanz dieser Interaktion ist jedoch noch nicht geklärt (Muralidhar, Doniger *et al.* 1996). Es konnten außerdem noch keine kausalen Zusammenhänge zwischen den klinischen und molekularen Beobachtungen erschlossen werden.

### 1.4 Der Zellzyklus

Eine erfolgreiche Zellteilung setzt die Replikation und Weitergabe wichtiger Zellkomponenten an die nächste Zellgeneration voraus. Dieser streng kontrollierte Prozess wird als Zellzyklus bezeichnet. Er besteht aus der Mitose (oder M-Phase) und der Interphase.

In der Interphase werden alle benötigten Zellbestandteile verdoppelt, die dann in der nachfolgenden Mitose auf zwei Tochterzellen aufgeteilt werden. Die Mitose wird in Pro-, Meta-, Ana-, und Telophase unterteilt, diese Phasen sind durch die jeweils unterschiedliche Anordnung der Chromosomen definiert. Die Verdopplung (Replikation) der DNA erfolgt in der S(ynthese)-Phase der Interphase. Zwischen S- und M-Phase liegen die sogenannten Gap Phasen (englisch.: gap = Lücke), G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub>. Ein Zellzyklus schließt, nachdem die Zelle G<sub>1</sub>-S-G<sub>2</sub> durchlaufen hat, mit der Zellteilung am Ende der Mitose ab.

In der G<sub>1</sub>-Phase, die in der Regel am längsten dauert, findet Zellwachstum statt. Wenn einer Zelle in der G<sub>1</sub>-Phase mitogene Reize wie Wachstumsfaktoren fehlen oder wenn ein Zell-Zell Kontakt erfolgt, gehen die Zellen aus der G<sub>1</sub>-Phase in einen Zustand der Quieszenz über (auch G<sub>0</sub> genannt) und hören auf zu proliferieren.

Normalerweise erfolgt der Fortgang des Zellzyklus ohne Unterbrechungen. Wenn eine Zelle jedoch genotoxischen Stress erfährt, oder eine Zellzyklusphase aus anderen Gründen nicht ordnungsgemäß abgeschlossen wurde, sorgen „Kontrollsysteme“, sogenannte Checkpunkte (Kontrollpunkte), dafür, dass der Verlauf des Zellzyklus gestoppt wird (Hartwell und Weinert, 1989). Wenn DNA-Schäden bzw. andere Ursachen für die Aktivierung der Checkpunkte innerhalb einer bestimmten Zeit nicht mehr behoben werden können, kommt es in der Regel zur Apoptose. Dieser sogenannten programmierten Zelltod führt zu einem kontrollierten Abbau der Zelle indem DNA fragmentiert wird, kleine Zellbestandteile abgeschnürt und anschließend durch Makrophagen entfernt werden.

#### 1.4.1 Regulation des Zellzyklus

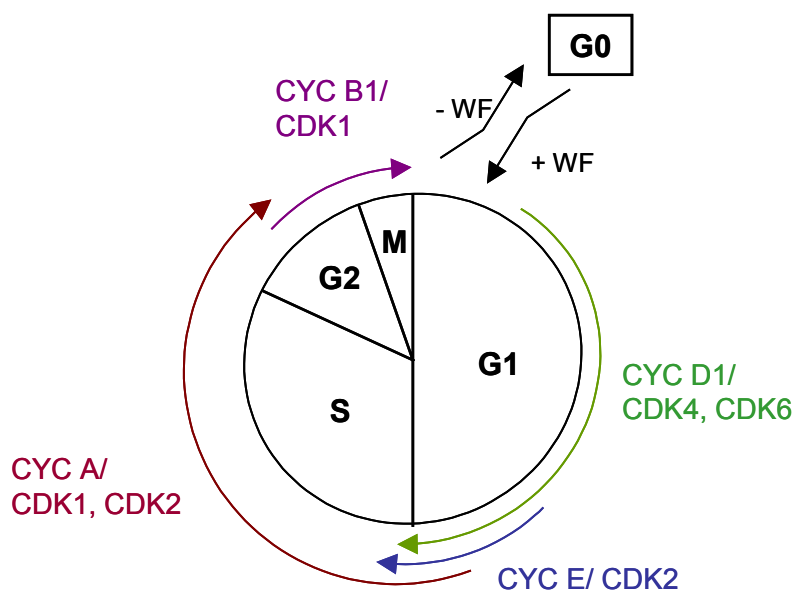
Angetrieben wird der Zellzyklus auf molekularer Ebene primär durch die Aktivität Zyklin-assoziiierter Kinasen (CDK). Zyklin-assoziierte Kinasen bilden die katalytische Untereinheit von Proteinkomplexen, die unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Die Regulation der Zyklin/CDK-Proteinkinaseaktivität wird nicht nur durch unterschiedliche Zyklin- oder CDK-Expression sondern sowohl durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Zyklinen und den Zyklin-assoziierten Kinasen als auch durch die Expression inhibitorischer Polypeptide, der CDK-Inhibitoren (CKI) kontrolliert.

In der G<sub>1</sub>-Phase führt die mitogenabhängige Expression und Aktivierung von ZyklinD1- CDK4/6-Komplexen zu einer initialen Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (pRb), was die Progression durch die frühe und mittlere G<sub>1</sub>-Phase ermöglicht (Sherr, 1995). Außerdem wird von einer Beteiligung

von ZyklinD1-CDK4/6 an der G1/S-Phase-Progression ausgegangen (Baldin *et al.*, 1993; Quelle *et al.*, 1993).

In un- oder hypophosphorylierter Form wirkt das pRb wachstumshemmend, weil es in dieser Form Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie bindet und so deren Zielgene aktiv reprimiert (Harbour und Dean, 2000). Wenn das pRb zunehmend phosphoryliert wird, verliert es die Fähigkeit E2F zu binden. Somit kann dann eine kontrollierte Transkription bestimmter E2F-Zielgene erfolgen. Zu diesen Zielgenen gehören Gene, deren Produkte selbst in die Kontrolle des Zellzyklus Ablaufes eingebunden sind oder die an Zellwachstum und DNA-Synthese teilnehmen. Dazu gehört auch Zyklin E, das als Teil des Zyklin E-CDK2 Komplexes, eine wichtige Rolle für den G1/S-Phase-Übergang spielt, indem es u. a. pRb und andere Pocketproteine phosphoryliert. Die wechselnde sequentielle Aktivierung der Zyklin/CDK-Komplexe während des Zellzyklus, wie an diesem Beispiel andeutungsweise geschildert, ist in Abb. 3 dargestellt.

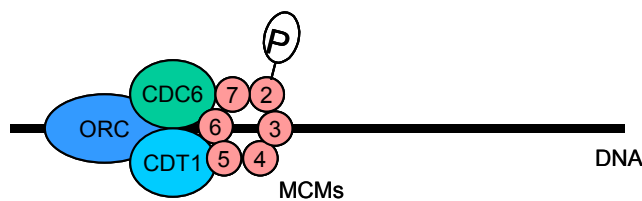
Aufgrund der positiven Rückkopplung zwischen Zyklin E-Expression und pRb-Phosphorylierung kommt es am Ende der G1-Phase zu einem raschen Anstieg der Zyklin E-CDK2-Aktivität und des pRb-Phosphorylierungsgrades (Geng *et al.*, 1996; Ohtani *et al.*, 1995). Unter anderem wird damit die Eigendynamik und die Mitogenunabhängigkeit der Zellzyklusprogression nach überschreiten des sogenannten Restriktionspunktes in G1 erklärt (Bartek *et al.*, 1996; Planas-Silva und Weinberg, 1997).



**Abbildung 3:** Der Zellzyklus. Der Fortgang des Zellzyklus wird durch die Aktivität Zyklin-assoziiierter Kinasen (CDK) und deren regulatorischen Untereinheiten, den Zyklinen gesteuert. Zellen verweilen, z. B. durch den Entzug von Wachstumsfaktoren (WF) in der G0 Phase des Zellzyklus.

## I. Einleitung

Der Beginn der DNA-Synthese wird in der G1-Phase durch die Assemblierung des *Prereplikationskomplexes* (Pre-RC) vorbereitet, welcher nur einmal pro Zellzyklus erfolgen kann. Dieser Komplex besteht aus unterschiedlichen Proteinen: dem *Origin-Recognition Complex* (ORC1-6), den MCM-Ladefaktoren CDC6 und CDT1 und dem MCM Proteinkomplex (MCM2-7), der vermutlich als zelluläre DNA-Helikase während der DNA-Replikation fungiert (Bell und Dutta, 2002) (siehe Abb. 4). Fast alle Pre-RC-Faktoren werden E2F abhängig exprimiert (Leone *et al.*, 1998; Ohtani *et al.*, 1996). Möglicherweise kann das Binden des Pre-RC an das Chromatin am G0/S-Übergang durch Zyklin E positiv beeinflusst werden (Cook *et al.*, 2002; Coverley *et al.*, 2002).



**Abbildung 4:** Beginn der DNA Replikation. Durch das Zusammensetzen des Pre-RC aus ORC, Cdt1, CDC6 und den MCMs wird der Beginn der DNA-Replikation vorbereitet (nach Wiebusch *et al.*, 2003).

Sobald die Zelle in die S-Phase eintritt, fällt die Zyklin E-CDK2-Aktivität normalerweise stark ab (Dulic *et al.*, 1992). In speziellen Embryonalzellen wurden weitere Replikationsrunden ohne dazwischenliegende Zellteilung beobachtet (Singer *et al.*, 1999), in diesen Zellen kommt es nicht zum Abfall der Zyklin E-CDK2-Aktivität.

Die genannten Punkte weisen darauf hin, dass es in der G1- und S-Phase zwei entkoppelbare Programme zu geben scheint, die durch Zyklin-assoziierte Kinaseaktivität kontrolliert werden. Einerseits wird auf Transkriptionsebene Proliferations- und S-Phase-spezifische Genexpression induziert, andererseits wird die Replikation der DNA initiiert.

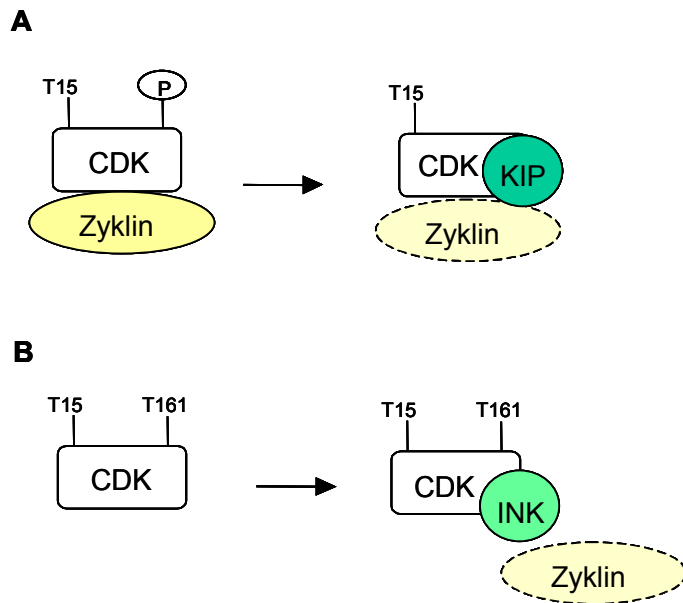
So wird auch die Zyklin A-Expression in der späten G1-Phase, Zyklin E-CDK2-abhängig, nicht mehr durch pRb reprimiert (Zhang *et al.*, 2000). Zyklin A-CDK2 trägt dann zur Akkumulation von Zyklin B bei, indem es den *anaphase promoting complex* (APC) inhibiert, der die Zyklin B Proteinmenge negativ kontrolliert (Lukas *et al.*, 1999).

Im weiteren Verlauf kommt es in der S- und G2-Phase zur Akkumulation von Zyklin A und B (Pines und Hunter, 1989; Pines und Hunter, 1990). Parallel dazu steigt auch die Zyklin A-CDK2-Aktivität und unterstützt das Durchlaufen der gesamten S-Phase u. a. durch die Phosphorylierung von Faktoren, die für den Beginn der DNA-Replikation notwendig sind (Yam *et al.*, 2002). Zyklin B-CDK1 wird durch inhibitorische Phosphorylierungen von CDK1 und zytoplasmatische Lokalisation bis zum Ende der G2-Phase inaktiv gehalten (Kishimoto und Okumura, 1997). Mit der Aktivierung von Zyklin B-CDK1 erfolgt der Eintritt in die Mitose (Jackman und Pines, 1997).

Die Bedeutung der Phosphorylierung von Zyklinen ist nicht eindeutig geklärt. Die Phosphorylierung von Zyklin E scheint unter anderem für dessen Abbau erforderlich zu sein (Clurman *et al.*, 1996; Won

und Reed, 1996). Zyklin B wird durch Phosphorylierung in seiner zellulären Lokalisation beeinflusst. Die nukleäre Lokalisation trägt zum Eintritt in die Mitose bei (Li *et al.*, 1997).

Eine weitere Regulation der Zyklin/CDK-Proteinkinaseaktivität erfolgt über Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKI). Die Vertreter der CIP/KIP-Familie der CKI wie p21, p27 und p57 gelten als umfassende CDK-Inhibitoren (Hengst und Reed, 1998). Dagegen hemmen die Vertreter der INK4-Familie (Carnero und Hannon, 1998), wie p15, p16, p18 und p19 nur Zyklin D-CDK4/6 direkt.



**Abbildung 5:** CDK-Inhibitoren. CKI der CIP/KIP-Familie binden an CDK2/ Zyklin E/A und inhibieren so die katalytische Aktivität (A). CKI der INK4-Familie blockieren durch Unterbrechung der Zyklinbindung an CDK 4/6 die Aktivität des Komplexes (B).

### 1.4.2 Einfluss des humanen CMV auf den Zellzyklus

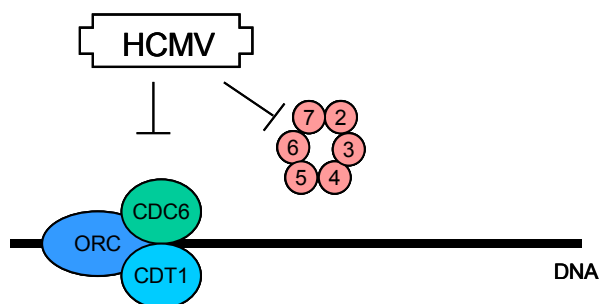
Das humane Zytomegalievirus beeinflusst, vermutlich um seine eigene Replikation zu optimieren, den Zellzyklus der infizierten Zelle.

Von mehreren Viren ist bekannt, dass sie den Zellzyklus der Wirtszelle auf verschiedenste Weise beeinflussen, damit die eigene virale Replikation ungehindert ablaufen kann. Kleine DNA-Viren wie z. B. Polyoma- oder Papillomaviren sind auf zellulärer DNA-Replikation angewiesen, um im Ganzen von den zellulären Replikationsfaktoren zu profitieren (Shadan *et al.*, 1994). Die Infektion mit solchen Viren führt zur S-Phase-Induktion, die meistens durch die Inaktivierung von pRb hervorgerufen wird (Vousden, 1995). Bei großen DNA-Viren, wie den Herpesviren, die über ihren eigenen Replikationsapparat verfügen, scheint die virale DNA-Replikation in Abwesenheit der zellulären begünstigt zu sein.

Größere DNA Viren können sogar in arretierten Zellen replizieren (DeMarchi und Kaplan, 1976; Shadan *et al.*, 1994) und führen teilweise zu einem Zellzyklusblock in G1 oder am G1/S-Übergang (Bresnahan *et al.*, 1996; de Bruyn Kops und Knipe, 1988; Dittmer und Mocarski, 1997; Ehmann *et al.*, 2000; Flemington, 2001; Song *et al.*, 2000). Insbesondere HCMV arretiert Zellen in der G1-Phase und stoppt die Zellproliferation (Bresnahan *et al.*, 1996; Dittmer und Mocarski, 1997; Lu und Shenk, 1996). Aus bisher ungeklärten Gründen ist die Genexpression viraler *immediate-early* Gene - die Voraussetzung für eine effektive virale Replikation - nur in der G1-Phase möglich (Fortunato *et al.*, 2002; Salvant *et al.*, 1998). Obwohl keine zelluläre Replikation stattfindet, werden durch HCMV S-Phase-spezifische Gene hochreguliert und Mechanismen aktiviert, die den Eintritt in die S-Phase kontrollieren. Die Expression sowohl von Replikationsfaktoren wie Topoisomerase II (Benson und Huang, 1990) und PCNA (Dittmer und Mocarski, 1997) als auch von Enzymen des Nukleotidmetabolismus wie DHFR (Lembo *et al.*, 1999), Thymidinkinase (Colberg-Poley und Santomenna, 1988) und Ornithindecaboxylase (Isom, 1979) wird durch das Virus aktiviert.

Außerdem wird die Zyklin E-CDK2 Aktivität durch die Infektion mit HCMV erhöht (Bresnahan *et al.*, 1998; Bresnahan *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001; McElroy *et al.*, 2000; Sinclair *et al.*, 2000; Wiebusch *et al.*, 2003) und die das Wachstum stoppenden Formen von Rb und andere Pocketproteine werden inaktiviert oder degradiert (Fortunato *et al.*, 1997; Hagemeyer *et al.*, 1994; Jault *et al.*, 1995; Kalejta *et al.*, 2003; McElroy *et al.*, 2000; Poma *et al.*, 1996). Darüber hinaus wird die Expression E2F-responsiver Gene hochreguliert (Song und Stinski, 2002; Wade *et al.*, 1992) und die Substrate der G0/G1-spezifischen Ubiquitin Ligase APC werden stabilisiert (Biswas *et al.*, 2003; Jault *et al.*, 1995; Wiebusch *et al.*, 2003).

Durch die erwähnten Einflüsse wird eine scheinbare S-Phase-Umgebung geschaffen, die essentielle Voraussetzungen für einen produktiven Replikationszyklus des Virus zu sein scheint. Der durch HCMV verursachte Zellzyklusblock am G1/S-Übergang wird durch die selektive Hemmung der zellulären DNA-Synthese verursacht, indem das Laden der MCMs auf den ORC verhindert wird, obwohl alle Pre-RC-Faktoren in infizierten Zellen vorhanden sind (Biswas *et al.*, 2003; Wiebusch *et al.*, 2003) (siehe Abb. 6).



**Abbildung 6:** Hemmung der zellulären DNA-Synthese durch HCMV. HCMV verhindert das Binden der MCMs an den ORC-Komplex (Wiebusch 2003).

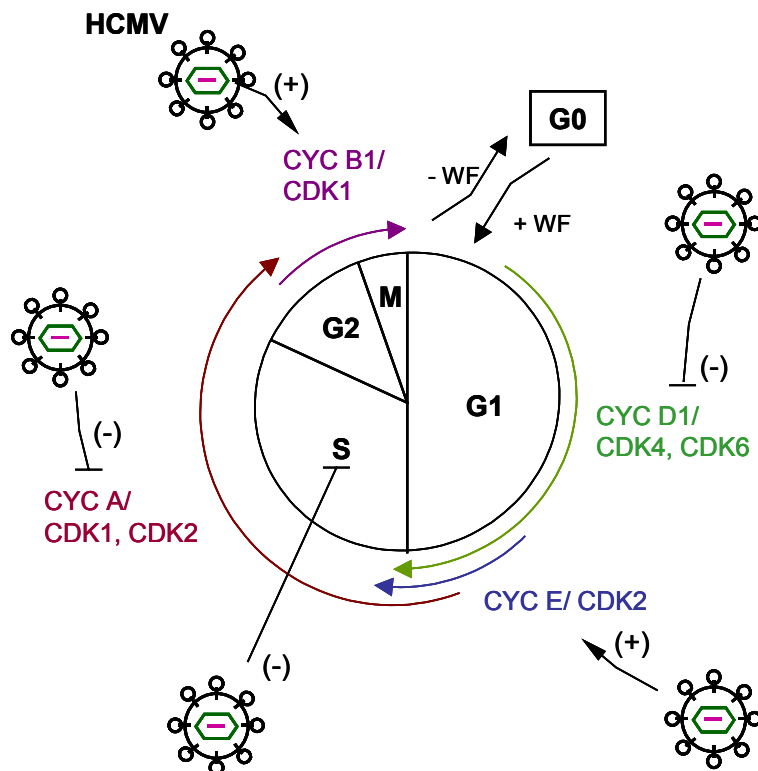
Als weitere Ursache des Zellzyklusblocks wird die, durch das Virus verursachte, verminderte Zyklin D1 und A Expression diskutiert (Bresnahan *et al.*, 1996; Jault *et al.*, 1995). Ungewöhnlicherweise wird Zyklin B1-CDK2 durch das Virus aktiviert (Jault *et al.*, 1995). Dies weist daraufhin, dass die Zellzykluskontrollpunkte, die Zyklin B1-CDK2 in Anwesenheit unreplizierter DNA normalerweise inaktiv hält, durch das Virus außer Kraft gesetzt sind. Die physiologische Relevanz der Zyklin Deregulation für den viralen Replikationszyklus ist bisher nicht verstanden.

Um weiteren Einblick in die Mechanismen des durch HCMV verursachten Zellzyklusarrestes zu bekommen, hat man in den letzten Jahren versucht virale Faktoren zu identifizieren, die für den ungewöhnlichen Zellzyklusarrest verantwortlich sind. Zum Beispiel arretiert das *immediate-early* Protein IE86 (IE2) Zellen am G1/S-Übergang und führt gleichzeitig zur Aktivierung von Zyklin E und Inaktivierung von Rb (Wiebusch und Hagemeyer, 2001). Das *immediate-early* Protein IE72 (IE1) interagiert mit p107 und hebt dadurch die repressive Wirkung, die dieses Protein der pRb-Familie auf den E2F-responsiven Promotor ausübt, auf (Poma *et al.*, 1996).

Ein weiterer viraler Faktor mit Zellzyklus regulatorischer Aktivität ist das Virionprotein pUL69. Bei transienter Expression in primären Fibroblasten wirkt es inhibitorisch auf die G1/S-Progression (Lu und Shenk, 1999). Wenn die Infektion mit pUL69-mutierten Viren erfolgt, ist der Zellzyklusblock deutlich geringer (Hayashi *et al.*, 2000). Dies zeigt, dass pUL69 für einen effizienten G1-Arrest infizierter Zellen erforderlich ist.

Das durch HCMV UL82 kodierte Protein pp71 führt zum Proteasomen-abhängigen Abbau der aktiven Formen von pRb und weiterer Pocketproteinen wie p107 und p130 (Kalejta und Shenk, 2003), daraus folgt ein beschleunigtes Durchlaufen der G1-Phase (Kalejta und Shenk, 2003).

Analysiert man den Zellzyklusarrest HCMV infizierter Zellen, betrachtet man den kombinierten Effekt der unterschiedlichen viralen Faktoren. Im Gegensatz zu den in Abb.7 zusammengefassten, gut untersuchten Einflüssen des humane Zytomegalievirus auf den Zellzyklus (Kalejta und Shenk, 2002), sind die Effekte von CMV anderer Spezies auf den Zellzyklus bisher allerdings unbekannt.



**Abbildung 7:** Einfluss des HCMV auf den Zellzyklus. Der Fortgang des Zellzyklus wird durch die Aktivität Zyklin-assoziiierter Kinasen (CDK) und deren regulatorischen Untereinheiten, den Zyklinen gesteuert. Zellen verweilen durch den Entzug von Wachstumsfaktoren (WF) in der G0-Phase des Zellzyklus. Durch die HCMV Infektion wird der Zellzyklus in seinem Fortgang wie gezeigt beeinflusst.

### 1.5 Tiermodelle für die HCMV Infektion

Die Übertragung der Forschungsergebnisse in ein CMV Tiermodell sind wichtig, da immer wieder Unterschiede *in vitro* und *in vivo* Experimenten beobachtet wurden. So sind m137, m138, M139, M140, und M141 *in vitro* nicht essentiell für die virale Replikation von MCMV aber *in vivo* werden sie für die virale Replikation benötigt (Cavanaugh *et al.*, 1996; Lagenaur *et al.*, 1994; Vieira *et al.*, 1994).

Aufgrund der ausgeprägten Wirtsspezifität der Zytomegalieviren, ist man bei der Erforschung der pathogenetischen Mechanismen dieses Virus im Tiermodell auf die Verwendung der artspezifischen CMV angewiesen. Murines Zytomegalievirus (MCMV) und Ratten-Zytomegalievirus (RCMV) sind dabei die bislang bestuntersuchteten Systeme.

In dieser Arbeit wurden die drei gebräuchlichsten M/RCMV-Stämme benutzt:

1. RCMV Stamm „Maastricht“ (Bruggeman *et al.*, 1982)
2. RCMV Stamm „England“ (Priscott und Tyrrell, 1982)
3. MCMV Stamm „Smith“ (Smith, 1954)

### 1.5.1 Ratten-Zytomegalievirus

Beide RCMV Stämme, „England“ und „Maastricht“, entstammen freilebenden Ratten (*Rattus norvegicus*). Das Genom von RCMV „Maastricht“, welches bereits vollständig sequenziert wurde (Vink *et al.*, 2000), ist mit 230 kb nicht nur größer als das von RCMV „England“ (ungefähr 206 kb) sondern ergibt auch ein komplett anderes Muster bei Verdau mit Restriktionsendonukleasen (Burns *et al.*, 1988; Meijer *et al.*, 1986). Darüber hinaus zeigen die beiden Stämme ein unterschiedliches Wachstumsverhalten und unterschiedliche Zellpermissivität *in vitro* und *in vivo*, so dass es sich möglicherweise um zwei unterschiedliche Betaherpesviren handelt (Beisser *et al.*, 1998).

### 1.5.2 Murines Zytomegalievirus

Der MCMV Stamm „Smith“ wurde nach seinem Entdecker benannt (Smith, 1954). Sein Genom besitzt eine Größe von 230 kb, verläuft mit dem humanen Zytomegalievirus AD 169 über 180 kb kollinear und ist diesem in einem Bereich von 78 zentralliegenden ORFs besonders ähnlich (Rawlinson *et al.*, 1996). Wie HCMV verursacht auch MCMV schwerwiegende Krankheiten in immunsupprimierten Mäusen und reagiert ebenso empfindlich gegenüber dem Virustatikum Ganciclovir (Shanley *et al.*, 1985) (siehe Abschnitt 3.4). Darüber hinaus verhält sich die generelle Regulation der Genexpression sowie die Funktion einzelner viraler Proteine in HCMV und MCMV ähnlich (Sweet, 1999).

### 1.5.3 Nager-CMV als Tiermodell

HCMV, MCMV und RCMV zeigen nicht nur genetische und morphologische Homologien (Bruggeman *et al.*, 1983; Vink *et al.*, 2000), auch in der Pathogenese und klinischen Manifestation sind sie anerkannte Tiermodelle für die CMV-Infektion:

- Reddehase *et al.* konnten zeigen, dass der Schaden des Knochenmarkstromas durch eine CMV Infektion zu einer erschwerten Regeneration durch pluripotente Stammzellen führt (Reddehase *et al.*, 1992). Auch die Beeinträchtigung der Embryogenese des Gehirns *in vivo* und *in vitro*, sowie die virale Genexpression in unterschiedlichen Regionen des ZNS konnte mit Hilfe des Mausmodells nachvollzogen werden (van Den Pol *et al.*, 1999). Durch ein weiteres Modell konnte die Interaktion zwischen Virus und Gefäßwand verdeutlicht werden, es ergab, dass CMV mittels eines proinflammatorischen Effekts eine Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose zu spielen scheint (Melnick *et al.*, 1995; Span *et al.*, 1992).
- Einen Einblick in den Mechanismus der Latenz haben Reddehase *et al.* durch die Untersuchung der Kinetik der Latenz und Rekurrenz im Mausmodell ermöglicht (Reddehase *et al.*, 2002).
- Desgleichen diente das Mausmodell zu Studien über die Kontrolle und Beeinflussung des Immunsystems durch CMV. So wurde hier die Funktion viraler Faktoren, die Homologien zu Protein-G gekoppelten Rezeptorproteinen, MHC-I-Molekülen und Chemokinen aufweisen

untersucht. Diese scheinen eine wichtige Rolle für die virale Replikation und Verteilung im Wirt zu spielen (Davis-Poynter *et al.*, 1999). Chemokinhomologe von MCMV dienen der Anlockung von Leukozyten, Monozyten und Makrophagen und der damit verbundenen Verteilung der Viren im Wirt (Saederup *et al.*, 1999).

- Der Mechanismus und die Folgen der kongenitalen CMV Infektion wurde durch mehrere Forschergruppen am Tiermodell untersucht (Baskar *et al.*, 1983; Li und Tsutsui, 2000; Tsutsui, 1995). Im Mausmodell konnte allerdings keine transplazentäre Übertragung des Virus gezeigt werden.
- In den letzten Jahren kamen Tierexperimente zur Entwicklung von Impfstoffen dazu, wie z. B.:
  - i) Die Impfung mit DNA ausgewählter CMV Gene (Gonzalez Armas *et al.*, 1996).
  - ii) Analysen der Impfung mit MCMV Mutanten gegen akute und latente Infektion über systemische oder mukosale Verabreichung (MacDonald *et al.*, 1998).
  - iii) Die Immunisierung mit MCMV DNA Plasmiden und durch Formalin abgetöteten Viren als effektive Methode gegen virale Replikation und Ausbreitung (Morello *et al.*, 2002). Zusätzlich kam es zur Entwicklung eines Modells für die antivirale Therapie in immunsupprimierten Ratten (Stals *et al.*, 1993).

### 1.6 Fragestellung der Arbeit

Die Relevanz der beschriebenen, durch HCMV verursachten Zellzyklusalterationen (siehe 1.4.2) für die Vermehrung und das pathologische Erscheinungsbild von HCMV im erkrankten Organismus sind noch weitgehend unerforscht. Um die pathophysiologische Bedeutung dieser Zellzyklus-Deregulationen für die Infektion des Gesamtorganismus zu untersuchen, sind Experimente im Tiermodell erforderlich.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, Erkenntnisse über die Konservierung der für HCMV beschriebenen Zellzyklusfunktionen in MCMV und RCMV auf zellulärer Ebene zu gewinnen, um so die Grundlage für weiterführende Untersuchungen im Tiermodell zu schaffen.

Da das Zytomegalievirus wie oben beschrieben ein wirtsspezifischer Erreger ist, ist man bei der Erforschung der pathogenetischen Mechanismen dieses Virus im Tiermodell auf die Verwendung der jeweiligen artspezifischen CMV angewiesen. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit das murine CMV (MCMV) und das Ratten-CMV (RCMV) als die bislang am ausführlichsten untersuchten Systeme verwendet. Dabei wurden die drei gebräuchlichsten M/RCMV Stämme in die Analysen einbezogen: MCMV Stamm „Smith“, RCMV, Stamm „Maastricht“ und RCMV, Stamm „England“.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Lösungen

PBS:	8,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 3 mM KCl
TTBS:	10 mM Tris-Cl (pH 7,6), 9 g/l NaCl, 0,1% Tween 20
IPB1:	50 mM Tris-Cl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM NaF, 0,5 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 0,5% Nonidet P-40, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 2 µg/ ml Aprotinin, 1 mM Leupeptin, 1 mM PMSF
IPB2:	50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 0,1% Tween-20, 10 mM, β- Glycerophosphat, 1mM NaF, 0,1 mM sodium orthovanadate, 2 µg/ ml Aprotinin, 5 µg/ ml Leupeptin, 0,1 mM PMSF
SDS-Probenpuffer (2-fach):	100 mM Tris-Cl (pH 6,8), 200 mM Dithithreitol, 4% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerol

### 2.2 Zellkulturmedien

DMEM I:	DMEM (Gibco-BRL, Katalog-Nr. 61965026) wurde supplementiert mit 100 Units/ ml Penicillin/ Streptomycin und jeweils 5% FBS und NKS (beides von Biochrom, Berlin).
DMEM II:	DMEM (Gibco-BRL, Katalog-Nr. 61965-26) wurde supplementiert mit 50 Units/ ml Penicillin/ Streptomycin und 10% FBS
MEM:	MEM (Gibco-BRL, Katalog-Nr. 31095-029) wurde supplementiert mit Gentamicin (Gibco 15750-037), 5 mM Glutamine (Gibco 25030-024) und 10% FBS.

### 2.3 Zellkultur

Eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien ist Tabelle 1 zu entnehmen. Die Zellen wurden als adhärent wachsende Zellrasen auf Plastikschaalen gehalten. Es wurden mittelgroße Schalen (d = 10 cm) mit 10 ml Medium oder große Schalen (d = 14 cm) mit 25 ml Medium verwendet. REFs, immortalisierte REFs und Rat-1 Zellen wurden in MEM, NIH-3T3 Zellen in DMEM I und MEF Zellen in DMEM II bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Zum Passagieren der Zellen wurden diese wie unter 2.7 beschrieben geerntet, in frischem Medium aufgenommen und auf neuen Schalen ausplattiert. Das beim Passagieren der unterschiedlichen Zelllinien verwendete Verdünnungsverhältnis ist in Tabelle 1 angegeben. Die verwendeten Passagenzahlen lagen für die Embryonalen Fibroblasten zwischen 2 und 12, für die immortalisierten Rattenfibroblasten zwischen 70 und 80, bei den restlichen Zelllinien war die Passagenzahl nicht bekannt. Eingefroren wurden die Zellen in 1,5 ml Kulturmedium mit 10% DMSO. Nach langsamem Abkühlen auf -80 °C wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert. Durch Auftauen im 37 °C warmen Wasserbad, Waschen und nachfolgendem Ausplattieren in DMSO-freiem Medium wurden sie wieder in Kultur genommen.

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.

Name	bezogen von	Haltung	Herkunft	Status
NIH-3T3	AG R. Müller	1:6 alle 3 Tage in DMEM I	Mausfibroblasten, nach „3T3“-Schema immortalisiert	p16 <sup>INK4A</sup> -negativ
MEF	M. Pohlers	1:4 alle 3 Tage in DMEM II	Mäusestamm C57BI/ 6x 129 SV	Wildtyp
Rat-1	T. Kouzarides	1:12 alle 3 Tage in MEM	immortalisierte Rattenfibroblasten	p21 <sup>WAF1</sup> -negativ
immortalisierte REF	S. Voigt	1:12 alle 3 Tage in MEM	immortalisierte Rattenfibroblasten	unbekannt
REF	O. Raudies	1:3 alle 3 Tage in MEM	Rattenstamm Sprague Dawley	Wildtyp

### 2.4 Virusanzucht und Virustiterung

Primäre embryonale Mausfibroblasten und Rat-1 Zellen wurden 24 h vor Infektion im Verhältnis 1:12 passagiert und dann mit einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 0,01 PFU (plaquebildende Einheit, *Plaque forming Unit*) pro Zelle CMV-infiziert (siehe 2.5). Der MCMV Stamm „Smith“ wurde in MEFs gezüchtet, die RCMV Stämme „Maastricht“ und „England“ wurden in Rat-1 Zellen propagiert. Die infizierten Zellen wurden in 2%igem Medium gehalten, sobald die gesamte Zellpopulation den CMV-typischen CPE zeigte, wurde der virenhaltige Überstand gesammelt, durch Zentrifugation von Zelldebris befreit, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung des Virustiters wurde die Methode des Plaque-Assay verwendet, (Wentworth und French, 1970) wodurch die absolute Menge infektiöser Partikel bestimmt wurde. Hierzu wurden 0,1 ml einer logarithmischen Verdünnungsreihe von MCMV oder RCMV auf subkonfluente 24-well Zellkulturplatten (Biochrom P92240) gegeben. MCMV wurde auf 3T3 Zellen getitert und die beiden Stämme von RCMV auf Rat-1 Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h wurden die Zellen mit jeweils 1 ml Modified Eagle Medium (Gibco 21935-028) unter Zusatz von 2,5% Methylcellulose, 5% FBS, 5 mM Glutamin und Gentamicin (30 µg/ml) überschichtet und für 6 Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Methylcellulose entfernt und der Zellrasen mit Methylenblau (0,04%) gefärbt. Dadurch, dass die Methylcellulose die Diffusion behindert, können die freigesetzten Viren nur auf Nachbarzellen übertragen werden. Aufgrund der fortschreitenden Lyse infizierter Nachbarzellen entstehen „Plaques“, die vom dichten Zellrasen umgeben sind. Mittels Lichtmikroskopie kann dann die Anzahl der „Plaques“ ermittelt werden.

### 2.5 Infektionen

Proliferierende Zellen wurden 24 h vor der geplanten Infektion passagiert. Bei der Infektion von quieszenten Zellen wurde, wie in Abschnitt 2.6.1 ausgeführt, vorgegangen. Um die Virusmenge zu berechnen, deren Einsatz zum Erreichen des beabsichtigten MOI-Wertes nötig war, wurden vor der Infektion Zellen einer Referenzschale geerntet und in einer Neubauerzählkammer (der Firma Roth) gezählt. Anschließend wurden Aliquots einer geeigneten Viruspräparation aufgetaut und bei Bedarf mit Medium verdünnt. Den zu infizierenden Zellen wurde der Kulturüberstand abgesaugt und durch soviel Virussuspension ersetzt, dass zum einen die Zellrasen gerade mit Flüssigkeit bedeckt und zum anderen der gewünschte MOI-Wert gewährleistet war. In diesem Zustand wurden die Zellkulturschalen für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Um eine gleichmäßige Flüssigkeitsverteilung aufrechtzuerhalten, wurden sie dabei regelmäßig geschwenkt. Nach dieser sogenannten Adsorptionsphase wurde die Virussuspension wieder entfernt und die Zellen bis zur Ernte in serumhaltigem bzw. serumfreiem Kulturmedium gehalten. Für die Infektion mit MCMV wurden 3T3 und MEFs verwendet, für die beiden RCMV Stämme wurden Rat-1 und REF Zellen verwendet.

Zum Erstellen von Zellkinetiken wurden 24 h vor Infektion die Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf 6-well Zellkulturplatten (Biochrom, P 92406) ausplattiert und wie beschrieben infiziert. Uninfizierte Kontrollzellen wurden in Medium mit gleichen Serumkonzentrationen wie die Viruspräparate gehalten. Um die virale Replikation zu hemmen, wurden folgende Wirkstoffe verwendet: Ganciclovir (GCV) (50µM) und Foscarnet (PFA) (300µg/ml).

### **2.6 Synchronisation der Zellpopulationen**

#### **2.6.1 Serumentzug**

Wenn dem Kulturmedium kein Wachstumsfaktoren enthaltendes Kälberserum zugesetzt wird, hören die meisten Zellen auf zu zyklieren und gehen in einen als Quieszenz oder G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus bezeichneten Zustand über. Erfolgt dann eine Restimulierung mit Medium, das die Serummitogene enthält, tritt ein großer Teil der Zellen synchron wieder in den Zellzyklus ein.

In der vorliegenden Arbeit wurden 24 h nach Ausplattieren die Wachstumsfaktoren durch Verwenden von 0,1 – 0,4% FCS-haltigem Medium minimiert. Dies erfolgte durch Absaugen des serumhaltigen Mediums, Waschen mit serumfreiem Medium und Hinzufügen des serumarmen Mediums. Nach 72-stündiger Inkubation erfolgte entweder die Restimulation mit 10% serumhaltigem Medium (Zeitpunkt  $t = 0$ ) oder die Zellen wurden weiterhin im Serumentzug belassen, um dann zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten geerntet zu werden (siehe 2.7). Sollte der Einfluss von MCMV/RCMV auf quieszente oder restimierte Zellen untersucht werden, wurde 1,5 h vor der Serumrestimulierung mit der Adsorptionsphase der Virusinfektion (siehe 2.5) begonnen.

#### **2.6.2 Behandlung mit Nocodazol**

Zur Synchronisierung der Zellen in der Mitose wurden die Zellen mit dem „Spindelgift“ Nocodazol (50 ng/ml) behandelt, welches die Formation der Mikrotubuli verhindert und so einen reversiblen Arrest der Zellen in der Prometaphase bewirkt. Nach 12 h Nocodazolbehandlung wurden die Zellen zweimal mit nocodazolfreiem Medium gewaschen und durch Hinzufügen von neuem serumhaltigen Medium erreichten die Zellen nach 2 h synchron den Übergang M/G<sub>1</sub>-Phase, nach 10 h erreichten die Zellen synchron die frühe S-Phase. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden dann die Zellen, wie in 2.5 beschrieben, infiziert, 8h, 12 h und 24 h nach Infektion geerntet und auf ihre Zellzyklusverteilung untersucht.

### 2.7 Zellernte

Zunächst wurde der Kulturüberstand in ein passendes Zentrifugenröhrchen überführt. Medienreste wurden durch einmaliges Waschen mit PBS entfernt, um die Zellen dann in einer Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco-BRL, Katalog-Nr. 25300-054) solange bei 37 °C zu inkubieren, bis sie sich vom Plastikuntergrund ablösen. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden die Zellen suspendiert und dann in den vorgelegten Kulturüberstand aufgenommen. Um das Trypsin zu inaktivieren wurde bei Bedarf noch Serum hinzugefügt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 200 g wurden die Zellen in PBS resuspendiert und erneut für 5 min bei 200 g pelletiert. Nach diesem Waschschrift wurde das Zellmaterial durch die jeweiligen Analysemethoden entsprechend weiterverarbeitet.

### 2.8 Durchflußzytometrische Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts

Die durchflußzytometrischen Analysen wurden mit einem *FACScan*-Gerät durchgeführt, welches von dem Computerprogramm *CellQuest* (beides von Becton Dickinson) gesteuert wurde. Um den DNA-Gehalt der Zellen durchflußzytometrisch messen zu können und so eine Auskunft über ihre Position im Zellzyklus zu erlangen, mussten Zellen erst permeabilisiert und mit Propidiumjodid gefärbt werden. Aus diesem Grund wurden geerntete Zellen (siehe 2.7) in 1 ml PBS suspendiert und unter ständigem Aufwirbeln mit 3 ml –20 °C kaltem Ethanol versetzt. Dann wurden sie für mindestens 14 h bei 0 °C gelagert und anschließend 3 min bei 400 g zentrifugiert. Nach Resuspension in 1 ml PBS und nochmaliger Zentrifugation bei 200 g wurden sie abhängig von der Zellzahl in 0,25 – 1 ml einer Färbelösung (PBS, 50 µg/ml Propidiumjodid, 100 U/ml RNase A) aufgenommen und darin 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Propidiumjodid-Fluoreszenzsignal der in der Färbelösung suspendierten Zellen wurde anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Mit Hilfe des Dublettendiskriminierungsmoduls des Zytometers wurden aneinanderhaftende Zellen ausgegrenzt und DNA-Histogramme erstellt, in denen der DNA-Gehalt gegen die Zellzahl aufgetragen wurde.

### 2.9 Zellextraktion

Die geernteten Zellen (siehe 2.7) wurden in IPB1, für Zyklin D1-Analysen in IPB2, suspendiert. Bei der Erstellung der Extrakte für die Lambda-Phosphatase Behandlung wurde dem Lysepuffer IPB1 kein NaF und kein Natriumorthovanadat zugesetzt. Die Zellen wurden durch Einfrieren in siedendem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 37 °C lysiert. Anschließend wurden die Zelllysate bei 0 °C 20 min inkubiert und 20 min bei 20.000 g zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden aufgehoben und bei –80 °C gelagert. Mithilfe des *DC Protein Assay* der Firma Bio-Rad, welcher auf der Lowry-Methode (Waterborg und Matthews, 1994) beruht, wurde die Proteinkonzentration der Extrakte bestimmt. Dazu wurden 2 µl des Extraktes mit 198 µl H<sub>2</sub>O verdünnt, 0,1 ml der kurz zuvor im Verhältnis 1:50 gemischten Reagenzien „S“ und „A“ hinzugefügt und dann mit 0,8 ml Reagenz „B“

gemischt. 10 min später wurde die Lichtabsorption der entstandenen Lösung bei 750 nm im Photometer gemessen, bei der Nullkontrolle wurde anstelle des Extraktes IPB eingesetzt. Als Proteinstandard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe erstellt. Ganzzellextrakte wurden durch Sonifizieren im SDS-Probenpuffer erstellt.

### 2.10 Chromatinextraktion

Zur Isolierung von Chromatin wurde nach dem Protokoll von Méndez und Stillman vorgegangen (Mendez und Stillman, 2000). Dazu wurden die Zellen zuerst in Puffer A [10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCL, 1,5 mM, MgCl<sub>2</sub>, 0,34 M Saccharose, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 0,5 µg/ml Pepstatin A, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 0.1% Triton] resuspendiert und 5 Minuten bei 0 °C inkubiert. Die Zellkerne wurden dann durch Zentrifugation (4 min, 1300g, 4 °C) pelletiert und einmal mit Puffer A gewaschen. Anschließend wurden die Zellkerne in Puffer B [ 3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 0,5 µg/ml Pepstatin A, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid] lysiert, das Chromatin durch Zentrifugation pelletiert (4 min, 1700 g, 4 °C), einmal mit Puffer B gewaschen und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Das so erhaltene Chromatinpellet wurde in SDS-Probenpuffer resuspendiert und soniziert.

### 2.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte durch das Verfahren der SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Es fand in dieser Arbeit bei Immunoblot-Analysen von Zellextrakten und bei der Bestimmung von Zyklin-assoziierten Kinaseaktivitäten Anwendung. Die jeweiligen Proteinproben wurden mit einem zweifach konzentrierten, reduzierenden SDS-Probenpuffer gemischt. Danach wurden sie für 3 min bei 95 °C erhitzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde das *Mini Protean II*-System der Firma Bio-Rad benutzt. Das Gel bestand aus zwei Teilen: Das obere Viertel, das sogenannte Sammelgel, enthielt 5% Polyacrylamid, 125 mM Tris (pH 6,8) und 0,1% SDS. Das untere sogenannte Trenngel enthielt je nach Anwendung zwischen 7,5% und 12% Polyacrylamid, außerdem 375 mM Tris (pH 8,8) und 0,1% SDS. Das eingesetzte Acrylamid hatte einen Bisacrylamidanteil von 2,6%, die Polymerisierung wurde durch 0,1% APS und 0,1% TEMED eingeleitet. Der SDS-PAGE-Laufpuffer bestand aus 125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5% SDS. Nach dem Einlaufen der Proben bei 90 V lief die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 200 V solange, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

### 2.12 Immunoblot-Analysen

Die Immunoblot-Analyse der nach Größe aufgetrennten Proteine (siehe 2.11) bestand aus zwei Teilen: dem Transfer der Proteine auf Membranen und dem Nachweis einzelner Proteine mit spezifischen Antikörpern. Durch Verdünnung der jeweiligen Proben mit IPB wurde die Proteinkonzentration der Zellextrakte angeglichen und jeweils gleiche Volumina in SDS-PAGE eingesetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Hybond von Millipore) transferiert. Hierzu wurde ein sogenannter Semi-Dry-Blotter (Phase, Best.-Nr. 84115000) eingesetzt. Der Transfer lief 1 h bei anfänglich 4 V ab. Als Transferpuffer diente 20% Methanol/25 mM Tris/190 mM Glycin. Nach erfolgtem Proteintransfer wurde die Membran in TTBS mit 6% gelöstem Trockenmilchpulver mindestens 30 min inkubiert, um auf diese Weise unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Die Membranen wurden dann mit einem gegen das zu untersuchende Protein gerichteten, sogenannten Primärantikörper, dann mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die jeweiligen Antikörper wurden in TTBS/6% Trockenmilch gelöst und die Inkubationen liefen entweder 2–4 h bei Raumtemperatur oder 12-24 h bei 4 °C ab, gefolgt von viermal zehnmütigem Waschen der Membranen mit TTBS. Die einmal gebrauchten Antikörperlösungen wurden mit 0,1%  $\text{NaN}_3$  haltbar gemacht und wenn möglich mehrfach verwendet. Die benutzten Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung sind in Tabelle 2 aufgeführt; die beiden dort zuletzt aufgeführten sind mit einem Peroxidaseenzym gekoppelt. Abschließend wurden die antikörperbindenden Proteinbanden durch Chemilumineszenznachweis der gleichfalls gebundenen Peroxidaseaktivität sichtbar gemacht. Dabei wurden je nach Signalstärke die ECL Plus-Reagenzien von Amersham oder die Super-Signal-West-Fermento-Reagenzien von Pierce nach den Anleitungen der Hersteller benutzt. Durch Exposition eines Röntgenfilms (Kodak X-Omat) wurde das Ergebnis autoradiographisch festgehalten.

Tabelle 2: Für Immunoblot-Analysen verwendete Antikörper.

<b>Antigen, Epitop</b>	<b>Herkunft</b>	<b>bezogen von</b>	<b>Konzentration Stammlösung</b>	<b>Verdünnung</b>
Zyklin D1	Klon DCS6 (Maus)	Neomarkers	200 µg/ml	1:200
Zyklin D1	Klon DCS11 (Maus)	Neomarkers	200 µg/ml	1:200
Zyklin E	polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology (M20)	100 µg/ml	1:200
Zyklin A	polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology (H432)	200 µg/ml	1:200
Zyklin B1	Klon GNS1 (Maus)	Santa Cruz Biotechnology	100 µg/ml	1:200
Phospho-CDC2 (Tyr15)	polyklonal (Kaninchen)	Cell Signaling	unbekannt	1:1000
Phospho-Rb (Ser795)	polyklonal (Kaninchen)	Cell Signaling	unbekannt	1:1000
CDC6	Klon 180.2 (Maus)	Santa Cruz Biotechnology	200 µg/ml	1:200
CDK4	polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology (C-22)	200 µg/ml	1:200
MCM2	Klon 46 (Maus)	BD Transduction Laboratories	250 µg/ml	1:500
p15	polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology (K-18)	200 µg/ml	1:200
p16	polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology (M-156)	100 µg/ml	1:300
p18	Klon DCS-118	Neomarkers	200 µg/ml	1:200
p19	polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology (M-167)	200 µg/ml	1:200
p21	polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology	200 µg/ml	1:100
Kaninchen IgG	polyklonal (Ziege)	Dianova (Katalog-Nr. 111-035-045)	0,8 mg/ml	1:5000
Maus-IgG, Fc-Fragment	polyklonal (Ziege)	Sigma (Katalog-Nr. A 0168)	unbekannt	1:3000

### 2.13 Comassiefärbung

Um gleichmäßige Gelbeladung zu kontrollieren, wurden die SDS- Polyacrylamidgele für 30 min bei Raumtemperatur in einer Färbelösung (50% Methanol, 10% Essigsäure, 0,025% Coomassie brillant blue R250) geschüttelt. Anschließend folgte mehrmaliges Waschen mit dem Entfärber (30% Methanol, 10% Essigsäure), bis der Hintergrund vollständig entfärbt war. Danach wurde das Gel in einem Vakuumtrockner für 45 min bei 80 °C auf Whatmann-Papier (3MM) getrocknet.

### 2.14 Bestimmung von Zyklin-assozierten Kinaseaktivitäten

Um die Kinaseaktivität eines in einem Zellextrakt enthaltenen Proteins oder Proteinkomplexes zu messen, führt man in der Regel zuerst eine Immunpräzipitation mit einem gegen dieses Protein gerichteten Antikörper durch, um das solchermaßen gereinigte Protein dann in einer Kinasereaktion einzusetzen. In dieser wird ein geeignetes Substrat radioaktiv phosphoryliert, so dass nach gelelektrophoretischer Separierung des Substrats die zugehörige radioaktive Signalstärke Auskunft über die Höhe der präzipitierten Kinaseaktivität gibt. Nach diesem Prinzip wurde auch in dieser Arbeit vorgegangen, um die mit einzelnen Zyklinen assoziierten Kinaseaktivitäten zu bestimmen. Als Substrat diente Histon H1 und zur Analyse der Zyklin D1 assoziierten Kinaseaktivität Glutathion S-Transferase (GST)-Rb (379-928).

Bis zu 100 µg eines wie in Abschnitt 2.9 beschrieben hergestellten Zellextraktes wurden mit 0,1 µg eines Zyklinspezifischen Antikörpers für 1 h bei 0 °C in IPB (Endvolumen = 50 µl) inkubiert. Es wurden die in Tabelle 2 genannten Antikörper benutzt, gegen Zyklin D1 wurde der Klon DCS11 verwendet. Nach Verdünnung mit IPB auf 1 ml wurden die entstandenen Immunkomplexe mit 10 µl aufgeschlammter Protein A- oder Protein G- Sepharose (Sigma) für 12 h bei 4 °C präzipitiert. Damit die Agarosekügelchen ständig in Suspension gehalten werden konnten, wurden die Proben an einem drehenden Rad befestigt. Anschließend wurden die Immunpräzipitate viermal in IPB und zweimal in 50 mM Tris-Cl (pH 7,4)/10 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM DTT gewaschen. Ein Waschschrift bestand aus Resuspendierung, fünfminütiger Inkubation der Präzipitate in einer der genannten Pufferlösungen bei 0 °C und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 3500 g.

Die Immunpräzipitate wurden dann in 25 µl des Kinasereaktionspuffers (50 mM Tris-Cl [pH 7,4], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10 mM β-Glycerophosphat, 50 µM ATP) aufgenommen und die Kinasereaktion durch Zugabe von 5 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP und 5 µg Histon H1 (Roche, 223549) bzw. 1 µg (GST)-Rb gestartet. Die Reaktionsansätze wurden für 30 min bei 30 °C rotiert, durch Zugabe von SDS-Probenpuffer wurde dann die Reaktion beendet. Im Folgenden wurden die Proben mittels 12% SDS-PAGE (siehe 2.11) aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde der Teil des Geles, welcher das nicht eingebaute radioaktive ATP enthielt, abgeschnitten und der verbliebene Teil des Geles in 45% Methanol/10% Essigsäure für 20 min fixiert. Danach wurde das Gel auf Whatman-Papier (3MM) aufgezogen, getrocknet und autoradiographisch analysiert.

### **2.15 BrdU-Einbauexperimente / Bestimmung der Histon H3 Phosphorylierung**

Dem Kulturmedium infizierter und uninfizierter Kontrollzellen wurden mit Beginn der Serumrestimulation 10 µm BrdU zugesetzt und die Zellen darin bis zur Ernte (siehe 2.7) belassen. Danach wurden die Zellen in PBS/70% Ethanol fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen einmal in 1 ml eiskaltem PBS gewaschen, 3 min bei 200 g pelletiert, in 0,5 ml 2 N HCl resuspendiert und darin 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 200 g wurden die Zellen in 0,5 ml PBS und in 0,5 ml PBS/0,5% BSA, jeweils mit nachfolgender Zentrifugation (3 min, 200 g), gewaschen. Dann wurden sie erst mit einem Anti-BrdU Antikörper (Klon 3D4, Pharmingen), danach mit einem FITC-konjugierten Anti-Maus-IgG1 Antikörper (Klon A85-1, Pharmingen) inkubiert. Beide Bindungsreaktionen wurden unter Verwendung von 0,25 µg Antikörper in 50 µl PBS/0,5% BSA für 15 min bei Raumtemperatur ausgeführt und waren jeweils gefolgt von einem Waschschrift mit 0,5 ml PBS/0,5% BSA. Zum Schluss wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, mit Propidiumjodid gefärbt, um sie im Durchflußzytometer zu analysieren.

So wurde auch die Histon H3 Phosphorylierung bestimmt, dabei wurde ein Phospho-Histon H3 (Ser10) monoklonaler Mausantikörper der Firma Cell Signaling verwendet.

### **2.16 Behandlung mit Lambda Phosphatase**

Lambda Protein Phosphatase ist eine  $Mn^{2+}$  abhängige Phosphatase, die Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste dephosphoryliert. Die zu behandelnden Proteinextrakte wurden mit 2 mM  $MnCl_2$ , 1x Phosphatasepuffer und 1000 U Lambda Protein Phosphatase (New England BioLabs P0753S) für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die zur Kontrolle eingesetzten Proteinextrakte wurden ohne Phosphatase inkubiert. Durch die Zugabe von Laemmli Puffer wurde die Reaktion beendet. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE (siehe 2.11) aufgetrennt und mit dem Zyklin E spezifischen Antikörper (Tab. 2) analysiert.

### **2.17 Chromosomenpräparation**

Zum Spreiten der Chromosomen wurden die Zellen in 0,4% iger Kaliumchlorid (KCl) Lösung aufgenommen und für 10 Minuten mehrfach inkubiert. Nach der Behandlung mit der hypotonen Lösung folgte die Fixation mit Methanol und Eisessig (im Verhältnis 3:1).

Anschließend wurden Tropfpräparate erstellt. Nach der Giemsa-Färbung wurden die Präparate eingedeckt und mit einem Axiovert S100 Mikroskop der Firma Zeiss aufgenommen.

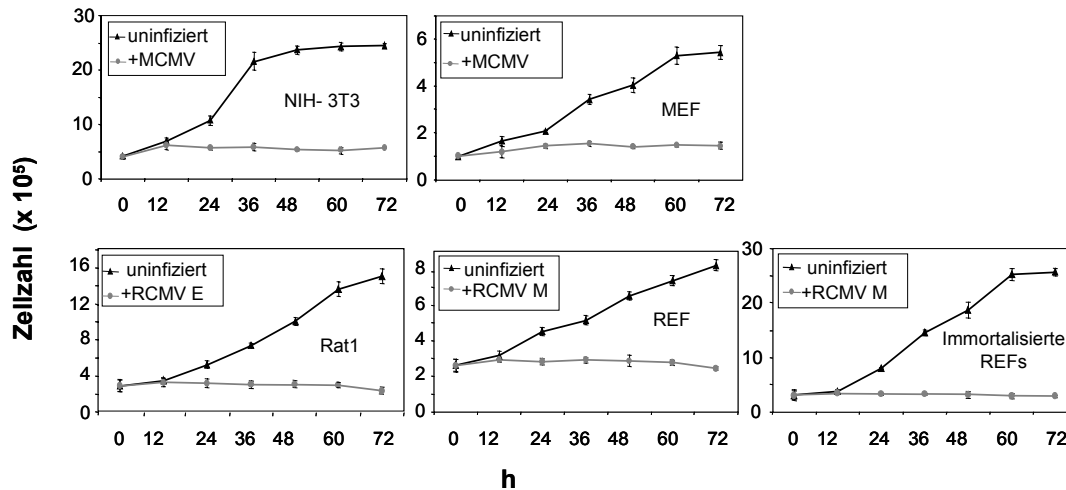
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Inhibition der Zellproliferation durch MCMV und RCMV

Um den Einfluss von Nager-Zytomegalieviren auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden unterschiedliche Zellen mit den gebräuchlichsten M/RCMV Stämmen: MCMV, Stamm „Smith“, RCMV, Stamm „Maastricht“ und RCMV Stamm „England“ infiziert.

Am Beginn der Experimente stand die Messung des Einflusses dieser Viren auf die Zellproliferation. Es wurden sowohl asynchron proliferierende verschiedene immortalisierte Zelllinien wie NIH-3T3 und Rat1 als auch primäre embryonale Fibroblasten von Ratte (REF) und Maus (MEF) infiziert. So konnten mögliche zelllinienspezifische Effekte und unterschiedliches Proliferationsverhalten der Zellen mit in die Untersuchungen einbezogen werden. An dem steigenden Verlauf des Graphen der uninfizierten Zellen (Abb. 8) kann man erkennen, dass die Zellen so ausplatziert wurden, dass die uninfizierten Zellen stetig über drei Tage proliferieren konnten. Über den beobachteten Zeitraum verdreifachte sich die Zahl der primären Zellen, während die immortalisierten Zellen wesentlich schneller proliferierten. Die Proliferationskurve der NIH-3T3 Zellen erreichte bereits nach 48 Stunden ein gleichbleibendes Niveau. Die infizierten Zellen (infiziert mit MOI = 10) zeigten keine Zunahme der Zellzahl (Abb. 8). Da im Lichtmikroskop kaum tote Zellen gesehen wurden, war dies ein erster Hinweis darauf, dass die Ursache für den Proliferationsstopp eher auf eine unterbundene Zellproliferation als auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen war. Diese Vermutung wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit durch Zellzyklusprofile infizierter Zellen belegt (siehe Abschnitt 3.2).

Bereits 8-12 h nach Infektion wird deutlich, dass alle Nager-CMV die Zunahme der Zellzahl komplett inhibieren. Dieser Effekt wird schon in der frühen Phase der Infektion beobachtet und impliziert, dass *early* oder *immediate-early* Virionproteine eine Rolle bei der Vermittlung dieses Effektes spielen könnten. Sowohl bei immortalisierten als auch bei primären Zellen konnte der gleiche antiproliferative Einfluss durch die Infektion beobachtet werden; dies zeigt, dass es sich offenbar nicht um zelllinienspezifische Effekte handelt. Zusammengefasst schlagen die Ergebnisse der Untersuchungen vor, dass Nager-CMV die Zellproliferation inhibieren, was in Übereinstimmung mit dem antiproliferativen Effekt von HCMV auf humane Vorhautfibroblasten steht (Lu und Shenk, 1996).



**Abbildung 8:** Zellproliferationskurven von infizierten und uninfizierten Zellpopulationen. Asynchron proliferierende NIH-3T3 Zellen, MEFs, Rat1 Zellen, REFs und immortalisierte REFs wurden mit M/RCMV (MOI=10) infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Anschließend wurde die Zellzahl in der Neubauerzählkammer bestimmt. In den Diagrammen ist die errechnete Zellzahl gegen die Erntezeitpunkte aufgetragen.

### 3.2 Blockierung der Zellzyklusprogression durch MCMV und RCMV

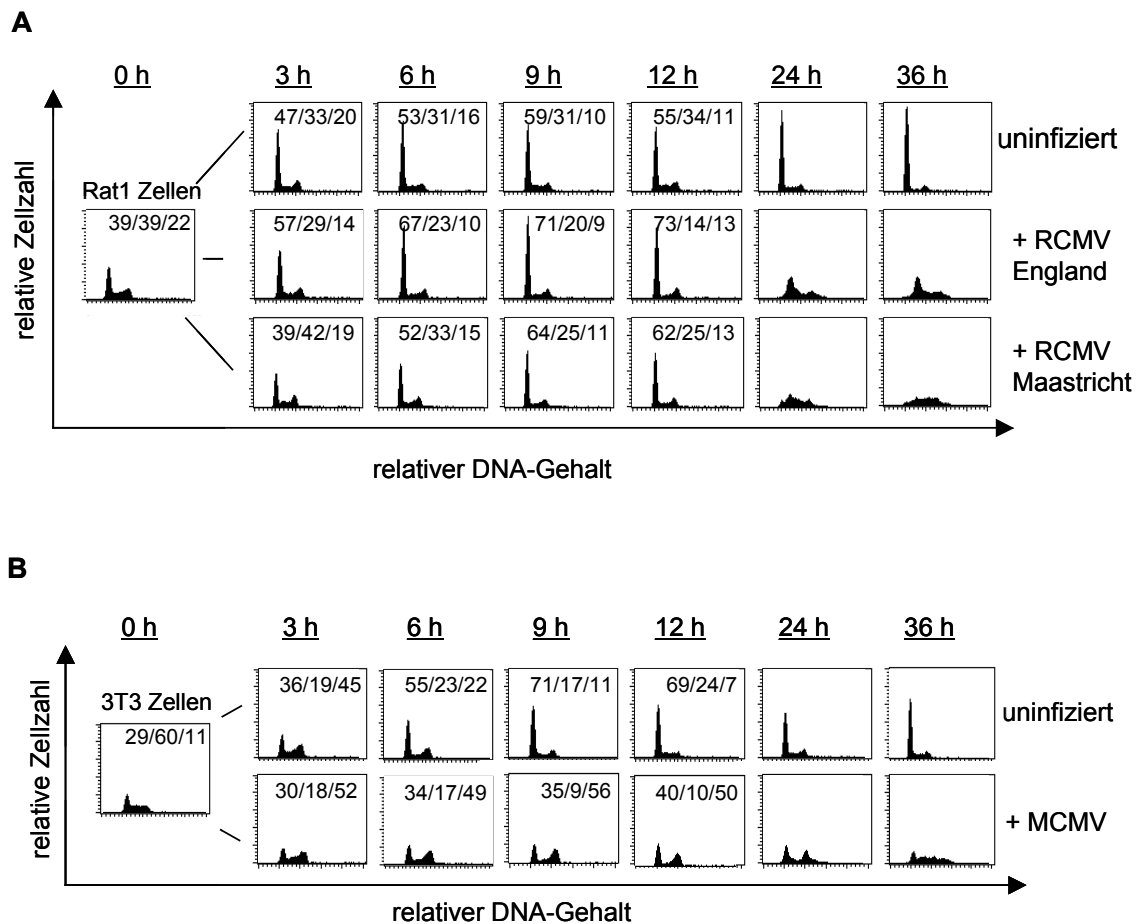
Um herauszufinden, ob dem beobachteten Proliferationsstopp ein Block in einer bestimmten Zellzyklusphase zugrunde lag, wurden mittels durchflußzytometrischer Bestimmung des DNA-Gehalts Zellzyklusprofile infizierter und nicht infizierter Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten erstellt. Um anhand der Stärke der Fluoreszenz den relativen DNA-Gehalt der Zellen im Durchflußzytometer zu messen, wurde die DNA der Zellen mit Propidiumjodid angefärbt. In eine Messung flossen ungefähr 10.000 einzelne Zellen ein. Daraufhin wurden DNA-Histogramme erstellt, in denen der relative DNA-Gehalt gegen die Zellzahl aufgetragen ist (Abb. 9). Das Zellzyklusprofil asynchron proliferierender Zellen zeigt zwei Peaks, die durch ein Plateau verbunden sind. Der erste Peak beinhaltet die Zellen der G1-Phase, der zweite die Zellen der G2- und M-Phase und das Plateau enthält die Zellen der S-Phase. Zellen, die sich ganz am Ende oder Anfang der S-Phase befinden, können durch diese Methode allerdings nicht von den G1- bzw. G2-Zellen abgegrenzt werden.

Die uninfizierten Zellen (Abb. 9, Diagramme der oberen Reihe) zeigen ein normales Zellzyklusverteilungsmuster von proliferierenden Zellen; auffallend ist hierbei ein größerer Anteil an Zellen in der S-Phase, der am ehesten auf die schnelle Proliferation der immortalisierten Zellen zurück zu führen ist. Im Verlauf des Experiments arretieren die uninfizierten Zellen aufgrund der Zelldichte frühzeitig nach 24 h in Rat1-Zellen bzw. nach 48 h in 3T3-Zellen, zu erkennen am gleichbleibenden G1-Anteil der Proliferationskurven.

Die Infektion der Zellen mit M/RCMV hat eine Änderung dieser Verteilung zur Folge: Bereits in den ersten 9 Stunden steigt der Anteil der G1-Zellen in den RCMV infizierten Populationen an (Abb. 9A). Es handelt sich bei RCMV E infizierten Zellen um einen Anstieg von 39% auf 73% und bei mit RCMV M infizierten Zellen auf 62%. Durch gleichzeitige Beobachtung der Zellen mit dem Lichtmikroskop wurde deutlich, dass die Anreicherung der G1-Zellen dabei nicht auf eine Kontaktinhibition zurückgeführt werden konnte (daher nicht gezeigt).

Bei den MCMV infizierten Zellen war ein geringerer Anstieg der G1-Population zu beobachten (Abb. 9B): von 29% auf 40%. Bemerkenswert ist, dass in den MCMV infizierten Zellen, im Gegensatz zu den RCMV infizierten Zellen, ein Anstieg des G2-Peaks von 11% auf 50% zu beobachten ist, was ein wahrscheinlicher Grund für den geringeren Anstieg des G1-Peaks in diesen Zellen darstellt, und erstmals andeutet, dass die Infektion mit Nager-CMV zu einem G2-Arrest führt.

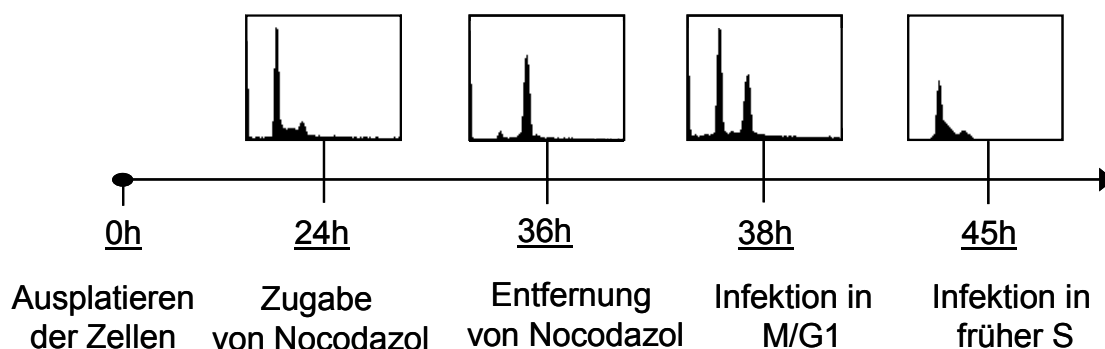
Nach 24 Stunden ist in den infizierten Zellpopulationen eine Verbreiterung und Verschiebung des G1-Peaks in die S-Phase, entlang der Achse des DNA-Gehalts, zu beobachten. Dieser Befund impliziert, dass G1-Zellen eine zusätzliche DNA-Last erfahren und deutet somit auf den Beginn der viralen DNA-Synthese hin. Diese Konstellation ist typisch auch für HCMV infizierte Zellen (Dittmer und Mocarski, 1997; Jault *et al.*, 1995; Lu und Shenk, 1996). Diese zusätzliche DNA-Synthese kann im weiteren Verlauf dieser Arbeit durch die Behandlung mit Ganciclovir unterbunden werden (siehe 3.4), was die virale Genese dieser DNA-Last belegt. So lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die RCMV infizierten Zellen vorwiegend in G1 und die MCMV infizierten Zellen in G1 und darüber hinaus vor allem auch in G2/M akkumulieren. Zusätzlich ist eine Abnahme der S-Phase-Zellen zu beobachten.



**Abbildung 9:** Zellzyklusverteilung M/RCMV infizierter Zellen. Die jeweilige Zellpopulation wurde zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Durch Propidiumjodidfärbung und anschließende durchflußzytometrische Bestimmung des DNA-Gehalts wurde dann ihre Zellzyklusverteilung ermittelt. Gezeigt sind DNA-Histogramme, in denen die prozentuale Verteilung auf die einzelnen Zellzyklusphasen (G0,G1/S/G2, M) vermerkt ist.

Wie oben gezeigt scheint es den Nager-CMV möglich zu sein, die Zellzyklusprogression infizierter Zellen in der G1- und G2/M-Phase zu unterbrechen. Um dies eindeutig zu belegen und Unterschiede aus zu schließen, die lediglich aus der ungleichmäßigen Zellzyklusverteilung der asynchron proliferierenden Ausgangspopulation resultieren, wurden in einem nächsten Experiment die Zellen vor der Infektion chemisch synchronisiert. Dabei wurde nach einem Schema verfahren, in dem Zellen durch Nocodazol reversibel in der Mitose arretiert werden. Nach Aufhebung des Nocodazolblocks durchlaufen die Zellen synchron die folgenden Zellzyklusphasen und wurden dann entweder in der späten M/frühen G1 oder in der frühen S-Phase infiziert (Abb. 10). Nocodazol ist ein viel benutzter, synthetischer Inhibitor der Mikrotubuliformierung (De Brabunder 1976). Aufgrund fehlender Ausbildung der mitotischen Spindel kommt es zu einem reversiblen Block in der Prometaphase der Mitose (Zieve 1980).

24 h nach dem Ausplattieren wurden die Fibroblasten für 12 h mit Nocodazol behandelt, was zu dem o.g. Zellzyklusblock in der Mitose führte (Abb. 10, 36 h). Nach der Entfernung von Nocodazol konnten die Zellen aus diesem reversiblen Zellzyklusblock ihre Zellzyklusprogression wieder aufnehmen und erreichten so nach 38 h die späte M- und frühe G1-Phase (M/G1) (Abb. 10, 38 h) und nach 45 h die frühe S-Phase (Abb. 10, 45 h). Die so synchronisierten Zellen wurden dann in der M/frühen G1 oder in der frühen S-Phase mit den verschiedenen CMV Stämmen infiziert und die Zellzyklusverteilung wurde 12 h und 24 h nach der Infektion untersucht (siehe Abb. 11).



**Abbildung 10:** Synchronisation der Zellen mit Nocodazol. Zellen wurden durch 50 ng/ml Nocodazol reversibel in der Prometaphase der Mitose arretiert. Die solchermaßen synchronisierten Zellen wurden in der Folge in M/G1- oder in früher S-Phase infiziert (MOI=10). Die gezeigten DNA-Histogramme demonstrieren den Erfolg der Synchronisierung und die Zellzyklusverteilung zu den Zeitpunkten der Infektion.

12 h nach Restimulation in M/G1 haben uninfizierte Kontrollzellen überwiegend die G2-Phase erreicht (Abb. 11, 38 h nach Ausplattierung/12 h/uninfiziert). Nach 24 h (Abb. 11, 38 h nach Ausplattierung/24 h/uninfiziert) befindet sich der größte Teil dieser Ausgangspopulation wieder in der G1-Phase und die Proliferation wird normal fortgesetzt.

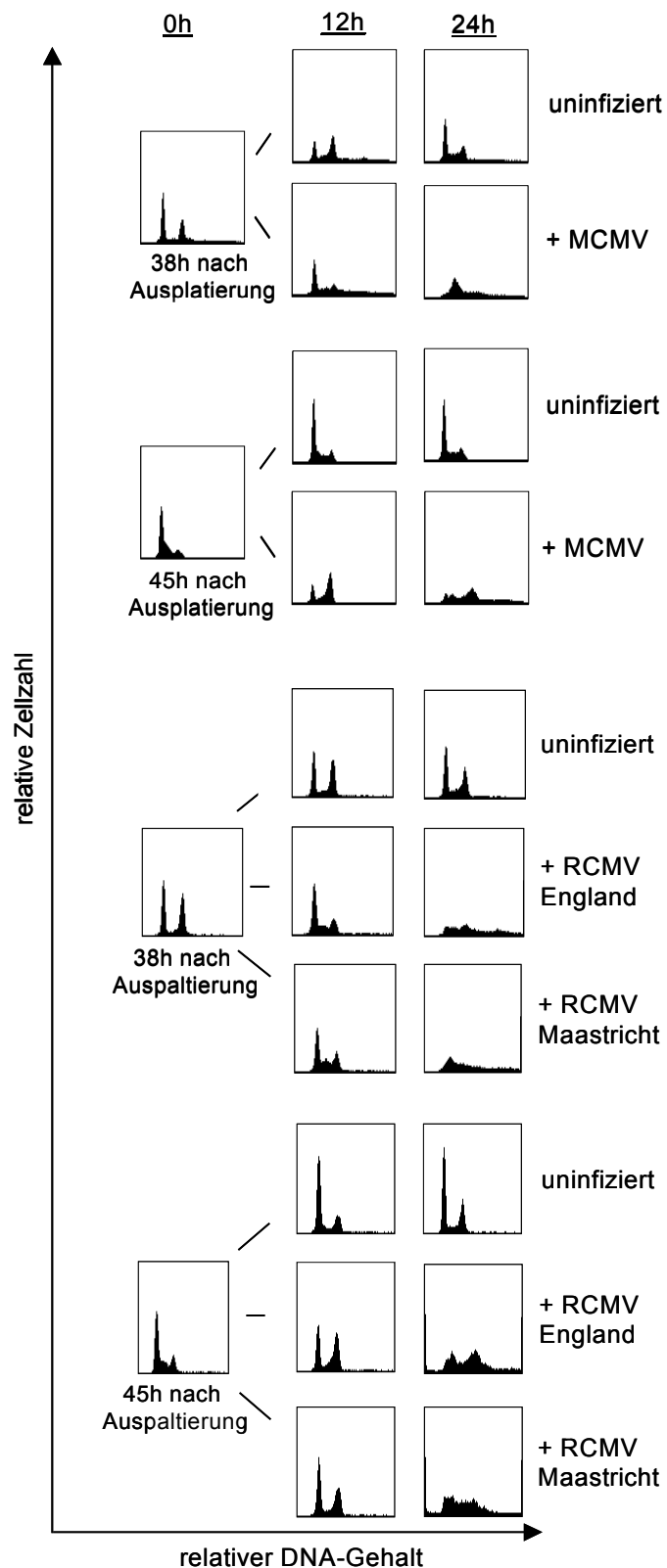
Im Gegensatz zu uninfizierten Zellen erreichen in M/G1 mit M/RCMV infizierte Zellen zum überwiegenden Teil nicht die G2-Phase, statt dessen akkumulieren sie 12 h nach Infektion in der G1-Phase (Abb. 11, 38 h nach Ausplattierung/12h/+ CMV). Dies deutet darauf hin, dass die mit M/RCMV infizierten Zellen in der G1-Phase arretieren. Wie bereits in Abschnitt 3.2 beschrieben, setzt nach 24 h die virale Replikation ein, was keine weitere Analyse der genauen Zellzyklusprogression erlaubt.

Kontrollzellen, die 45 h nach dem Ausplattieren (also 9 h nach Restimulation) in der späten G1/frühen S-Phase sind, erreichen nach 57 h (Abb. 11, 45 h nach Ausplattierung/12 h/uninfiziert) synchron erneut die G1-Phase und proliferieren normal weiter. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellzyklusprofile der in der späten G1/frühen S-Phase infizierten Zellen einen G2/M-Arrest. Da auch diese Zellen, ohne die

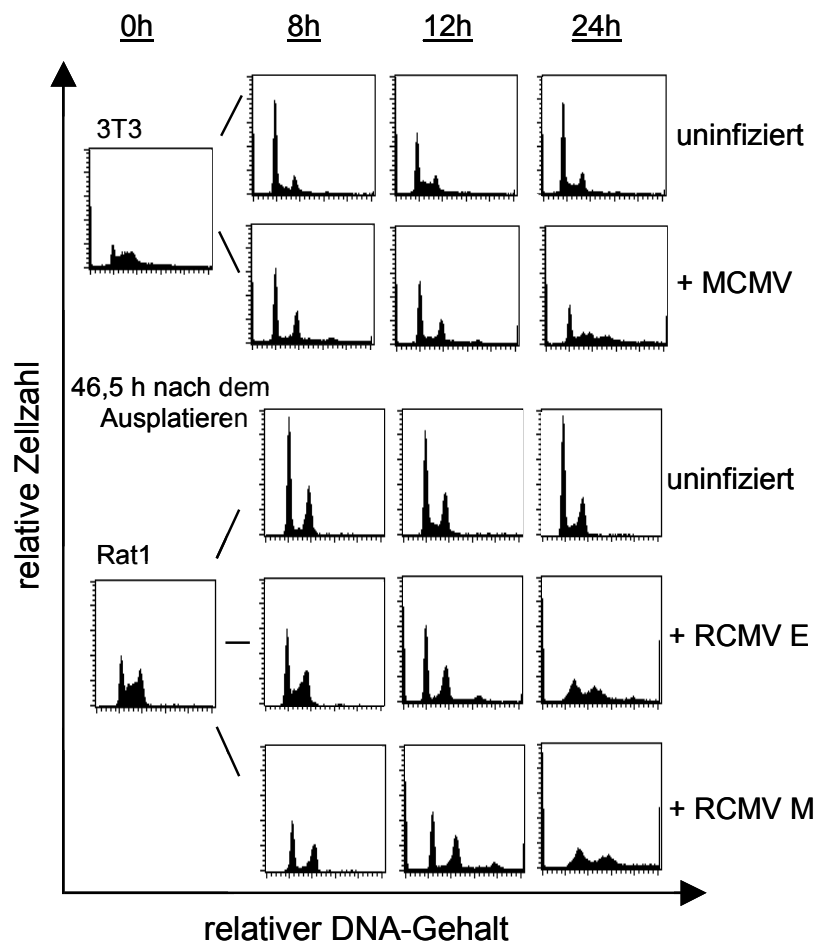
G1-Phase wieder zu erreichen, virale DNA produzieren, zeigt dies, dass die Nager-CMV, im Gegensatz zu HCMV (Salvant *et al.*, 1998), Zellen in der frühen S-Phase infizieren und die virale DNA-Synthese starten können.

Interessanterweise verursacht eine Infektion von Zellen in der späten S-Phase (46,5 h nach dem Ausplätieren) hingegen keinen G2/M-Phase-Arrest (Abb. 12). Wie die Kontrollzellen (Abb. 12, uninfiziert) erreichen infizierte Zellen deshalb nach der Synchronisation wieder die G1-Phase (Abb. 11, 45 h nach Ausplätierung/+ CMV). Offensichtlich machte es einen entscheidenden Unterschied für die weitere Zellzyklusprogression bzw. den viralen Infektionszyklus, ob Zellen am Beginn oder am Ende der S-Phase infiziert werden.

Diese Ergebnisse veranschaulichen (Abb. 12), dass sowohl MCMV als auch beide RCMV Stämme in der Lage sind, Zellen in der G1- und G2/M-Phase zu arretieren. Dies steht im Kontrast zu HCMV, welches Zellen nur in der G1-Phase blockiert.



**Abbildung 11:** MCMV und RCMV arretieren Zellen in G1 und G2/M. Zellen wurden wie bereits in Abb. 10 beschrieben in M/G1 bzw. früher S-Phase infiziert. Zu den genannten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, mit Propidiumjodid gefärbt und ihr DNA-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt. Gezeigt ist die Zellzyklusverteilung M/RCMV infizierter und nicht infizierter Zellen in DNA- Histogrammen.



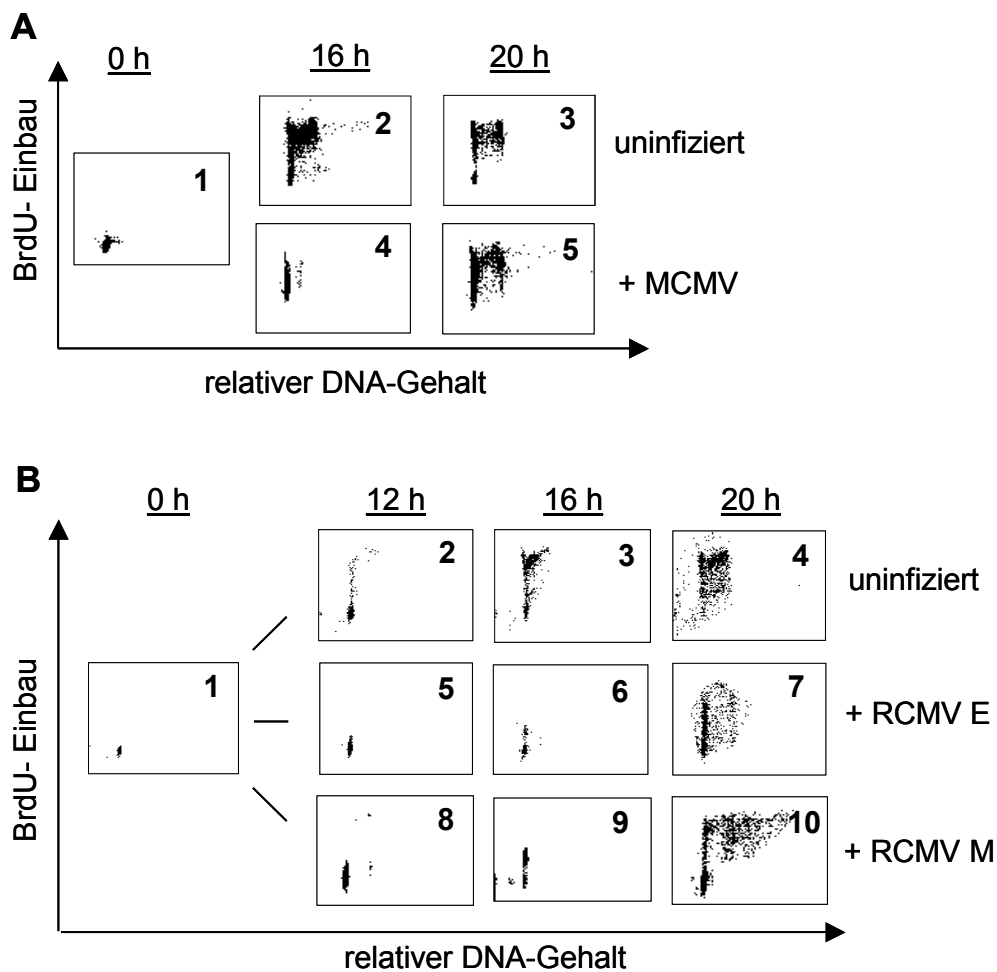
**Abbildung 12:** Die Infektion in der späten S-Phase ist für den G2/M-Arrest nicht ausreichend. Es wurde wie in Abb. 11 beschrieben verfahren. Die Zellen wurden 46,5 h nach dem Ausplätieren infiziert, als sie sich in der späten S-Phase befanden. Gezeigt ist die Zellzyklusverteilung M/RCMV infizierter und nicht infizierter Zellen in DNA-Histogrammen.

Um diese Zellzykluseinflüsse von MCMV und RCMV durch weitere unabhängige Experimente zu bestätigen wurde getestet, ob eine Infektion serumarretierter Zellen diese daran hindern, nach Serumrestimulation wieder in den Zellzyklus einzutreten und diesen zu durchlaufen.

Um die Zellen in G0 zu akkumulieren, wurde den Zellen 72 h das Serum entzogen. Nach der dann folgenden Infektion und Serumrestimulation wurde dem Zellkulturmedium das Thymidin-Analog BrdU hinzugefügt. Dadurch wurde bis zur Ernte in neu synthetisierte DNA BrdU inkorporiert. Eine DNA-Neusynthese war auf diese Weise durch BrdU-spezifische Antikörper nachzuweisen. Eine Doppelfärbung der geernteten Zellen mit Propidiumjodid und direkt FITC-markierten BrdU-Antikörpern macht darüber hinaus eine eindeutige Darstellung aller Zellzyklusphasen möglich. Dargestellt sind die Ergebnisse in *Density Dot Blots*, in denen der DNA-Gehalt gegen die Menge an eingebautem BrdU aufgetragen ist.

### III. Ergebnisse

In uninfizierten Zellen ist bereits nach 12 h BrdU nachzuweisen. Sie haben also begonnen, ihre DNA zu replizieren (Abb. 13B, Diagramm 2) und verteilen sich nach 16h über die gesamte S-Phase (Abb. 13A, 2 und 13B, 3), was sich an der Verschiebung entlang der BrdU-Achse erkennen lässt. Im Gegensatz dazu sind die infizierten Zellpopulationen zu frühen Zeitpunkten noch BrdU-negativ (Abb. 13B Diagramm 5 und 8), d. h., es wurden anstatt der BrdU-Einbau signalisierten FITC-Fluoreszenzen nur die Autofluoreszenzen von G1-Zellen gemessen. Eine DNA-Synthese infizierter Zellen ist erst nach 16 h zu beobachten und reflektiert dann sowie nach 20 h, am ehesten die virale DNA-Replikation. Zum Nachweis viraler DNA siehe auch Abb. 13, Diagramme 5A und 6B, 9B, 7B und 10B. Vor dem Hintergrund der bisherigen Versuche unterstützen somit auch diese Ergebnisse die Sichtweise, dass Zellen, die aus der G0/G1-Phase kommen, durch die Infektion mit M/RCMV in der G1-Phase arretieren.



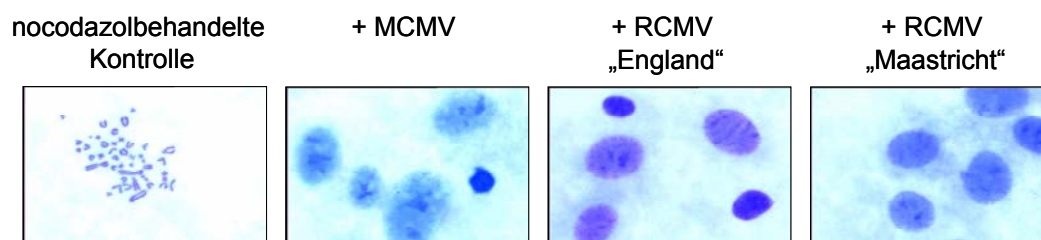
**Abbildung 13:** BrdU-Einbau infizierter Zellen. Zellen wurde 72 h das Serum entzogen, um sie in G0 zu akkumulieren. Nach der dann folgenden Infektion mit MCMV (A) bzw. RCMV (B) in Anwesenheit von Serum wurde dem Zellkulturmedium das Thymidin-Analog BrdU zugefügt. Eine Doppelfärbung der geernteten Zellen mit Propidiumjodid und FITC-markiertem BrdU-Antikörper machte somit die Darstellung der DNA-Neusynthese möglich. Dargestellt sind die Ergebnisse in *Density Dot Blots*, in denen der DNA-Gehalt gegen die Menge an eingebautem BrdU aufgetragen ist.

### 3.3 Der späte Zellzyklusarrest liegt in der G2-Phase und nicht in der Mitose

Die bisher gezeigten durchflußzytometrischen Analysen lassen offen, ob der durch M/RCMV hervorgerufene Zellzyklusarrest in der G2-Phase oder der Mitose stattfindet. Um diesen späten Zellzyklusarrest in diesem Sinne genauer zu charakterisieren, wurden im Folgenden infizierte Zellen auf die Anwesenheit von Mitosemarkern untersucht.

Als ein erster Marker bietet sich die Untersuchung des Zustandes der Chromosomen an. In der ersten Phase der Mitose, der Prophase, erfolgt neben der Auflösung der Kernmembran und der Wanderung der Zentriolen zu den Polen auch die Kondensation der Chromosomen. Durch entsprechende Chromosomenpräparation ist es möglich, den Zustand der Chromosomenkondensation zu beurteilen. So wurden NIH-3T3 Zellen und Rat1 Zellen, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, mit Nocodazol synchronisiert, in der frühen S-Phase infiziert und nach 12 h, als die Zellen in G2/M arretiert waren, geerntet und der Chromosomenpräparation unterzogen. Ein Teil der verwendeten Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie analysiert, um sicher zu sein, dass die Zellpopulation dem durch M/RCMV induzierten Proliferationsstopp in G2/M unterlag. Es zeigt sich dabei, dass die für die Analyse verwendeten infizierten Zellen zu mehr als 90% in der M/G2-Phase arretiert waren (Daten nicht gezeigt). Als Kontrollzellen dienten NIH-3T3 und Rat1 Zellen, die 12 h mit Nocodazol behandelt worden waren. Es konnte gezeigt werden, dass die Chromosomen dieser Kontrollzellen bereits kondensiert waren (Abb. 14, nocodazolbehandelte Kontrolle).

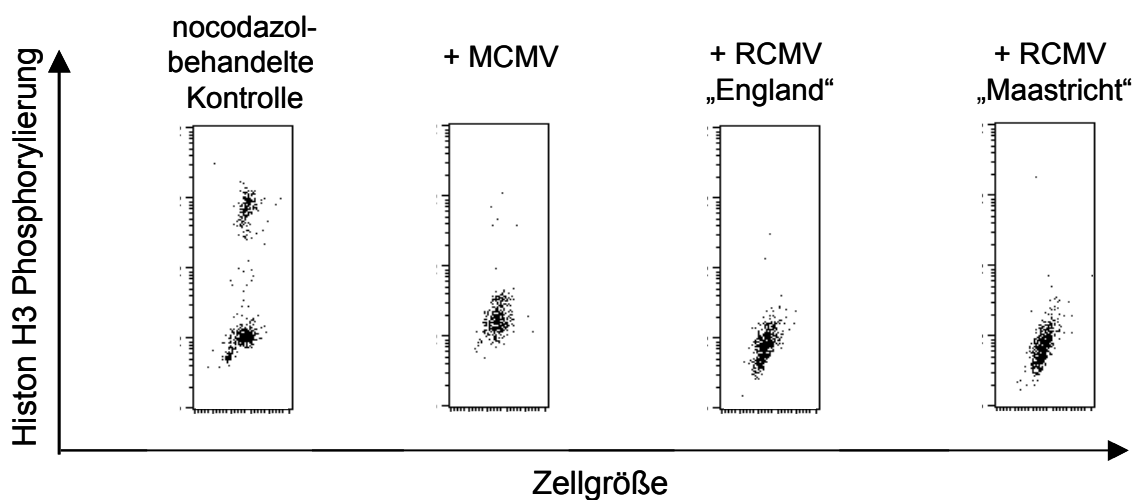
Im Gegensatz dazu ergab die Analyse der CMV-arretierten Zellen noch keine Chromosomenkondensation (Abb. 14, + CMV). Das bedeutet, dass sich die infizierten Zellen noch in der Interphase des Zellzyklus befinden müssen und somit in G2 arretiert waren.



**Abbildung 14:** Chromosomenpräparate infizierter Zellen. Nocodazol behandelte Zellen wurden in der frühen S-Phase infiziert, zum Zeitpunkt des G2/M-Arrestes geerntet und wie bereits beschrieben durchflußzytometrisch analysiert. Dann erfolgte die hier gezeigte Chromosomenpräparation und die Färbung des Zellmaterials mit dem Giemsa-Farbstoff.

Dieses Ergebnis sollte mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden. Im Kontrast zu der Histon H1 Phosphorylierung, die während des gesamten Zellzyklus erfolgt, wird die stärkere Phosphorylierung des Histon H3 nur im Zusammenhang mit der Chromosomenkondensation, somit zu Beginn der Mitose, gefunden (Hendzel *et al.*, 1997). Die H3 Phosphorylierung kann also ebenfalls als Marker für die frühe Mitose benutzt werden.

Die durch CMV in G2/M arretierten Zellen wurden mit einem phosphospezifischen Anti-Histon H3 Antikörper inkubiert, und die dann folgende Doppelfärbung mit Propidiumjodid und einem FITC-konjugierten Antikörper machte die Darstellung des phosphorylierten Histon H3 mittels Durchflusszytometrie möglich. Dargestellt sind die Ergebnisse in *Density Dot Blots*, in denen die Zellgröße gegen das phosphorylierte Histon H3 aufgetragen ist. Während die uninfizierten, nocodazolbehandelten Kontrollzellen deutlich die Phosphorylierung von Histon H3 erkennen lassen, kann in den infizierten Zellen keine phosphorylierte Form von Histon H3 nachgewiesen werden (Abb. 15). Somit zeigen beide Ergebnisse, dass der durch M/RCMV verursachte späte Zellzyklusarrest in der G2-Phase erfolgt, bevor die Zellen in die Mitose eintreten.

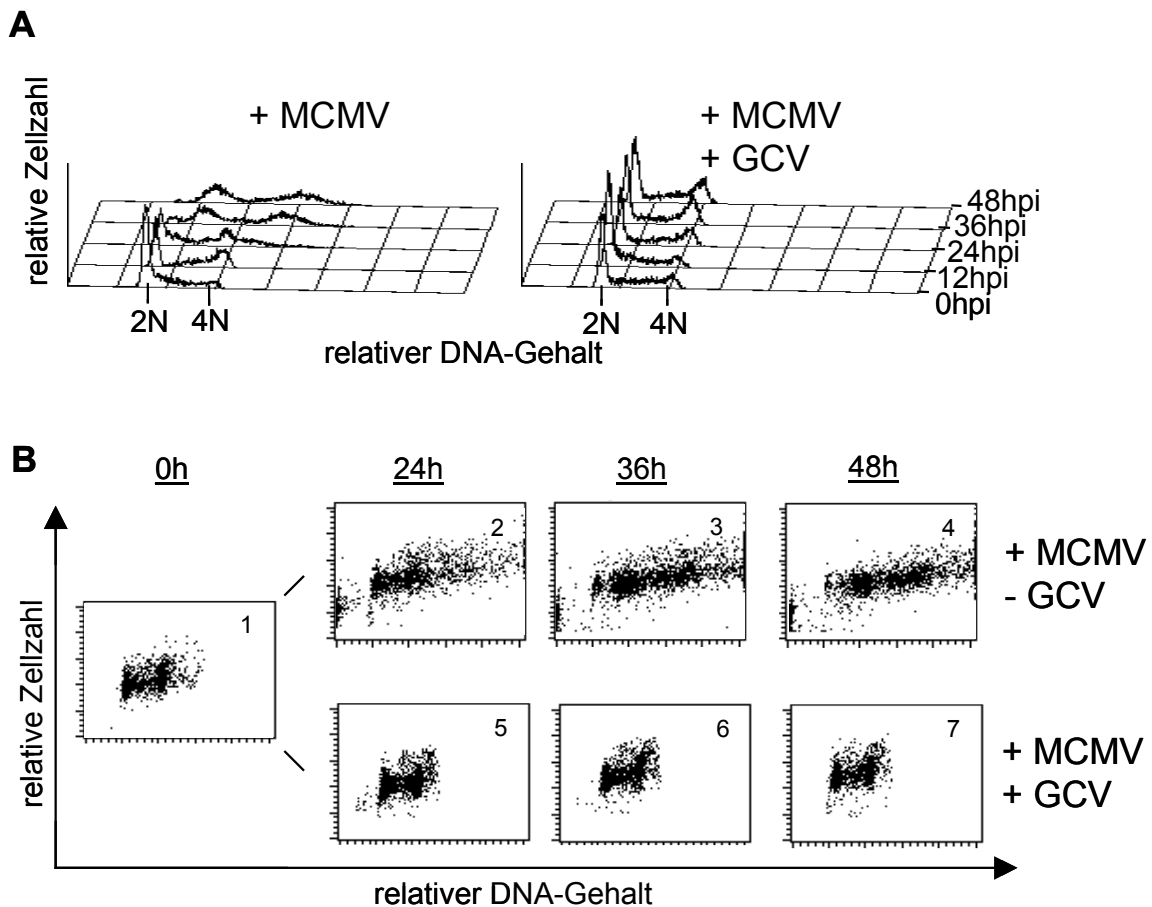


**Abbildung 15:** Histon H3 Phosphorylierung. Die Zellen wurden wie in Abb. 14 beschrieben infiziert. Die durch CMV in G2 arretierten Zellen wurden nach der Ernte mit einem phosphospezifischen Histon H3 Antikörper behandelt und das Signal des phosphospezifischen Histon H3 Antikörpers wurde im Durchflußzytometer gemessen. Als Kontrolle dienten nocodazolbehandelte Zellen. In den gezeigten *Dot Blots* ist die Zellgröße gegen die Histon H3 Phosphorylierung aufgetragen.

#### 3.4 MCMV und RCMV replizieren sowohl in G1 als auch in G2

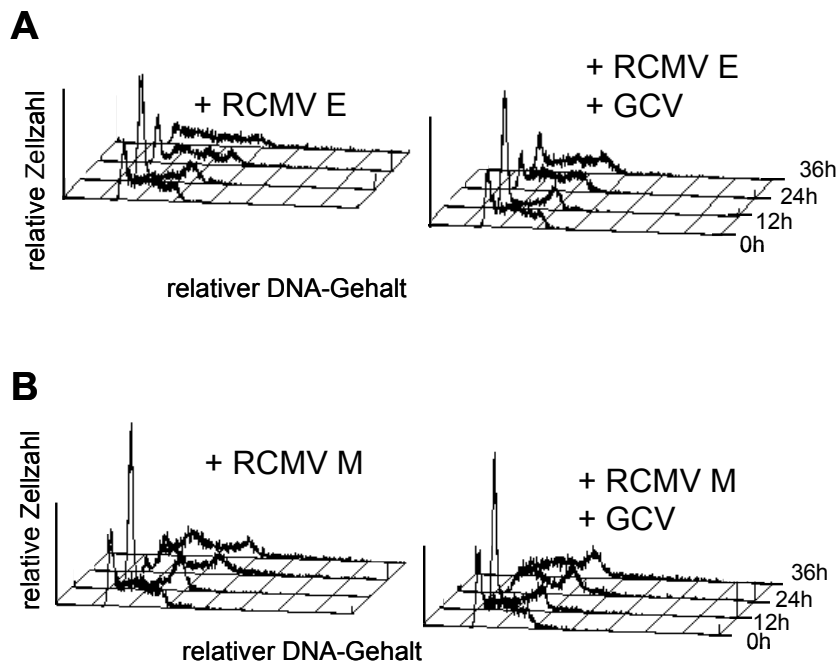
Bisher konnte gezeigt werden, dass MCMV und RCMV in der Lage sind, Zellen in G1 und G2 zu arretieren. In den gezeigten Zellzyklusprofilen infizierter Zellen ist jedoch außerdem eine zusätzliche DNA-Synthese beobachtet worden. Deshalb sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob es sich bei dieser DNA tatsächlich um virale DNA handelt und ob MCMV und RCMV (im Gegensatz zu HCMV) auch von G2 aus ihr Genom replizieren können. Um eindeutig zwischen viraler und zellulärer DNA-Replikation unterscheiden zu können, erfolgte die Behandlung von Zellen mit spezifischen Inhibitoren der viralen DNA Replikation. Ganciclovir (GCV) wird in die DNA

eingebaut und hemmt dadurch spezifisch die virale DNA-Polymerase, nicht aber die zelluläre. Foscarnet (PFA), das ebenso die virale DNA-Polymerase hemmt, blockiert die Bindungsstellen von Pyrophosphat. Asynchron proliferierende Zellen wurden wie gewohnt infiziert. Nach der Absorptionszeit wurden in den ersten Versuchen 50  $\mu\text{M}$  Gancyclovir zugegeben. Anschließend wurden die Zellen zu entsprechenden Zeitpunkten geerntet und ihr DNA-Gehalt mit Hilfe der Propidiumjodidfärbung durchflußzytometrisch bestimmt. Neben infizierten Zellen wurden auch uninfizierte Zellen mit GCV behandelt, was zeigte, dass der Wirkstoff *per se* keinen Effekt auf die Zellzyklusverteilung hat (Daten hier nicht gezeigt). Nur in MCMV und nicht in RCMV infizierten Zellen konnte die virale DNA-Synthese durch GCV Zugabe gehemmt werden (Abb. 16). In Abbildung 16A wurde eine dreidimensionale Darstellung der DNA-Histogramme gewählt, um einen besseren Vergleich der Kurven zu ermöglichen. Zusätzlich sind in Abb. 16B die Ergebnisse in *Density Dot Blots* dargestellt. 12 h nach der Infektion mit MCMV befindet sich der größte Teil der Zellen in der G1 und G2-Phase, während sich die S-Phase entleert hat. Die Zellzyklusverteilung stimmt also mit den bisherigen Beobachtungen überein. Nach 24 h ist die virale Replikation bereits zu erkennen: der G1 und G2 Peak verschiebt und verbreitert sich horizontal auf der Abszisse, was dafür spricht, dass sowohl von der G1 als auch von der G2-Phase aus virale Replikation beginnt (Abb. 16A). Deutlicher werden diese Ergebnisse durch die Darstellung in Abb. 16B, die Signale in den Diagrammen 2, 3 und 4 „wandern“ die Abszisse entlang hin zum Bereich des höheren DNA-Gehalts; 36 bzw. 48h nach Infektion sind die Effekte jeweils massiv verstärkt. Diese Effekte werden durch die Behandlung mit GCV gänzlich unterdrückt, und die Analysen ergeben normale Zellzyklusprofile proliferierender Zellen (Abb. 16A und 16B/+MCMV +GCV). Dies zeigt, dass die neu synthetisierte DNA tatsächlich viralen Ursprungs ist. In den infizierten Zellen sind 36 h nach Infektion zwei Peaks zu beobachten, die GCV unterdrückt und somit durch die Anhäufung viraler DNA verursacht werden. Der erste entsteht zwischen 2N und 4N DNA-Gehalt und der zweite hinter dem 4N DNA-Gehalt. Diese Ergebnisse belegen somit, dass MCMV sowohl in G1 als auch in G2 arretierten Zellen DNA replizieren kann.



**Abbildung 16:** Virale, GCV sensitive DNA-Synthese in G1- und G2-Zellen. NIH-3T3 Zellen wurden wie beschrieben in An- bzw. Abwesenheit von Gancyclovir (GCV) infiziert. Zu den genannten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und ihre Zellzyklusverteilung analysiert. Die Ergebnisse wurden sowohl als DNA-Histogramme dreidimensional (A) als auch als *Density Dot Blots* (B) dargestellt.

Im Gegensatz zu diesen eindeutigen Befunden mit MCMV, konnte die virale Synthese weder von RCMV E noch von RCMV M durch GCV gestoppt werden (Abb. 17 A und B). Die RCMV infizierten Zellen zeigen das bereits beschriebene typische Zellzyklusbild infizierter Zellen mit zusätzlichen Peaks der Zellzykluskurven an den Stellen zwischen 2N und 4N und größer 4N (Abb. 17 A und B + RCMV). Dieses Bild konnte jedoch durch die Zugabe von GCV nicht beeinflusst werden (Abb. 17 A und B +RCMV +GCV), die virale DNA-Synthese konnte also nicht durch GCV gehemmt werden.

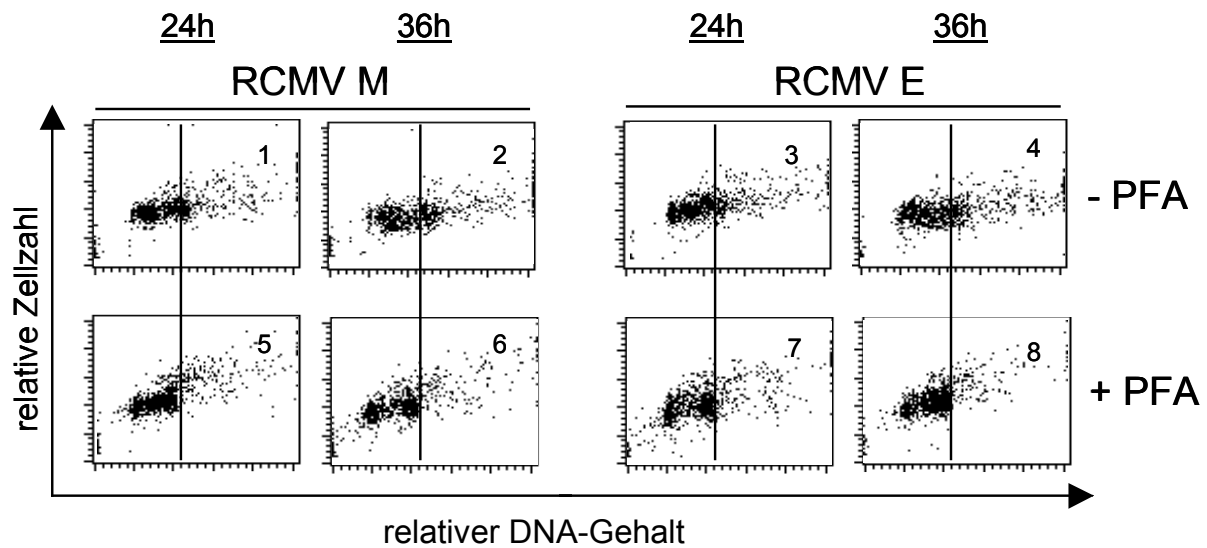


**Abbildung 17:** GCV hat keinen Einfluss auf RCMV infizierte Zellen. Rat1 Zellen wurden wie beschrieben in An- bzw. Abwesenheit von Gancyclovir (GCV) infiziert. Zu den genannten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und ihre Zellzyklusverteilung analysiert. Die Ergebnisse wurden dreidimensional in DNA-Histogrammen dargestellt.

Für GCV ist aus der Literatur (Brideau *et al.*, 2002) und aus eigenen Versuchen bekannt, dass es die virale Replikation von RCMV nicht eindeutig verhindern kann, deswegen wurde auf den Hemmstoff Foscarnet (PFA) zurückgegriffen. Es wurde wie oben beschrieben verfahren, wobei nach der Absorptionszeit den Zellen nun 300 µg/ml PFA zugesetzt wurde.

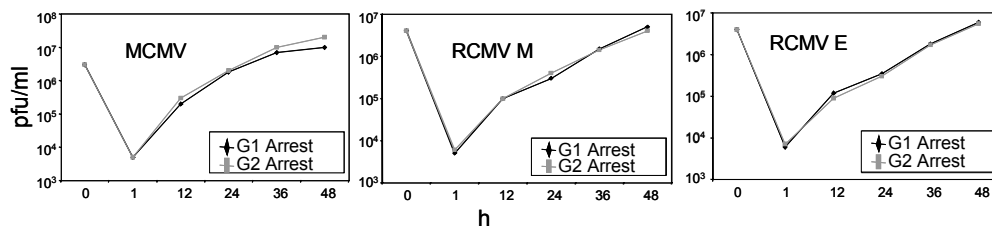
Eigene Beobachtungen zeigten, dass durch den Zusatz von PFA kein Einfluss auf MCMV infizierte Zellen erzielt wird (Daten nicht gezeigt). Bei den RCMV infizierten Zellen konnte eine Inhibition der viralen DNA-Synthese beobachtet werden. Aus Abb. 18 wird deutlich, dass in den infizierten Zellen (Diagramme 1, 2, 3, 4) eine Verschiebung des DNA-Gehalts weit hinter den Bereich des 4N DNA-Gehalts von G2 Zellen (gekennzeichnet durch die vertikale Linie) erfolgt, was auf virale DNA-Synthese (wie bereits beschrieben) hinweist.

Werden die infizierten Zellen mit PFA behandelt, nimmt die Dichte der Zellen in diesem Bereich ab (Abb. 18, Diagramme 5, 6, 7 und 8). Es ist bekannt, dass verschiedene Hemmstoffe unterschiedlich sensitiv sind (Brideau *et al.*, 2002). Da Inhibitoren also nicht immer gleich zu wirken scheinen, weist die nicht qualitative Wirkung von PFA in Analogie zum Maussystem darauf hin, dass es sich auch hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um virale DNA handelt.



**Abbildung 18:** PFA reduziert virale DNA-Replikation. Rat1 Zellen wurden wie beschrieben in An- bzw. Abwesenheit von Foscarnet (PFA) infiziert. Zu den genannten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und ihre Zellzyklusverteilung analysiert. Die Ergebnisse wurden als auch als *Density Dot Blots* dargestellt, in denen der relative DNA-Gehalt gegen die relative Zellzahl aufgetragen ist. Die vertikale Linie markiert die Stelle des 4 N DNA-Gehalts von Zellen die sich in der G2-Phase des Zellzyklus befinden.

Da virale DNA-Replikation sowohl von der G1- als auch von der G2-Phase aus beobachtet werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob in den G1- und in den G2-arretierten Zellen auch jeweils infektiöse Virionen gebildet werden. Um diese Frage zu klären wurde nach dem in Abbildung 10 vorgestellten Protokoll vorgegangen. Der Überstand der so in G1 und G2 arretierten Zellpopulationen wurde mittels *Plaque-Assays* auf den Gehalt infektiöser Virusnachkommen untersucht. Es wurden alle Nager-CMV in die Analyse einbezogen. In Abb. 19 sind die Ergebnisse der Titrations (in PFU/ml) gegen die Erntezeitpunkte aufgetragen. Die Diagramme (Abb. 19) zeigen, dass die Menge an infektiösen Virionen in G1- und G2- arretierten Zellen nahezu gleich ist. Das demonstriert eindeutig, dass MCMV und RCMV nicht nur Zellen in G1 und G2 arretieren und dort virale DNA replizieren sondern im Unterschied zu HCMV (Fortunato *et al.*, 2002; Salvant *et al.*, 1998) in beiden Zellzyklusphasen auch produktiv replizieren können.



**Abbildung 19:** Produktion infektiöser Virionen von M/RCMV in G1- und G2-Zellen. Gezeigt sind die Titer der infektiösen Virusnachkommen von Überständen infizierter in G1 und G2 arretierter Kulturen, die mithilfe des Plaque-Assays ermittelt wurden. Zellen wurden wie in Abb. 11 dargestellt infiziert. Zu den genannten Zeitpunkten wurden die Überstände gerettet und in *Plaque-Assays* analysiert.

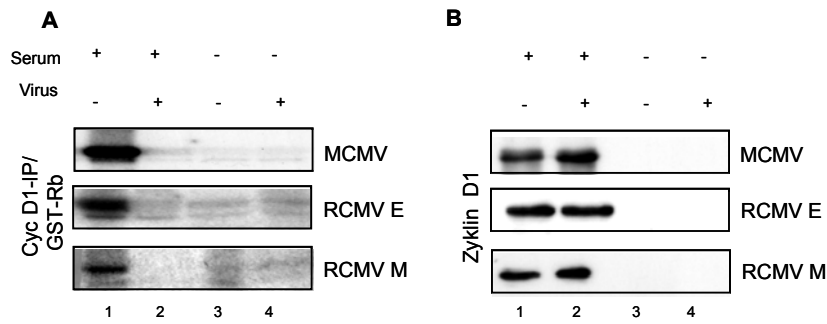
### 3.5 Deregulation molekularer Zellzyklusregulatoren durch M/RCMV

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der molekularen Grundlagen, des durch M/RCMV verursachten Zellzyklusarrestes. Der durch HCMV verursachte G1-Arrest geht mit veränderten Zyklin-assozierten Kinaseaktivitäten und Beeinflussung unterschiedlicher Zellzyklusregulatoren einher. Aus diesem Grund wurde besonderes Augenmerk auf die Analyse der unterschiedlichen Zykline, den dazugehörigen Zyklin-assozierten Kinasen und verschiedener Zellzyklusregulatoren gelegt, um zu eruieren welche Mechanismen zwischen den Zytomegalieviren konserviert sind.

Der Einfluss von M/RCMV auf die Glieder des Zellzyklus wurde untersucht indem Extrakte von infizierten in G1 arretierten Fibroblasten erstellt wurden, die dann mittels *in vitro* Kinaseassays auf die Aktivitäten der Zyklin D1, E, A und B1-assozierten Kinasen analysiert wurden. Um einen Einblick zu bekommen wie die Zyklin-assozierten Kinaseaktivitäten in infizierten Zellen reguliert werden, wurde außerdem die Zyklin-Proteinexpression (Zyklin D1, E, A und B1), die CKI-Proteinexpression (p15, p16, p17, p19) und der Phosphorylierungszustand von CDK1 bestimmt.

#### 3.5.1 Repression der Zyklin D1-assozierten Kinaseaktivität

Passend zum Zellzyklusverlauf wurde mit der Analyse von Zyklin D1 und der Zyklin D1-assozierten Kinaseaktivität begonnen. Obwohl in infizierten Zellen die Zyklin D1-assozierte Kinaseaktivität fehlte (Abb. 20A, Bahn 2 und 4), konnten in serumbehandelten infizierten und uninfizierten Zellen gleiche Zyklin D1-Proteinlevel nachgewiesen werden (Abb. 20B, Bahn 1 und 2).

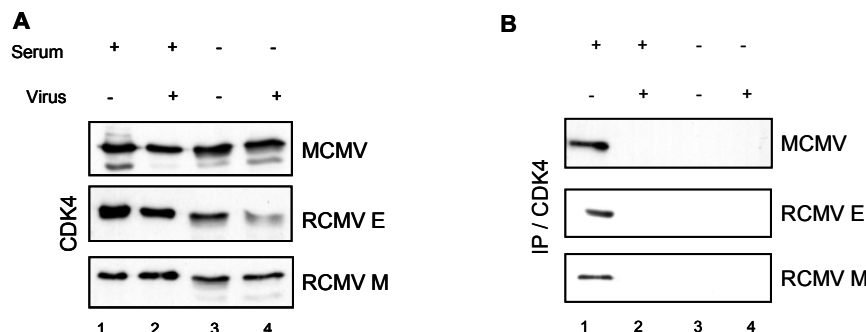


**Abbildung 20:** Einfluss von M/RCMV auf die Expression von Zyklin D1 und die Zyklin D1-assoziierte Kinaseaktivität. Quieszente Zellen wurden in An- bzw. Abwesenheit von Serum infiziert. Die Zellen wurden nach 16 Stunden, wenn serumrestimulierte Zellen die S-Phase erreicht hatten, geerntet und Proteinextrakte wurden erstellt. In diesen wurde mit Hilfe von *in vitro*- Kinaseassays die Zyklin-assoziierten Kinaseaktivitäten (A) mit GST-Rb als Substrat bestimmt. Des weiteren wurden die Extrakte auf Zyklinexpression (B) in Immunoblotanalysen mit Zyklin-spezifischen Antikörpern untersucht.

Um eine mögliche Ursache für die reduzierte Zyklin D1- assoziierte Kinaseaktivität zu finden, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob die katalytische Untereinheit der Kinase, CDK4, in infizierten Zellextrakten exprimiert und an Zyklin D1 gebunden ist.

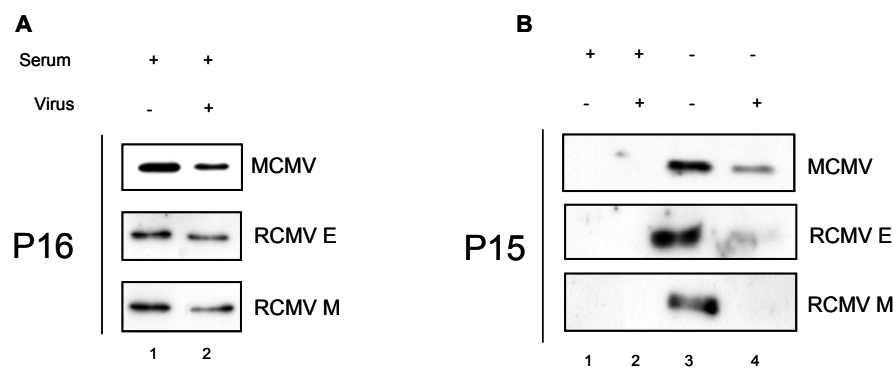
Überraschenderweise konnte, trotz der fehlenden Kinaseaktivität, kein Unterschied zwischen der CDK4-Expression in uninfizierten und infizierten Zellen gefunden werden (Abb. 21A). Um zu testen, ob Zyklin D1 mit CDK4 *in vivo* assoziiert ist, folgte eine Koimmunpräzipitation von CDK4 über Zyklin D1. In uninfizierten serumrestimulierten Zellen kann Zyklin D1-assoziiertes CDK4 nachgewiesen werden (Abb. 21B, Bahn 1). In den infizierten Zellen allerdings scheint Zyklin D1 keinen Komplex mit CDK4 zu bilden (Abb. 21B, Bahn 2 und 4).

Dies zeigt, dass in infizierten Zellen CDK4 prinzipiell exprimiert wird, aber nicht an Zyklin D1 bindet. Was eine Voraussetzung für die Funktion der Kinase wäre. Dies könnte eine mögliche Ursache für die nicht nachzuweisende Zyklin D1-assoziierte Kinaseaktivität sein.



**Abbildung 21:** Einfluss von M/RCMV auf CDK4. Es wurden in Abb. 20 beschriebene Zellextrakte verwendet Diese wurden unmittelbar (A) oder nach erfolgter Zyklin D1-Immunpräzipitation (B) auf CDK4 Expression in Immunoblotanalysen untersucht.

Die CKI der INK4- Familie hemmen die Aktivität des Zyklin D/CDK4 Kinase-Komplexes, indem sie die Bindung der Kinase an Zyklin D verhindern (siehe Abb. 12). Um zu überprüfen, ob die fehlende Bindung von CDK4 an Zyklin D1 durch eine in infizierten Zellen höhere Expression von CKI hervorgerufen wird, wurden die Expressionslevel der CKI der INK4-Familie (p15, p16, p18 und p19) untersucht. Da NIH-3T3 Zellen kein funktionelles p16<sup>Ink4a</sup> exprimieren konnte die Relevanz dieses Zellzyklusregulators ausgeschlossen werden, um dies praktisch zu belegen wurden stattdessen Zellextrakte von infizierten MEFs und infizierte RAT1 Zellen verwendet. Es konnten in infizierten, serumbehandelten Zellen in keinem Falle höhere p16 Level nachgewiesen werden als in den uninfizierten Kontrollextrakten (Abb. 22A). P15 (Abb. 22B), wird in nachweisbaren Mengen nur in quieszenten uninfizierten Zellen exprimiert (Abb. 22B, Bahn 3).

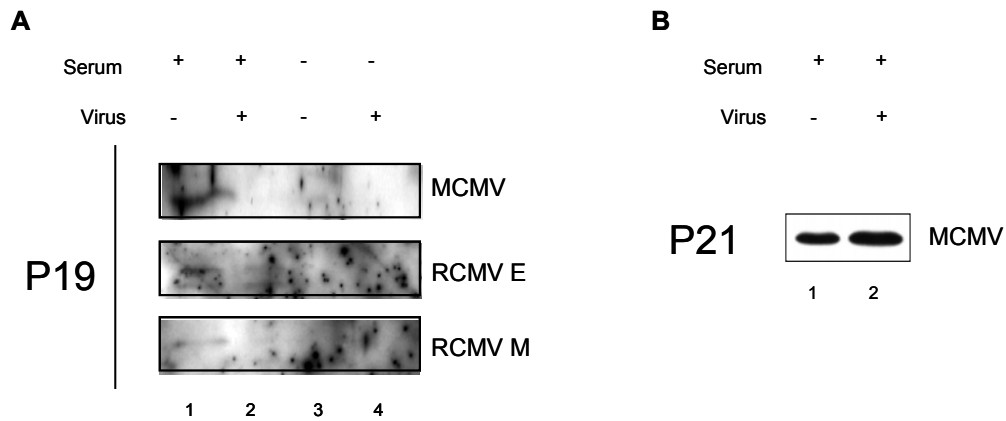


**Abbildung 22:** Zelluläre Zellzyklusregulatoren p16 und p15 sind nicht für verminderte Zyklin D1-assozierte Kinaseaktivität verantwortlich. Es wurden in Abb. 20 beschriebene Zellextrakte verwendet Diese wurden mit einem p16-spezifischen (A) und p15-spezifischen (B) Antikörper in Immunoblotanalysen untersucht.

P18 konnte weder in uninfizierten noch in infizierten Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Expression von p19 erwies sich ebenfalls als schwierig, eine spezifische Bande war nur in uninfizierten serumbehandelten Zellen darstellbar (Abb. 23, Bahn 1).

Nachdem die Inhibitoren der INK4- Familie in infizierten Zellen nicht stärker exprimiert waren, wurde p21 als möglicher Vertreter der CIP/KIP- Familie als letzter Kandidat in die Analyse einbezogen. Da p21 sowohl CDK1 als auch CDK2 inhibieren kann, war in Anbetracht der bestehenden CDK1 Aktivität in infizierten Zellen (siehe 3.5.3) nicht davon auszugehen, dass p21 verstärkt exprimiert wird. Darüberhinaus würde p21 nicht den Zyklin D1/CDK- Komplex zerstören. Obwohl CDK2 in infizierten Zellen aktiv ist (s.u.) und in immortalisierten Rat1 Zellen nicht funktionell, musste eine Überexpression von p21 wenigstens in Mauszellen ausgeschlossen werden. Der Nachweis ergab in uninfizierten und infizierten NIH-3T3 Zellen nahezu gleiche Proteinexpression (Abb. 23B), was wie erläutert zu erwarten war.

Nach diesen Ergebnissen ist also davon auszugehen, dass die bekannten zellulären Regulatoren nicht für die verminderte Zyklin D1-assozierte Kinaseaktivität in infizierten Zellen verantwortlich sind und das M/RCMV möglicherweise direkt mit CDK4 interagiert.

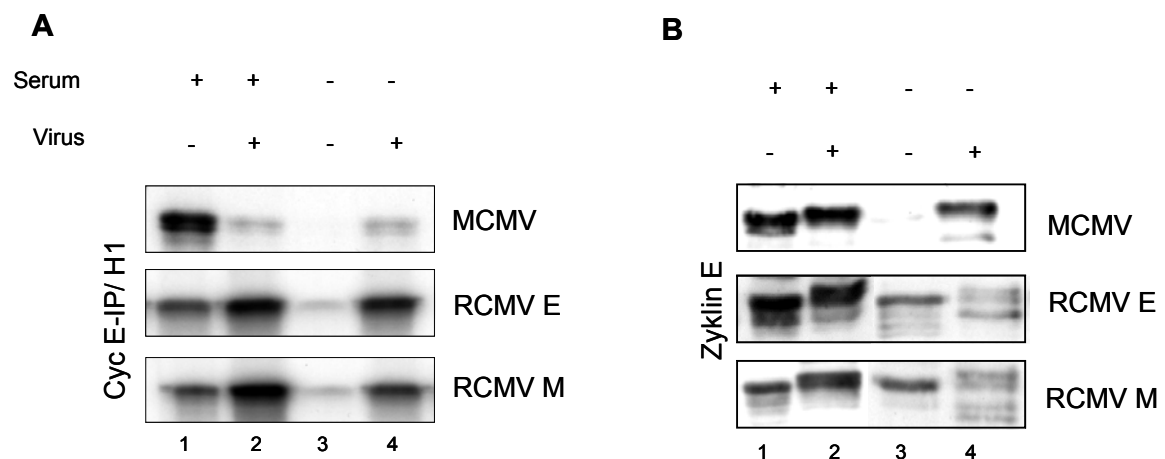


**Abbildung 23:** P19 und p21 Expression in infizierten Zellen. Es wurden in Abb. 20 beschriebene Zellextrakte verwendet. Diese wurden mit einem p19-spezifischen (A) und p21-spezifischen (B) Antikörper in Immunoblotanalysen untersucht.

### 3.5.2 Einfluss von MCMV und RCMV auf die Zyklin E Expression

Bei der Analyse der Zyklin E-assozierten Kinaseaktivität war auffällig, dass diese durch RCMV Infektion anstieg (Abb. 24, A, Bahn 2 und 4). Die genannte Kinaseaktivität lag deutlich über der zyklrierender und quieszenter Zellen (Abb. 24, A, Bahn 1 und 3).

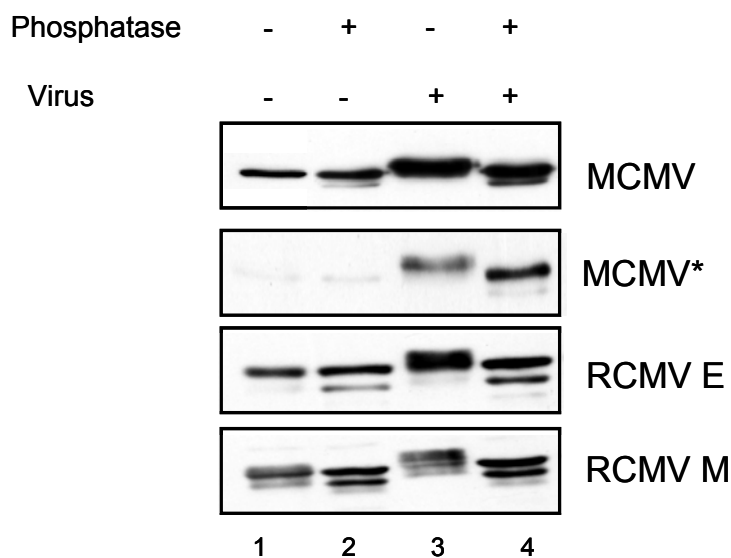
Um zu prüfen, ob die erhöhte Zyklin E-assozierte Kinaseaktivität durch erhöhte Proteinexpression der regulatorischen Untereinheit erklärt werden kann, wurden Immunoblotanalysen durchgeführt. Diese ergab, dass alle hier getesteten CMV zwar gleiche Mengen an Zyklin E, aber eine Zyklin E-Form mit einer herabgesetzten Mobilität in der Gelelektrophorese induzierten (Abb. 24 B, Bahn 2 und 4).



**Abbildung 24:** Einfluss von M/RCMV auf die Expression von Zyklin E und die Zyklin E-assozierte Kinaseaktivität. Quieszente Zellen wurden in An- bzw. Abwesenheit von Serum infiziert. Die Zellen wurden nach 16 Stunden geerntet und Proteinextrakte wurden erstellt. In diesen wurde mit Hilfe von *in vitro*- Kinaseassays die Zyklin-assozierten Kinaseaktivitäten mit H1 als Substrat bestimmt (A). Des Weiteren wurden die Extrakte auf Zyklinexpression in Immunoblotanalysen mit Zyklin-spezifischen Antikörpern (B) untersucht.

### III. Ergebnisse

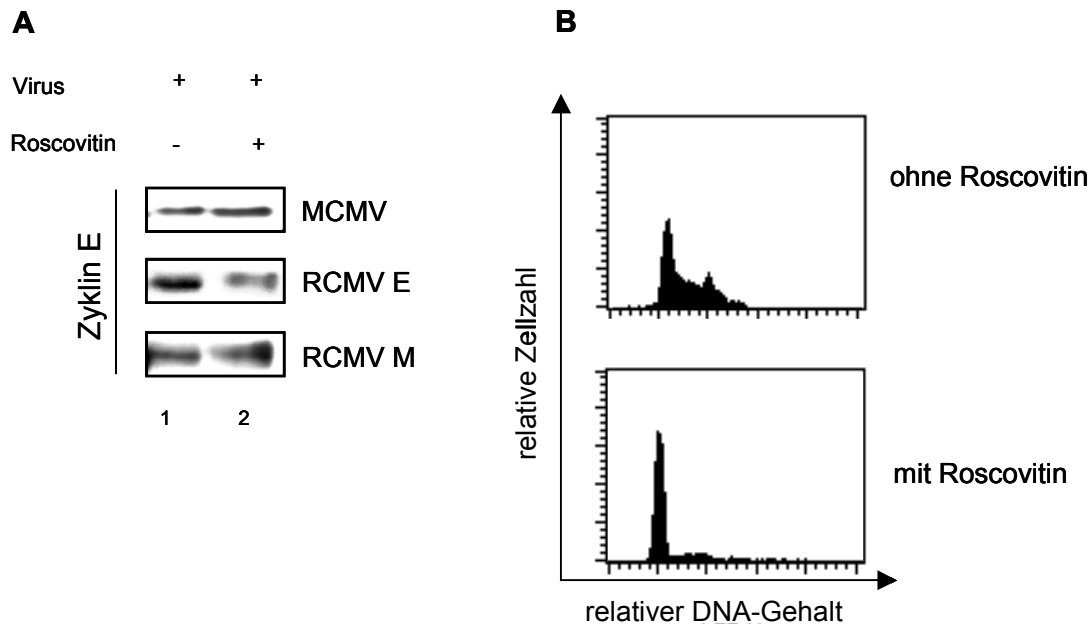
In der Annahme, das Zyklin E in infizierten Zellen posttranslational möglicherweise durch Phosphorylierung modifiziert wird, wurden, um dies zu untersuchen, die Extrakte uninfizierter und infizierter Zellen vor der Immunoblotanalyse mit Phosphatase behandelt. Die Phosphatase würde eine bestehende Phosphorylierung des Proteins aufheben und so zu einem schnelleren Laufverhalten von Zyklin E in der Gelelektrophorese führen. Dies war der Fall. In den infizierten Phosphatase-behandelten Extrakten (Abb. 25, Bahn 4) war im Gegensatz zu den infizierten unbehandelten (Abb. 25, Bahn 3) Extrakten ein schnelleres Laufverhalten von Zyklin E zu beobachten. In der Tat lagen die Zyklin E Banden der infizierten Zellen nach Phosphatase-Behandlung auf der gleichen Höhe wie die Zyklin E Banden uninfizierter Extrakte (Abb. 25, Bahn 1 und 2). Wodurch gezeigt werden konnte, dass Zyklin E in mit Nager-CMV infizierten Zellen phosphoryliert vorliegt.



**Abbildung 25:** Phosphorylierte Zyklin E Form in MCMV/RCMV infizierten Zellen. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben synchronisiert und nach 16 h geerntet. Zur Erstellung der Extrakte wurde ein Extraktionspuffer ohne Phosphataseinhibitoren verwendet. Vor der Immunoblotanalyse wurden die Extrakte mit Phosphatase behandelt oder unbehandelt belassen und dann mit einem Zyklin E-spezifischen Antikörper analysiert. (\*kürzere Exposition)

Über die Phosphorylierung von Zyklin E ist nur bekannt, dass diese am Aminosäurerest Thr380 durch CDK2 erfolgen kann und eine Voraussetzung des proteasomalen Abbaus von Zyklin E ist (Won und Reed, 1996). Da jedoch die „*steady state*“ Proteinmenge von Zyklin E in infizierten Zellen nicht vermindert ist, sollte geprüft werden, ob CDK2 überhaupt für die Phosphorylierung verantwortlich ist. Um dies zu testen, wurden infizierte Zellen mit dem synthetischen CDK2-Hemmstoff Roscovitin (15  $\mu$ M) (Bresnahan *et al.*, 1997; Meijer, 1996) behandelt. Durch die Behandlung mit Roscovitin wurde allerdings kein schnelleres Laufverhalten von Zyklin E in infizierten Zellen beobachtet (Abb. 26A, Bahn 2), so dass trotz der Hemmung von CDK2 eine Phosphorylierung von Zyklin E in den infizierten

Zellen erfolgte. Als Kontrolle für das effiziente Wirken von Roscovitin wurden die geernteten Zellen im Durchflußzytometer gemessen. Die in Abb. 26B dargestellten Histogramme zeigen, dass die Roscovitin behandelten Zellen in G1 arretieren, was auf die fehlende CDK2 Aktivität zurückgeführt werden kann.



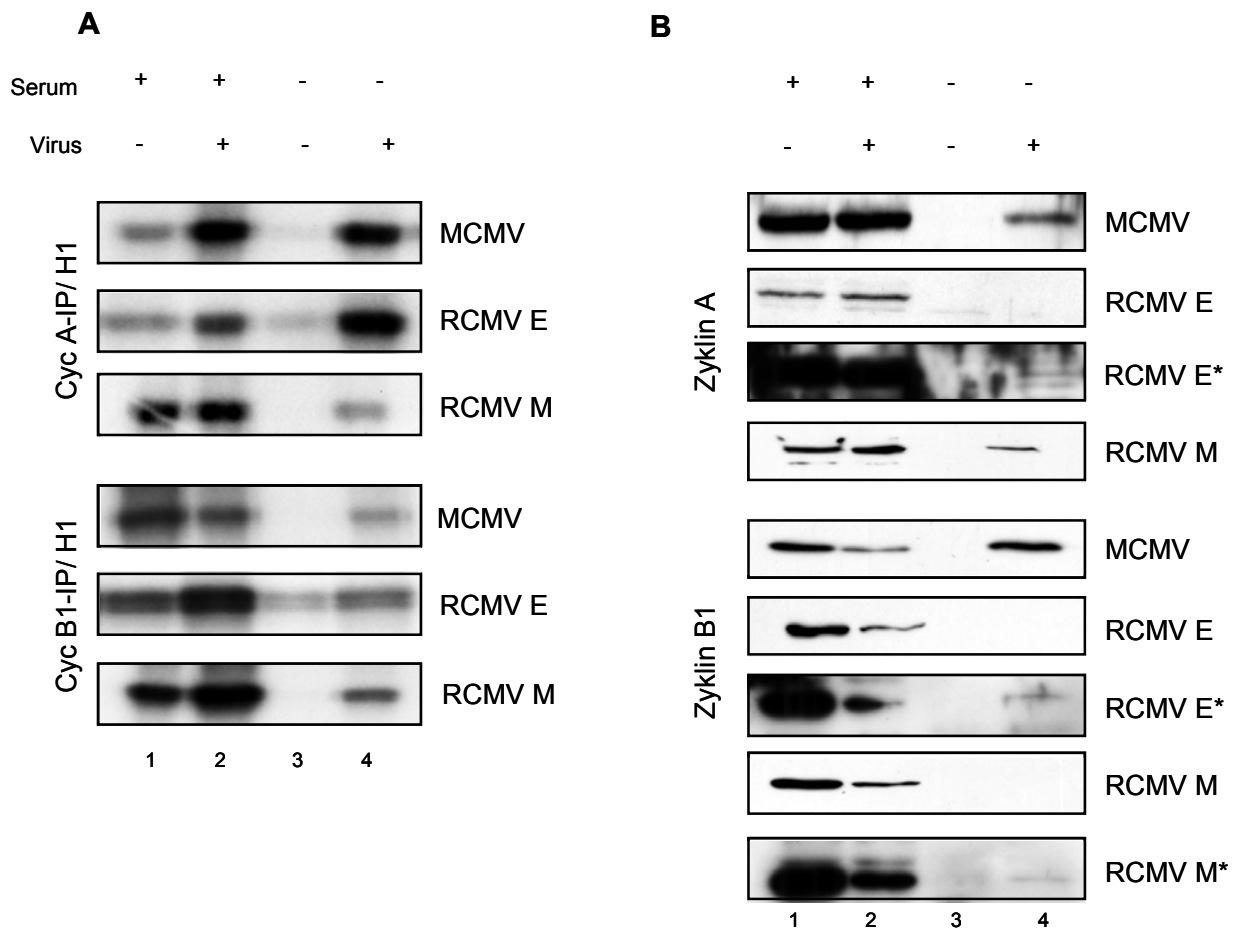
**Abbildung 26:** Zyklin E wird nicht durch CDK2 phosphoryliert. Infizierte Zellen wurden mit dem synthetischen CDK2-Hemmstoff Roscovitin (15  $\mu$ M) behandelt, anschließend wurden Zellextrakte erstellt und in Immunoblotanalysen mit einem Zyklin E-spezifischen Antikörper behandelt, als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet (A). Um das effiziente Wirken von Roscovitin nachzuweisen wurden die geernteten Zellen im Durchflußzytometer gemessen. Die dargestellten Histogramme zeigen, dass die Roscovitin behandelten Zellen in G1 arretieren (B).

Es scheint sich also bei der beobachteten Phosphorylierung von Zyklin E nicht um eine durch CDK2 verursachte Autophosphorylierung zu handeln. Da eine ähnliche Phosphorylierung von zellulärem Zyklin E nicht beschrieben wurde, wird sie am ehesten entweder direkt oder indirekt durch die Nager-CMV verursacht. Obwohl dieser Punkt nicht direkt adressiert wurde, könnte die Phosphorylierung darüber hinaus ein möglicher Mechanismus für die erhöhte Zyklin E Kinaseaktivität sein.

### 3.5.3 Einfluss von MCMV und RCMV auf Zyklin A, Zyklin B1 und CDK1

Es ist bekannt, dass durch die Infektion mit HCMV die Zyklin B1-assoziierte Kinaseaktivität hochreguliert, die Zyklin A-assoziierte Kinaseaktivität hingegen herunterreguliert wird. Die Analysen in M/RCMV infizierten Zellen hingegen ergaben, dass die Zyklin A- und B1- assoziierten Kinaseaktivitäten im M/RCMV induzierten Zellzyklusarrest auch unter serumlosen Bedingungen durch die Infektion induziert werden (Abb. 27A, Bahn 2 und 4).

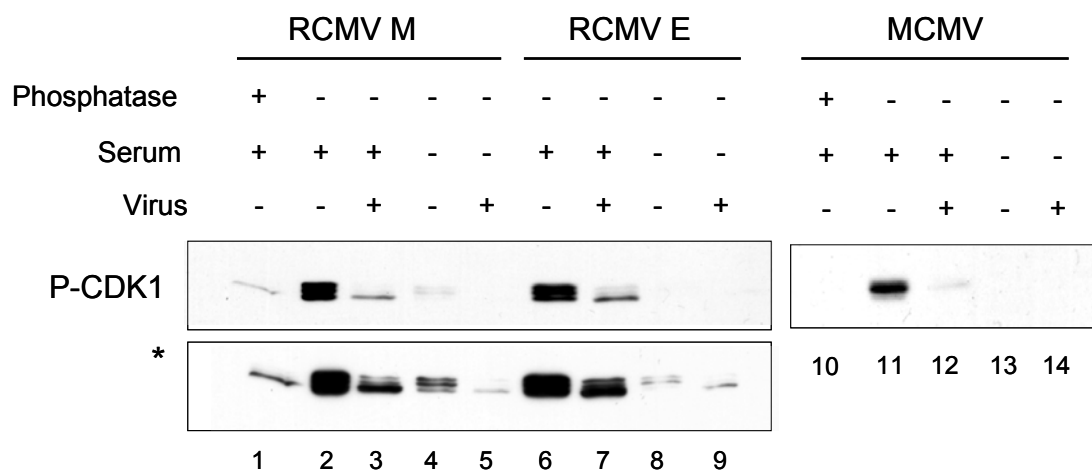
Die dazugehörigen Zyklin-Proteinlevel können diese gesteigerte Aktivität allerdings nicht erklären: In Abwesenheit von Serum erfolgt in infizierten Zellen zwar eine Induktion von Zyklin A und B1 (Abb. 27B, Bahn 3 und 4), in den serumbehandelten Zellen sind die Proteinlevel jedoch nahezu gleich, im Fall von Zyklin A (Abb. 27B, Zyklin A, Bahn 1 und 2), bzw. sogar etwas verringert (Zyklin B1) (Abb. 27B, Zyklin B1, Bahn 1 und 2).



**Abbildung 27:** Einfluss von M/RCMV auf die Expression von Zyklin A und B1 und die Zyklin A- und B1-assoziierte Kinaseaktivität. Quieszente Zellen wurden in An- bzw. Abwesenheit von Serum infiziert. Die Zellen wurden nach 16 Stunden geerntet und Proteinextrakte wurden erstellt. Es wurden mit Hilfe von *in vitro*- Kinaseassays die Zyklin-assoziierten Kinaseaktivitäten mit Histon H1 als Substrat bestimmt (A). Außerdem wurden die Extrakte auf Zyklिनexpression (B) in Immunoblotanalysen mit Zyklin-spezifischen Antikörpern untersucht. (\*nach längerer Expositionen wird auch die Bande in – Serum + Virus sichtbar)

Sowohl Zyklin A als auch Zyklin B1 können mit der katalytischen Untereinheit CDK1 (CDC2) assoziieren. Da die in Abb. 27B dargestellten Proteinlevel die gesteigerte Zyklin A- und B1-assoziierte Kinaseaktivität in infizierten Zellen nicht erklären können, soll untersucht werden, ob die Nager-CMV die Aktivität von CDK1 direkt beeinflussen können. Der Zyklin/CDK1-Komplex wird erst in der

G2-Phase durch die Phosphatase CDC25 aktiviert und bis dahin wird CDK1 durch die Phosphorylierung von Tyr15 durch die Wee1 Kinase inaktiv gehalten (Lew und Kombluth, 1996). In dem folgenden Experiment wurden infizierte Zellen auf das Vorhandensein der inhibitorischen Phosphorylierung von CDK1 untersucht, dazu wurde in den Immunoblotanalysen ein Tyr15-phosphospezifischer CDK1 Antikörper verwendet. Wie zu erwarten konnte die inhibitorische Phosphorylierung in serumrestimulierten uninfizierten Zellen, die noch nicht die G2-Phase erreicht hatten (durchflußzytometrische Analysen hier nicht gezeigt) nachgewiesen werden (Abb. 28, Bahn 2, 6 und 11). Die phosphorylierte Form von CDK1 konnte in den serumrestimulierten, infizierten Zellen jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 28, Bahn 3, 7 und 12). Auch in Abwesenheit von Serum konnte eine phosphorylierte Form von CDK1 in infizierten Zellen im Gegensatz zu uninfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 28, längere Exposition, Bahn 5 und 9). Da die Banden der infizierten Zellen gleiches Laufverhalten aufweisen, wie die Banden der phosphatasebehandelten Kontrolleextrakte (Abb. 28, Bahn 1), ist davon auszugehen, dass CDK1 in infizierten Zellen in aktiver unphosphorylierter Form vorhanden ist. Dies könnte den Anstieg der Zyklin A- und B1-assoziierten-Kinaseaktivität in infizierten Zellen erklären.



**Abbildung 28:** CDK1 liegt in M/RCMV infizierten Zellen in seiner aktiven, unphosphorylierten Form vor. Zellextrakte (erstellt wie in Abb. 27 beschrieben) wurden in Immunoblotanalysen mit einem phosphospezifischen CDK1-Antikörper analysiert. Als Kontrolle dienten Extrakte, die vor der Analyse mit Phosphatase behandelt worden waren. In der längeren Exposition (\*) sind die Banden, der Extrakte quieszenter Zellen deutlicher zu erkennen.

#### **3.6 RCMV, aber nicht MCMV verhindert *replication licensing***

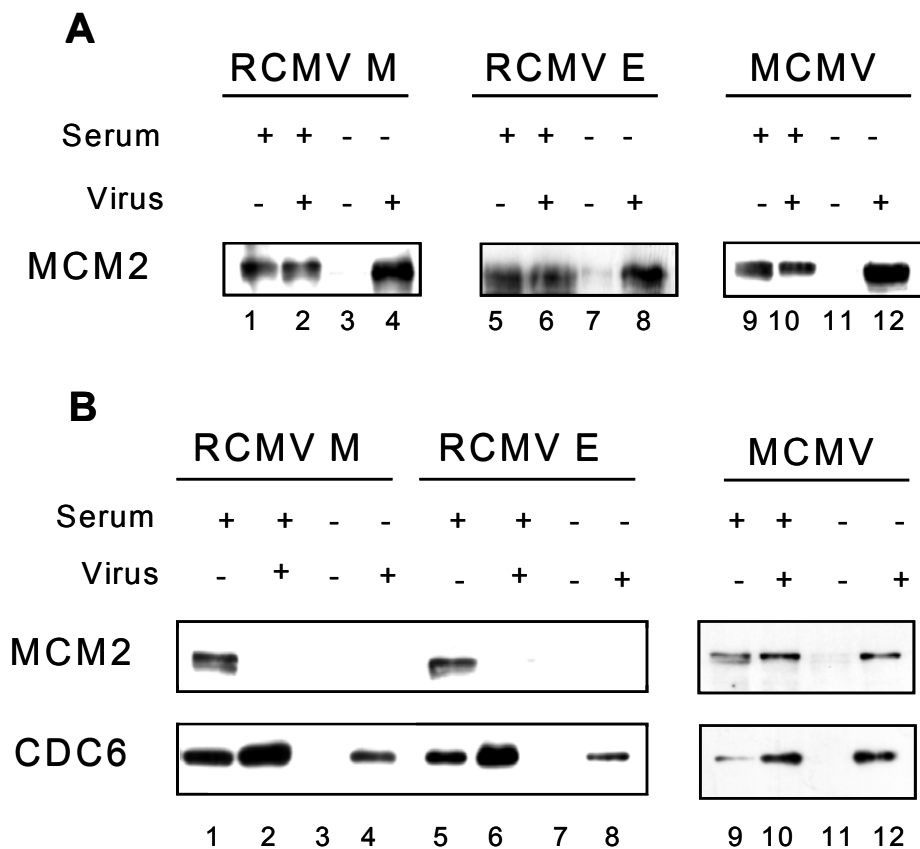
Die bisherigen Analysen ergaben, dass M/RCMV die Zellproliferation hemmen, in dem sie die Zellen in G1 und G2 arretieren. HCMV arretiert Zellen ebenso in G1 und verhindert den Beginn der zellulären DNA-Synthese, indem es die Assemblierung des *Prereplikationskomplexes* (Pre-RC) auf Chromatin verhindert (Biswas *et al.*, 2003; Wiebusch *et al.*, 2003).

Um zu überprüfen, ob dieser Mechanismus zwischen den CMV konserviert ist und eventuell eine Erklärung für den beobachteten G1-Arrest darstellen könnte, wurde die Integrität des Pre-RC in M/RCMV infizierten Zellen untersucht. Dazu wurden exemplarisch zwei Faktoren des Pre-RC analysiert: i) CDC6, ein chromatinassoziiertes Faktor, der als essentielles MCM-Ladeprotein fungiert (Donovan *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 1995; Piatti *et al.*, 1996; Piatti *et al.*, 1995) und ii) MCM2, als Bestandteil des MCM-Helikase-Komplexes, der für den Beginn der DNA-Synthese ebenfalls chromatinassoziiert benötigt wird und als limitierender Faktor des regulierenden *licensing* angesehen wird (Labib *et al.*, 2000).

Zuerst wurden Ganzzellextrakte von infizierten und uninfizierten Zellen erstellt, die 16 h nach Serumrestimulation geerntet wurden. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich infizierte Zellen arretiert in der G1, uninfizierten Zellen in der S-Phase. Folgend wurden die Zellextrakte auf MCM2 und CDC6 Expression untersucht. In serumbehandelten uninfizierten und infizierten Zellen konnten gleiche MCM2 Proteinlevel im Gesamtzellextrakt nachgewiesen werden (Abb. 29A, Bahn 1,2, 5, 6, 9 und 10). In quieszenten Zellen wurde MCM2 durch die Infektion induziert (Abb. 29A, Bahn 4, 8 und 12). Gleiche Ergebnisse erbrachte die Analyse mit einem CDC6 spezifischen Antikörper (Daten hier nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass zwei essentielle Faktoren, die für die Assemblierung des Pre-RC benötigt werden, in infizierten Zellen exprimiert werden. Doch da die Voraussetzung für die DNA-Replikation nur durch das Binden dieser Faktoren an Chromatin geschaffen wird, wurden in einem nächsten Schritt Chromatinextrakte von den gleichen Zellpopulationen erstellt, und die Chromatinassoziation von MCM2 und CDC6 in infizierten Zellen untersucht. Wie zu erwarten erfolgt in uninfizierten serumstimulierten Zellen, die sich am Beginn der S-Phase befinden, eine Bindung des Ladefaktors CDC6 und des MCM2-Proteins an Chromatin (Abb. 29B, Bahn 1, 5 und 9). In den Chromatinextrakten MCMV infizierter Zellen können MCM2 und CDC6 serumunabhängig nachgewiesen werden (Abb. 29B, Bahn 10 und 12), jedoch fällt auf, dass es sich in den infizierten, serumbehandelten Zellen (Abb. 29B, Bahn 10) um die unphosphorylierte MCM2-Form zu handeln scheint, die ungewöhnlicherweise ein langsames Laufverhalten aufweist (Fujita *et al.*, 1998; Masai *et al.*, 2000; Todorvo *et al.*, 1995). Bei der unphosphorylierten MCM2-Form handelt es sich um die inaktivierte Form. Was auf eine mögliche MCM2 Inaktivierung durch MCMV hinweist (Wiebusch *et al.*, 2003). Diese Daten implizieren somit, dass die Pre-RC Assemblierung durch MCMV nicht zerstört wird, sondern möglicherweise eine Inaktivierung von MCM2 nach Assemblierung erfolgt. Im Gegensatz zu MCMV infizierten Zellen, ist nach RCMV Infektion hingegen der Prozess des *replication*

*licensing* inhibiert. Wie zuvor bereits für HCMV beschrieben (Wiebusch *et al.*, 2003), zeigte sich auch für RCMV infizierte Zellen, dass der MCM Ladefaktor CDC6 Chromatin assoziiert ist, aber es kommt letztlich nicht zur Ladung von MCM2 (Abb. 29B, Bahn 2, 4, 6 und 8).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass in RCMV, nicht aber in MCMV, infizierten Zellen die Formierung des Pre-RC Komplexes verhindert wird und somit die zelluläre DNA Replikation auf der Ebene des *replication licensing* inhibiert wird.



**Abbildung 29:** RCMV nicht aber MCMV verhindert *replication licensing*. Quieszente Fibroblasten wurden serumrestimuliert und/oder infiziert. Sowohl Ganzzellextrakte als auch Chromatinextrakte wurden erstellt und es wurde die MCM2 Expression (A) sowie die MCM2 und CDC6 Chromatinbindung (B) überprüft.

## 4. Diskussion

Diese Arbeit beinhaltet die erste umfassende Untersuchung des Einflusses von Nager-Zytomegalieviren (MCMV und RCMV) auf den Zellzyklus der Wirtszelle. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MCMV und RCMV sowohl untereinander als auch gegenüber HCMV diverse Unterschiede bezüglich des Zellzyklusarrestes als auch der Beeinflussung bestimmter Zellzyklusregulatoren aufweisen. Insgesamt überwiegen jedoch die Ähnlichkeiten: Alle Zytomegalieviren sind in der Lage die Zellproliferation durch einen Zellzyklusblock am G1/S-Übergang zu inhibieren.

### 4.1 Inhibition der Zellproliferation und Position des Arrestes im Zellzyklus

Sowohl MCMV als auch RCMV inhibieren die Zellproliferation. Dies steht in Übereinstimmung mit dem antiproliferativen Effekt von HCMV auf humane Fibroblasten (Lu und Shenk, 1996). Desgleichen ist bekannt, dass auch andere Vertreter der Herpesviren wie das Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) (Roizman und Jr., 1964) und das dem HCMV biologisch nähere Humane Herpesvirus 6 (HHV-6) die Proliferation infizierter Wirtszellen hemmen (Horvat *et al.*, 1993).

Die Untersuchung der Nager-CMV ergab, dass dem durch MCMV und RCMV verursachten Proliferationsstop ein Zellzyklusarrest in G1 und G2 zugrunde liegt. Im Kontrast dazu kann HCMV nur einen G1-Arrest hervorrufen (Bresnahan *et al.*, 1996; Dittmer und Mocarski, 1997). Bemerkenswerterweise können MCMV und RCMV im Unterschied zu HCMV (Fortunato *et al.*, 2002; Salvant *et al.*, 1998) auch in beiden Zellzykluskompartimenten produktiv replizieren.

Neben MCMV und RCMV beeinflusst auch das Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) die G2/M-Progression. Dies ist von Interesse, um basierend auf den Untersuchungsergebnissen der vorliegenden Arbeit Aufschluss über das Vorhandensein konservierter Mechanismen der Zellzyklusregulation innerhalb der Familie der *Herpesviridae* zu erhalten.

HSV-1 induziert einen Arrest in der Prometaphase (Lomonte und Everett, 1999). Dieser Prometaphase-Arrest wird durch das virale IE Protein Vmw110 verursacht. Es bewirkt den Abbau des Kinetochorproteins CENP-C, welches bei der Separation der Schwesterchromatide benötigt wird (Oegema *et al.*, 2001). Für Nager-CMV jedoch ist weder ein Homolog zu Vmw110 bekannt, noch findet in M/RCMV-infizierten Zellen ein Eintritt in die Prophase statt (siehe Abschnitt 3.3). Somit ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen G2-Arrest um einen gegenüber HSV-1 konservierten Mechanismus handelt.

Grundsätzlich ist anzumerken, dass der Zellzyklusarrest, der durch Mitglieder der Familie der *Herpesviridae* verursacht wird für die virale Replikation relevant zu sein scheint (Mocarski, 2001; Roizman und Knipe, 2001). Herpesviren verfügen über einen eigenen Replikationsapparat und sind somit nicht auf zelluläre DNA-Replikation angewiesen. Diese wird, möglicherweise um die virale Replikation zu optimieren, umgangen. Es wird angenommen, dass Herpesviren die Wirtszelle in einer

bestimmten Position im Zellzyklus arretieren, in der die virale Replikation am effizientesten erfolgt (Flemington, 2001). Durch diese Arbeit wird deutlich, dass Nager-Zytomegalieviren durch einen G1- und G2-Arrest die S-Phase umgehen und zusätzlich entscheidende Zellzyklusregulatoren der Wirtszelle beeinflussen.

### **4.2 Mechanismus des neuartigen durch M/RCMV verursachten G2-Arrestes**

Bevor mechanistische Überlegungen angestellt werden, wie es auf der zellulären Seite zur G2-Arretierung durch Nager-CMV kommen kann, erfolgt eine kurze Erläuterung der relevanten Mechanismen, die an dem G2/M-Übergang beteiligt sind: Dem Beginn der Mitose geht eine komplexe Phosphorylierungskaskade voraus, die in der Aktivierung von Zyklin B/CDK1 (in Hefe CDC2) (s. Abb. 31) endet. Inhibitorische Kinasen der Familie WEE-1/MYT-1 halten CDK1 durch Phosphorylierung an Thr-14 und Tyr-15 so lange inaktiv, bis CDK1 in der späten G2-Phase durch CDC25 dephosphoryliert wird, was zur Aktivierung und zum Beginn der Mitose führt. Die CDC25 Familie umfasst CDC25A, CDC25B, CDC25C, die jeweils unterschiedliche Aufgaben erfüllen. CDC25A unterstützt durch die Interaktion mit Zyklin A/CDK2 und Zyklin E/CDK2 primär den Eintritt in die S-Phase. Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass CDC25A ebenso Zyklin B/CDK1 aktiviert und somit eine Rolle am G2/M-Übergang spielen kann (Mailand *et al.*, 2002). CDC25B reguliert einen Vorgang der Mitose, der als zentrosomale Mikrotubuli Nukleierung (*centrosomal microtubule nucleation*) bezeichnet wird. CDC25C führt u. a. zur Dephosphorylierung und somit zur Aktivierung von Zyklin B/CDK1 (Smits und Medema, 2001) und spielt eine wichtige Rolle im DNA-Damage-Checkpunkt (Kontrollpunkt). So wird beispielsweise durch DNA-Schädigung (etwa durch ionisierender Strahlung) die Aktivierung der Proteinkinasen CHK1 (Aktivierung präferentiell durch DNA-Einzelstrangbruch) und CHK2 (Aktivierung präferentiell durch DNA-Doppelstrangbruch) über ATM ausgelöst. Dies führt zu einem G2-Arrest und verhindert den weiteren Zellzyklusfortgang. Dabei ist die Aktivierung von CHK1 essentiell, um den Eintritt in die Mitose zu verhindern. CHK1 inhibiert durch Phosphorylierung CDC25C, und unterbindet somit die für den Mitoseeintritt erforderliche Dephosphorylierung der Thr-14 und Tyr-15 Aminosäurereste von CDK1 (Costanzo *et al.*, 2000). Die damit induzierte Inaktivierung von CDK1 stellt den Endpunkt des DNA-Damage-Checkpunktmechanismus dar. Da die Aktivierung des DNA-Damage-Checkpunktes zu einem G2-Arrest führt, liegt die Überlegung nahe, dass M/RCMV in die Regulation dieses Checkpunktes eingreift. Möglicherweise verursacht eine CMV-vermittelte Aktivierung von Checkpunktakteuren den G2-Arrest in infizierten Zellen. Da in Nager-CMV infizierten Zellen jedoch die für den Mitoseeintritt erforderliche Dephosphorylierung von CDK1 nicht unterbunden wird, CDK1 also trotz Arrest in aktiver Form vorliegt, müssten weitere Effektoren des Checkpunktes beeinflusst werden. ATM und die CHK-Kinasen interagieren u. a. mit p53, BRCA 1, CtIP, SMC1 und Mitglieder der CDC25 Familie (Nyberg *et al.*, 2002). Diese oder weitere Substrate könnten somit bei dem durch M/RCMV verursachten G2-Arrest eine Rolle spielen. Übereinstimmend weisen erste Versuche mit HCMV bereits daraufhin, dass der DNA-Damage-Checkpunkt durch das

Virus aktiviert wird und möglicherweise eine Funktion für den G1-Arrest hat (R. Krauß, persönliche Mitteilung).

Obwohl der Eintritt in die Mitose durch CMV verhindert wird, ist CDK1 gleichzeitig in aktiver Form nachzuweisen und zeigt eine erhöhte Kinaseaktivität. Offenbar entkoppelt das Virus den Prozess des Zellzyklusfortgangs (G2-Arrest) von der Aktivierung der CDK Aktivitäten (erhöhte CDK1 Aktivität). Die erhöhte CDK1 Aktivität in infizierten Zellen würde in diesem Falle eine nicht hinreichende Rolle für den Mitoseeintritt infizierter Zellen spielen. Dieser Aspekt wird in einem späteren Abschnitt (4.5) diskutiert.

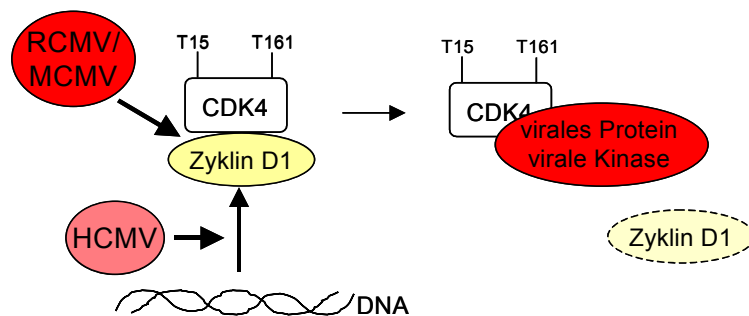
Auffällig ist, dass die Infektion der Wirtszelle mit Nager-CMV in der späten S- oder frühen G2-Phase nicht zu einem G2-Arrest führt, sondern die infizierten Zellen den Zellzyklus kompletieren und erst in der folgenden G1-Phase arretieren. Offensichtlich scheint es einen Restriktionspunkt in der späten S-Phase zu geben, nach dessen Überschreiten ein G2-Arrest in der selben Interphase nicht mehr möglich ist. Möglicherweise fehlt zu diesem Zeitpunkt ein für den G2-Arrest benötigtes virales Genprodukt oder erforderliche zelluläre Faktoren. Die Annahme eines Restriktionspunktes ist konsistent mit den Beobachtungen im HCMV-System. Für die Infektion mit HCMV wird ein solcher Punkt in der späten G1-Phase vermutet. Ursächlich wird angenommen, dass die Genexpression viraler IE Gene, welche Voraussetzung für die effektive virale Replikation ist, nur in der G1-Phase erfolgt (Fortunato *et al.*, 2002; Salvant *et al.*, 1998). Ist bei Infektion ein solcher Restriktionspunkt bereits überschritten, erfolgt die IE-Expression verspätet und so beginnt auch der virale Lebenszyklus und damit der Einfluss auf den Zellzyklus verspätet. Bei Nager-CMV infizierten Zellen scheint der Punkt jedoch später im Zellzyklusverlauf (späte S-Phase) platziert zu sein. Die IE-Expression vor und nach dem vermuteten Restriktionspunkt wurde im Nager-System noch nicht untersucht, wäre aber der nächste Schritt um eine Kausalität herzuleiten. Welche Bedeutung der G2-Arrest für die virale Replikation besitzt muss in weiteren Studien angegangen werden.

### **4.3 Virale Repression von Zyklin D1**

In HCMV und M/RCMV infizierten Zellen wird Zyklin D1-CDK 4/6 reprimiert. Jedoch haben die Viren unterschiedlicher Spezies abweichende Mechanismen entwickelt, um dies zu erreichen. So erfolgt in M/RCMV infizierten Zellen die Repression von Zyklin D1 nicht auf Ebene der mRNA-Expression, wie bei HCMV (Zhu *et al.*, 1998), stattdessen wird auf posttranslatonaler Ebene die Assoziation des Zyklin D1-CDK4-Komplexes zerstört. Folglich ist keine Zyklin D1-assoziierte Kinaseaktivität nachzuweisen. Die Untersuchungsergebnisse haben gezeigt, dass keine der bekannten zellulären Regulatoren für diese Dissoziation verantwortlich sind (siehe 3.5.1). Daher ist zu vermuten, dass ein unbekannter zellulärer oder viraler Faktor, in seiner Funktion ähnlich eines Vertreters der INK4-Familie, direkt mit CDK4 interagiert (Abb. 30).

Die Bedeutung der Zyklin D1-CDK4 Repression in infizierten Zellen ist bisher nicht bekannt. Da die Zyklin E-assoziierte Kinase direkt durch die Zytomegalieviren hochreguliert wird und Zyklin D

*upstream* von Zyklin E liegt, scheint es für CMV wenig sinnvoll zu sein Zyklin D1-CDK4 im Sinne der Regulation der Zellzyklusprogression herunterzuregulieren. Andererseits haben die Zytomegalieviren verschiedener Spezies unterschiedliche Mechanismen entwickelt um die Zyklin D-assozierte Kinaseaktivität zu reduzieren, was die Schlussfolgerung nahe legt, dass die Reduktion der Kinaseaktivität von Bedeutung ist. Wenn jedoch die Herunterregulation für die Regulation der Zellzyklusprogression von nur untergeordneter Rolle ist, gibt es möglicherweise Zellzyklus unabhängige Funktionen von Zyklin D1-CDK4, die CMV inhibiert. Es ist bereits bekannt, dass die Zyklin D-assozierte Kinaseaktivität einen regulierenden Einfluss auf Transkriptionsvorgängen hat und somit eine Zellzyklus unabhängige Funktionen in der Regulation der Genexpression übernimmt (Lazaro *et al.*, 2002). Obwohl hier keine viralen Gene angeboten werden können, die von einer Regulation der Genexpression durch Zyklin D1-CDK4 betroffen sein könnten, scheint die Beeinflussung der Funktion der Zyklin D-assozierten Kinaseaktivität außerhalb des Zellzyklus eine realistische Hypothese zu sein, die weitere Untersuchungen in diese Richtung rechtfertigt.



**Abbildung 30:** Unterschiedliche Mechanismen der Zyklin D1-CDK 4/6 Repression durch CMV. HCMV verhindert die mRNA-Expression von Zyklin D1. M/RCMV unterbinden die Assoziation des Zyklin D1-CDK4-Komplexes.

#### 4.4 Neuartige Zyklin E- Phosphorylierung in Nager-CMV infizierten Zellen

Sowohl die Infektion mit RCMV „England“ als auch mit RCMV „Maastricht“ führt zu einer Steigerung der Zyklin E-assozierten Kinaseaktivität (bei Infektion mit MCMV war Zyklin E hingegen nur in serumlosen Zellen erhöht). Diese erhöhte Kinaseaktivität geht sowohl in infizierten als auch uninfizierten Zellen mit gleichen Mengen an Zyklin E einher. Allerdings konnte in infizierten Zellen eine phosphorylierte Form von Zyklin E nachgewiesen werden. Nach Inhibition von CDK2 mit Roscovitin, bestand die Phosphorylierung weiterhin. Es ist also davon auszugehen, dass es sich hier nicht um eine Autophosphorylierung durch die CDK2 Untereinheit handelt. Überdies ist diese Autophosphorylierung von Zyklin E (Aminosäurerest: Thr380) bekanntermaßen mit dem Abbau des Zyklins assoziiert (Clurman *et al.*, 1996; Won und Reed, 1996). Da es keinen Hinweis gibt, dass das

Zyklin E Protein in infizierten Zellen eine verkürzte Halbwertszeit hat, scheint die beobachtete Form von Zyklin E nicht für den Abbau vorgesehen zu sein. Darüber hinaus ist bisher keine weitere Phosphorylierung von Zyklin E beschrieben worden und entsprechend auch keine zelluläre Kinase bekannt, die Zyklin E phosphorylieren könnte. Vor diesem Hintergrund liegt es nahe, dass die Phosphorylierung von Zyklin E durch eine virale Kinase verursacht werden könnte.

Schließt man die erwähnte, zum Abbau führende Phosphorylierung aus, scheint eine aktivierende Phosphorylierung von Zyklin E wahrscheinlich. Diese Hypothese wird insbesondere dadurch gestützt, dass die Aktivierung von Zyklin E ein Kardinalbefund in CMV infizierten Zellen darstellt und bei HCMV unterschiedliche Mechanismen beschrieben sind, die zur Aktivierung der Zyklin E-assoziierten Kinase beitragen. So erfolgt durch IE2 die Aktivierung der Zyklin E Transkription (Bresnahan *et al.*, 1998) und das IE1 Protein bindet das Pocketprotein p107 mit einer höheren Affinität als Zyklin E/CDK2, so dass es zur Freisetzung des Komplexes und Verfügbarkeit von zusätzlichem Zyklin E/CDK2 kommt (Zhang *et al.*, 2003). Konsistent mit der großen Anzahl weiterer unterschiedlicher Mechanismen der Aktivierung der Zyklin E-assoziierten Kinase (Bresnahan *et al.*, 1998; Bresnahan *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001; McElroy *et al.*, 2000; Sinclair *et al.*, 2000; Wiebusch *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), konnte gezeigt werden, dass für die Replikation von HCMV die CDK2 Aktivität essentiell ist (Bresnahan *et al.*, 1997). Wenn man davon ausgeht, dass gleiches für M/RCMV gilt, wäre mit der Phosphorylierung von Zyklin E ein weiterer Mechanismus gefunden, der dem Virus die Aktivierung der Zyklin E-assoziierten Kinase sichern würde. Obwohl noch nicht formell gezeigt, erscheint dies auch deshalb wahrscheinlich, weil im Gegensatz zu HCMV, die Höhe der Zyklin E Proteinlevel in R/MCMV infizierten Zellen nicht die gesteigerte Aktivität der Zyklin E-assoziierten Kinase erklären kann. Die Frage, welche Konsequenz die durch unterschiedliche Mechanismen erreichte Aktivierung von Zyklin E für die virale Replikation hat bleibt vorerst offen.

### **4.5 Zyklin A, Zyklin B und CDK1**

In M/RCMV infizierten Zellen wurden, auch unter serumlosen Bedingungen, erhöhte Zyklin A- und B1-assoziierte Kinaseaktivitäten nachgewiesen. Es wurden jedoch keine erhöhten Zyklin A/B1-Proteinlevel gefunden, die eine gesteigerte Zyklin A- und B1-assoziierte Kinaseaktivitäten hätten begründen können.

Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass CDK1, welches sowohl mit der regulatorischen Untereinheit Zyklin A als auch mit Zyklin B1 assoziiert, in infizierten Zellen in seiner aktiven unphosphorylierten Form vorliegt. Dies könnte den Anstieg der Zyklin A- und B1-assoziierten-Kinaseaktivität in infizierten Zellen erklären. Für HCMV infizierte Zellen zeigten Jault *et al.* (Jault *et al.*, 1995), dass CDK1 ebenso dephosphoryliert vorliegt. Ursächlich dafür ist eine verminderte Expression der inhibitorischen Kinasen MYT-1 und WEE-1 (Sanchez *et al.*, 2003).

Trotzdem ist es erstaunlich, dass die geringe Menge an regulatorischer Untereinheit (Zyklin A und B1) zu einer drastischen Aktivität von CDK1 führt. Es scheint also wahrscheinlich, dass es weitere bisher

unentdeckt gebliebene Mechanismen gibt, die zur Hochregulation der Zyklin A- und B1-assoziierten-Kinaseaktivität in infizierten Zellen führen. Vor dem Hintergrund der physiologischen Regulation der CDK1 Aktivität bieten sich folgende Angriffspunkte, um die Aktivität von CDK1 zu beeinflussen (Abb.31):

Um die inaktivierende Phosphorylierung aufzuheben, könnte das Virus direkt oder indirekt die CDK-aktivierende Kinase (CAK), die durch Phosphorylierung (am Aminosäurerest Thr-160) für eine basale Aktivität von CDK1 sorgt (Morris *et al.*, 2002), beeinflussen. Ebenso denkbar wäre, dass die inhibitorischen Kinasen WEE-1 und MYT-1 direkt oder indirekt gehemmt oder die Aktivatoren (CDC25 Familie) von CDK1 unterstützt werden. Möglicherweise interagiert das Virus auch direkt aktivierend mit CDK1. Außerdem könnte CMV zwar nicht die Verfügbarkeit von Zyklin B1 modifizieren, wohl aber seine zelluläre Lokalisation beeinflussen. Dadurch würde es im weitesten Sinne zu einer Aktivierung von CDK1 kommen.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass Mechanismen bekannt sind, die eine unzureichende Zyklinexpression ersetzen könnten: Einige Herpesviren kodieren eigene regulatorische Untereinheiten, funktionelle Zyklinhomologe, welche CDK Aktivität induzieren (Swanton *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde für HSV-1 ein virales Protein nachgewiesen, welches direkt mit CDK1 assoziiert und CDK1 aktiviert (Advani *et al.*, 2001; Roizman und Pellett, 2001). Für die Kinase CDK2 ist solch ein Faktor ebenso bekannt. Das virale Protein E7 des Humanen Papillomavirus (HPV, kleines DNA Virus) kann sehr kleine Mengen CDK2 durch direkte Bindung aktivieren (He *et al.*, 2003), folglich ist auch dieses Virus nicht auf zelluläres Zyklin angewiesen. Da in den hier verwendeten Zugängen jedoch die Aktivität der Kinase über die Präzipitation der zellulären regulatorischen Untereinheit (Zykline) geschah, kann diese Begründung für CMV infizierte Zellen nicht zutreffen.

Nachdem einige Mechanismen aufgezeigt wurden die das Vorliegen der aktiven unphosphorylierten Form von CDK1 und erhöhte Zyklin A- und B1-assoziierte Kinaseaktivitäten erklären könnten, werden nun mögliche Funktionen der erhöhten CDK1 Aktivität in infizierten Zellen erläutert: Advani *et al.* untersuchten die Bedeutung einer, durch Infektion hervorgerufenen, erhöhten CDK1 Aktivität und konnten für HSV1 zeigen, dass die viralen Faktoren ICP22 und U<sub>L</sub>13 CDK1 aktivieren, um eine optimale Expression der „späten“ Gene (gezeigt am Beispiel U<sub>S</sub> 11) zu ermöglichen. Es wird angenommen, dass CDK1 mit viralen Regulatorproteinen interagiert. So besitzen einige HSV1 Glykoproteine mögliche Phosphorylierungsstellen für CDK1 (Advani *et al.*, 2000). Des weiteren phosphoryliert das Varizella Zoster Virus das Membranprotein gI durch CDK1 (Ye *et al.*, 1999). Außerdem kann CDK1 die Funktion und intrazelluläre Lokalisation von Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Caelles *et al.*, 1995; Connolly *et al.*, 1997; El-Hodiri *et al.*, 1997).

Darüber hinaus ist bekannt, dass der aktivierte Zyklin B/CDK1-Komplex zu Veränderungen im Mikrotubulisystem, der Aktinfilamente und der Zelllamina führt und somit beim Mitoseeintritt die zelluläre Struktur beeinflusst. Zyklin B/CDK1 phosphoryliert u. a. Komponenten der Kernmembran und verursacht dadurch deren Zerfall (Smits und Medema, 2001). Derartige Veränderungen könnten

auch für die effiziente Virusreplikation und Virusfreisetzung von Bedeutung sein, denn im Kern entstandene virale Nukleokapside müssen die Kernmembran überwinden, um nach weiterem Zusammenbau (*Assembly*) als Virionen freigesetzt zu werden. Eine erhöhte Aktivität von Zyklin B/CDK1 könnte folglich für das Virus von Nutzen sein, weil das Freikommen der Nukleokapside aus dem Kern effizienter und schneller erfolgen würde und somit einen positiven Einfluss auf die Virusfreisetzung hätte. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse von Muranyi *et al.* gestützt. Die Autoren konnten zeigen, dass das virale Protein M50/p35 (MCMV Protein) die Integrität der Kernmembran beeinflusst, was die Kernmembran für virale Proteine durchlässiger macht (Muranyi *et al.*, 2002). Hier könnte eine erhöhte CDK1 Aktivität additiv oder synergistisch wirken.

Über die Notwendigkeit der erhöhten CDK1 Aktivität für die virale Replikation ist wenig bekannt. Anders als CDK2 konnte CDK1 bisher nicht selektiv in infizierten Zellen inhibiert werden. Es kann daher keine Aussage gemacht werden, welche Bedeutung CDK1 für die Virusreplikation besitzt. Auffällig ist jedoch, dass CDK1 - wie erläutert - auch von anderen Viren hochreguliert wird. CDK1 scheint ein attraktives Beispiel dafür zu sein, dass Viren essentielle zelluläre Faktoren für die Regulation der Virusreplikation umfunktionieren. Aber erst durch Unterdrückung der Aktivität von CDK1 in infizierten Zellen mittels synthetischer Inhibitoren oder durch die Expression dominant negativer Mutanten oder si-RNAs (*small interfering RNA*) könnte man weiterführend die Funktion der induzierten CDK1 Aktivität in infizierten Zellen untersuchen. Damit wäre die Voraussetzung geschaffen, die Bedeutung von CDK1 für die virale Genexpression oder Virusreplikation abzuleiten.

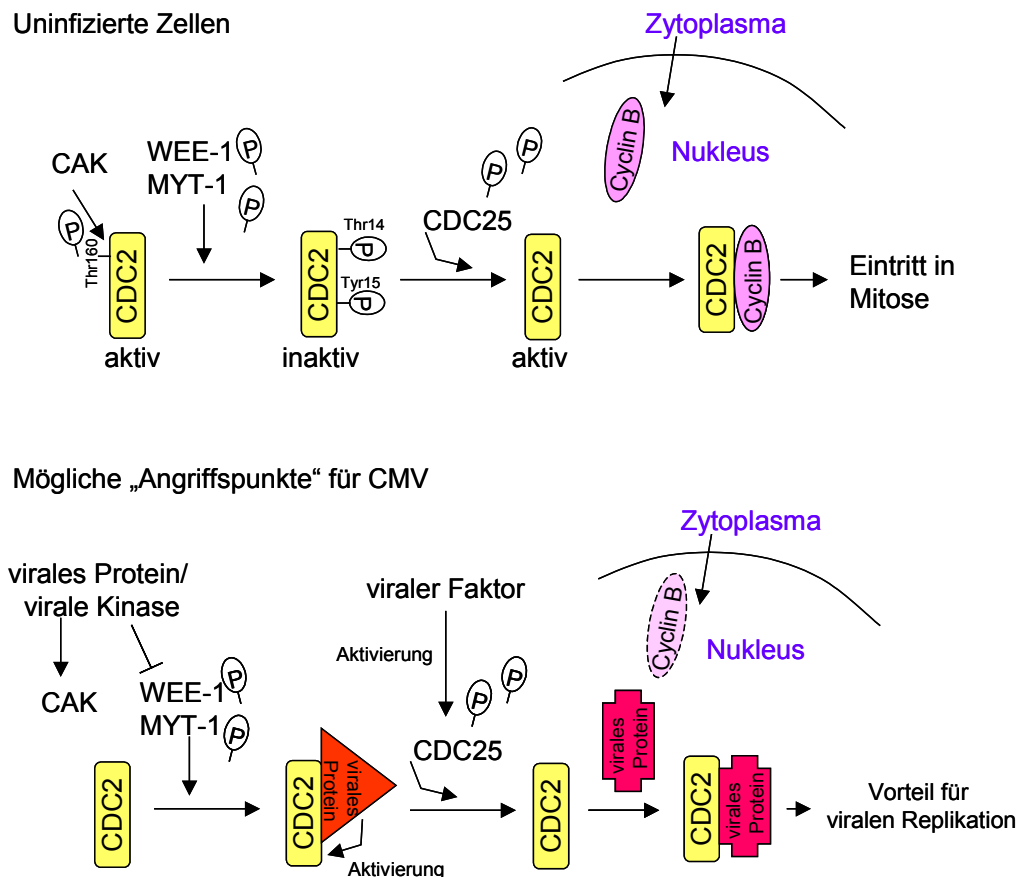


Abbildung 31: Modellvorstellung der Regulation von CDC2 durch CMV (modifiziert nach Advani *et al.*, 2001).

#### 4.6 G1-Arrest als gemeinsames Merkmal aller CMV

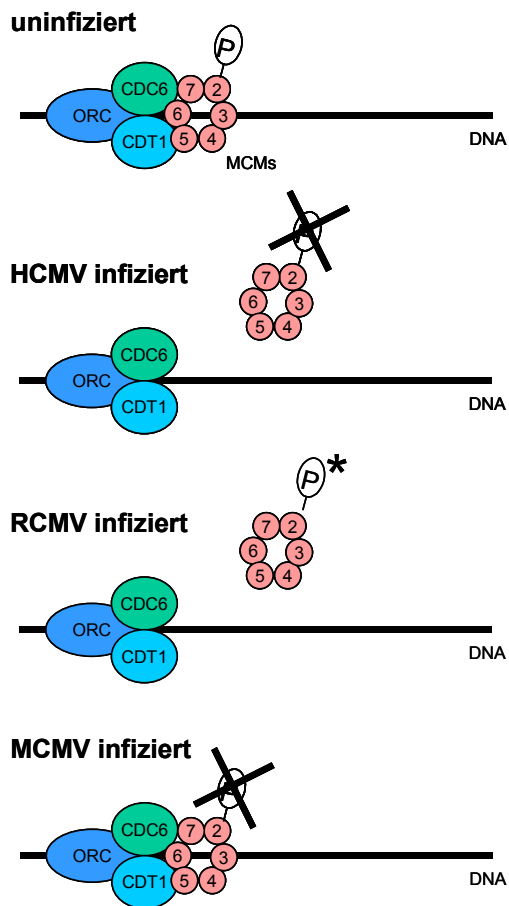
Sowohl die Infektion mit HCMV als auch die Infektion mit den in dieser Arbeit untersuchten Nager-CMV führt zu einem G1-Arrest. Folgend werden die für HCMV diskutierten Mechanismen den im Nager-CMV-System gefundenen gegenübergestellt.

Bisher wurde für HCMV diskutiert, dass eine HCMV verursachte Herunterregulation von Zyklin A für den G1-Arrest verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit dagegen ist eine Zyklin A Repression nicht als Grund anzusehen, da die Proteinlevel gleichbleibend (in serumlosen Zellen etwas höher) sind und die Zyklin A-assoziierte Kinase nicht reduziert ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der durch HCMV verursachte Zellzyklusblock am G1/S-Übergang durch die selektive Hemmung der zellulären DNA-Synthese hervorgerufen wird. Ursache dafür ist, dass die Ladung der MCM-Helikase auf Replikationsursprünge (*origin of replication*, ORC) verhindert wird, obwohl alle Pre-RC-Faktoren in infizierten Zellen vorhanden sind (Biswas *et al.*, 2003; Wiebusch *et al.*, 2003). Zusätzlich liegt MCM2 in HCMV infizierten Zellen in seiner unphosphorylierten, inaktivierten Form vor (Wiebusch *et al.*, 2003) und kann somit ebenso zu einem Arrest am G1/S-Übergang führen.

Durch die Untersuchung der Nager-CMV konnte gezeigt werden, dass RCMV ebenso wie HCMV das Laden der MCMs auf Replikationsursprünge verhindert. Überraschenderweise wird durch die Infektion mit MCMV die Ladung der MCMs auf Replikationsursprünge nicht verhindert. Auffällig ist jedoch das Ausbleiben der MCM2-Phosphorylierung in MCMV-infizierten Zellen. Da die Phosphorylierung von MCM2 eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierung des Pre-RC darstellt (Masai *et al.*, 2000), muss die Phosphorylierung von MCM2 in infizierten Zellen als hinreichender Grund für die Inhibition der zellulären DNA-Synthese in infizierten Zellen interpretiert werden (Abb. 29).

Zur Aktivierung von MCM2 und der darauf folgenden zellulären Replikation ist der S-Phase Regulator CDC7-DBF4 erforderlich, bei dem es sich um eine direkt am *Origin* lokalisierte Kinase handelt. Die Phosphorylierung von MCM2 trägt zur Aktivierung des Pre-RC bei. Erst dann kann es zur Entwindung der DNA sowie zur Ladung weiterer Replikationsfaktoren wie CDC45 und der DNA-Polymerase kommen (Masai und Arai, 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind konsistent mit der Hypothese, dass CMV in den Prozess der MCM-Aktivierung eingreift. CDC7 und DBF4 sind Zielsubstrate bei Checkpunktaktivierung und werden, u. a. abhängig von der Proteinkinase Rad53 reguliert, die nach einem DNA-Schaden zu einem Zellzyklusarrest führt (Weinreich und Stillman, 1999). Möglicherweise spielt auch hier eine Checkpunktaktivierung durch das Virus eine Rolle. Um den Mechanismus der MCM-Aktivierung in CMV infizierten Zellen zu untersuchen müsste zunächst die Expression, Chromatinassoziation und Aktivität des CDC7-DBF4 Komplexes und von CDC45 untersucht werden. Denkbar wäre z. B., dass eine virale oder zelluläre viral induzierte Phosphatase in den Prozess der Pre-RC Assemblierung eingreift.

Da in MCMV infizierten Zellen keine Inhibition des *replication licensing* vorliegt, aber MCM2 nicht phosphoryliert und damit nicht aktiviert wird, bietet sich das Maus-System für weitere Untersuchungen des dazu führenden Mechanismus an. In RCMV infizierten Zellen konnte die Phosphorylierung der MCM-Proteine aus dem Laufverhalten nicht abgelesen werden. In Abbildung 32 ist eine Modellvorstellung der Inhibition der DNA-Synthese durch CMV zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 32:** Modellvorstellung der Inhibition der DNA-Synthese durch CMV. Dargestellt ist die Inhibition der Pre-RC Assemblierung durch RCMV, die fehlende Aktivierung durch MCMV und die Tatsache, dass beide Schritte in HCMV negativ reguliert sind. (\* Die Phosphorylierung der MCM-Proteine durch RCMV konnte aus ihren Laufverhalten nicht abgelesen werden.)

#### 4.7 Tiermodell für HCMV- Zellzyklusregulation, ein Ausblick

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, den Einfluss der Nager-CMV auf den Zellzyklus zu untersuchen, um u. a. Grundlagen für ein anwendbares Tiermodell zu schaffen, welches die Untersuchung der Zellzyklusregulation durch CMV im lebenden Organismus ermöglicht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass einige Mechanismen der Zellzyklusregulation zwischen dem menschlichen CMV und den Nager-CMV konserviert sind, andere, wie der G2-Arrest, nicht. Die scheinbare Konservierung einiger grundlegender Mechanismen unterstreicht die Relevanz der Zellzyklusbeeinflussung für die Replikation von Zytomegalieviren. Teilaspekte könnten somit der Untersuchung der physiologischen Signifikanz der Zellzyklusbeeinflussung im Tiermodell dienen.

Obwohl Beisser *et al.* davon ausgehen, dass es sich bei den beiden RCMV Stämmen „England“ und „Maastricht“ möglicherweise um zwei unterschiedliche Betaherpesviren handelt (Beisser *et al.*, 1998)

(siehe 1.5.1), konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede zwischen den beiden Stämmen, im Hinblick auf die Zellzyklusregulation, festgestellt werden. Die beiden RCMV Stämme weisen bezüglich der Zellzyklusaktivität gegenüber dem HCMV keine stärkere Ähnlichkeit auf als MCMV (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Gegenüberstellung von MCMV, RCMV und HCMV

	MCMV	RCMV „England“	RCMV „Maastricht“	HCMV
Cyc D1	→ ↓	→ ↓	→ ↓	↓ ↓
Cyc E	→ <sup>a</sup> ↑	→ <sup>a</sup> ↑	→ <sup>a</sup> ↑	↑ ↑
Cyc A	↗ ↑	↗ ↑	↗ ↑	↓ ↓
Cyc B1	↗ ↑	↗ ↑	↗ ↑	↑ ↑
Arrest	G1, G2	G1, G2	G1, G2	G1
Inhibition des „replication licensing“	∅ <sup>MCM2a</sup>	✓	✓	✓ <sup>MCM2a</sup>

Zyclin Expression (↑), Zyclin-assoziierte-Kinaseaktivität (⬆)

→= keine Einfluss ↑= gesteigert ↓= reduziert ↗= erhöhte Expression in serumlosen Zellen, <sup>a</sup>phosphoryliert

Ein informatives Tiermodell erfordert im Folgenden erläuterte Voraussetzungen: Zuerst müsste die Identifizierung viraler Faktoren erfolgen, die bei der Zellzyklusregulation durch M/RCMV eine Rolle spielen. Den gefundenen Zellzyklusaktivitäten müssten virale Faktoren durch selektive Expression im Zellkultursystem zugeordnet werden. Naheliegender wäre die Untersuchung der IE Proteine IE1- IE3, sowie UL69 und UL82 zu untersuchen, für die bereits Zellzyklus regulatorische Aktivitäten nachgewiesen wurden (siehe 1.4.2.). Von besonderem Interesse wäre verantwortliche Faktoren für die Zyclin E Phosphorylierung sowie die Unterbindung der Assoziation von Zyclin D1-CDK4/6 auszumachen. In einem nächsten Schritt würde eine Mutationsanalyse der viralen Faktoren in einem Zellkultursystem folgen. Nach Vorliegen der Resultate könnten virale Mutanten erstellt werden, um schließlich mit der Analyse *in vivo*, also im lebenden Organismus zu beginnen. Damit wäre die Grundlage geschaffen, die Zellzyklusfunktion im Tiermodell zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit hat Voraussetzungen und Möglichkeiten geschaffen sowie Grenzen sinnvoller Ansätze im Tiermodell aufgezeigt. MCMV und RCMV kommen demnach durchaus als System für die Untersuchung der Zellzyklusregulation im Tiermodell in Frage. Allerdings sollten präferentiell die zwischen H- und Nager-CMV konservierten Mechanismen im Tiermodell angegangen werden, um für die medizinisch relevante HCMV Infektion aussagekräftige Ergebnisse abzuleiten.

## 5. Literatur

- Advani, S. J.; Weichselbaum, R. R. und Roizman, B. (2000): The role of cdc2 in the expression of herpes simplex virus genes [In Process Citation], *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [20], Seite 10996-1001.
- Advani, S. J.; Weichselbaum, R. R. und Roizman, B. (2001): cdc2 cyclin-dependent kinase binds and phosphorylates herpes simplex virus 1 UL 42 DNA synthesis processivity factor, *J Virol* 75 [21], Seite 10326-10333.
- Alcami, A. und Koszinowski, U. H. (2000): Viral mechanisms of immune evasion, *Trends Microbiol* 8 [9], Seite 410-8.
- Baldin, V.; Lukas, J.; Marcote, M. J.; Pagano, M. und Draetta, G. (1993): Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1, *Genes Dev* 7 [5], Seite 812-21.
- Bartek, J.; Bartkova, J. und Lukas, J. (1996): The retinoblastoma protein pathway and the restriction point, *Curr Opin Cell Biol* 8 [6], Seite 805-14.
- Baskar, J. F.; Stanat, S. C.; Sulik, K. K. und Huang, E. S. (1983): Murine cytomegalovirus-induced congenital defects and fetal maldevelopment, *J Infect Dis* 148 [5], Seite 836-43.
- Beisser, P. S.; Kaptein, S. J.; Beuken, E.; Bruggeman, C. A. und Vink, C. (1998): The Maastricht strain and England strain of rat cytomegalovirus represent different betaherpesvirus species rather than strains, *Virology* 246 [2], Seite 341-51.
- Bell, S. P. und Dutta, A. (2002): DNA replication in eukaryotic cells, *Annu Rev Biochem* 71, Seite 333-74.
- Benson, J. D. und Huang, E. S. (1990): Human cytomegalovirus induces expression of cellular topoisomerase II., *J. Virol.* 64 [1], Seite 9-15.
- Biswas, N.; Sanchez, V. und Spector, D. H. (2003): Human cytomegalovirus infection leads to accumulation of geminin and inhibition of the licensing of cellular DNA replication, *J Virol* 77 [4], Seite 2369-76.
- Boldogh, I.; AbuBakar, S. und Albrecht, T. (1990): Activation of proto-oncogenes: an immediate early event in human cytomegalovirus infection, *Science* 247, Seite 561-564.
- Bresnahan, W. A.; Albrecht, T. und Thompson, E. A. (1998): The cyclin E promoter is activated by human cytomegalovirus 86-kDa immediate early protein, *J. Biol. Chem.* 273 [34], Seite 22075-22082.
- Bresnahan, W. A.; Boldogh, I.; Chi, P.; Thompson, E. A. und Albrecht, T. (1997): Inhibition of cellular Cdk2 activity blocks human cytomegalovirus replication, *Virology* 231 [2], Seite 239-47.
- Bresnahan, W. A.; Boldogh, I.; Thompson, E. A. und Albrecht, T. (1996): Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1, *Virology* 224, Seite 150-160.

- Bresnahan, W. A.; Thompson, E. A. und Albrecht, T. (1997): Human cytomegalovirus infection results in altered Cdk2 subcellular localization, *J Gen Virol* 78 [Pt 8], Seite 1993-7.
- Brideau, R. J.; Knechtel, M. L.; Huang, A.; Vaillancourt, A.; Vera, E. E.; Oien, N. L. und Wathen, M. W. (2002): Broad-spectrum antiviral activity of PNU-183792, a 4-oxo-dihydroquinoline, against human and animal herpesvirus, *Antiviral Research* 54, Seite 19-28.
- Bruggeman, C. A.; Debie, W. M.; Grauls, G.; Majoor, G. und van Boven, C. P. (1983): Infection of laboratory rats with a new cytomegalo-like virus, *Arch Virol* 76 [3], Seite 189-99.
- Bruggeman, C. A.; Meijer, H.; Dormans, P. H.; Debie, W. M.; Grauls, G. E. und van Boven, C. P. (1982): Isolation of a cytomegalovirus-like agent from wild rats, *Arch Virol* 73 [3-4], Seite 231-41.
- Burns, W. H.; Barbour, G. M. und Sandford, G. R. (1988): Molecular cloning and mapping of rat cytomegalovirus DNA, *Virology* 166 [1], Seite 140-8.
- Caelles, C.; Hennemann, H. und Karin, M. (1995): M-phase-specific phosphorylation of the POU transcription factor GHF-1 by a cell cycle-regulated protein kinase inhibits DNA binding, *Mol Cell Biol* 15 [12], Seite 6694-701.
- Carnero, A. und Hannon, G. J. (1998): The INK4 family of CDK inhibitors, *Curr Top Microbiol Immunol* 227, Seite 43-55.
- Cavanaugh, V. J.; Stenberg, R. M.; Staley, T. L.; Virgin, H. W. th; MacDonald, M. R.; Paetzold, S.; Farrell, H. E.; Rawlinson, W. D. und Campbell, A. E. (1996): Murine cytomegalovirus with a deletion of genes spanning HindIII-J and -I displays altered cell and tissue tropism, *J Virol* 70 [3], Seite 1365-74.
- Chen, Z.; Knutson, E.; Kurosky, A. und Albrecht, T. (2001): Degradation of p21cip1 in cells productively infected with human cytomegalovirus, *J. Virol.* 75 [8], Seite 3613-3625.
- Clurman, B. E.; Sheaff, R. J.; Thress, K.; Groudine, M. und Roberts, J. M. (1996): Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation, *Genes Dev* 10 [16], Seite 1979-90.
- Cobbs, C. S.; Harkins, L.; Samanta, M.; Gillespie, G. Y.; Bharara, S.; King, P. H.; Nabors, L. B.; Cobbs, C. G. und Britt, W. J. (2002): Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma, *Cancer Res* 62 [12], Seite 3347-50.
- Colberg-Poley, A. M. und Santomenna, L. D. (1988): Selective induction of chromosomal gene expression by human cytomegalovirus, *Virology* 166 [1], Seite 217-28.
- Connolly, T.; Caligiuri, M. und Beach, D. (1997): The Cdc2 protein kinase controls Cdc10/Sct1 complex formation, *Mol Biol Cell* 8 [6], Seite 1105-15.
- Cook, J. G.; Park, C. H.; Burke, T. W.; Leone, G.; DeGregori, J.; Engel, A.; Nevins, J. R.; Lee, D. G. und Bell, S. P. (2002): Analysis of Cdc6 function in the assembly of mammalian prereplication complexes ATPase switches controlling DNA replication initiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 [3], Seite 1347-1352.

- Costanzo, V.; Robertson, K.; Ying, C. Y.; Kim, E.; Avvedimento, E.; Gottesman, M.; Grieco, D. und Gautier, J. (2000): Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage, *Mol Cell* 6, Seite 649-659.
- Coverley, D.; Laman, H. und Laskey, R. A. (2002): Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation, *Nat Cell Biol* 4 [7], Seite 523-8.
- Davis-Poynter, N. J.; Degli-Esposti, M. und Farrell, H. E. (1999): Murine cytomegalovirus homologues of cellular immunomodulatory genes, *Intervirology* 42 [5-6], Seite 331-41.
- de Bruyn Kops, A. und Knipe, D. M. (1988): Formation of DNA replication structures in herpes virus-infected cells requires a viral DNA binding protein, *Cell* 55 [5], Seite 857-68.
- DeMarchi, J. M. und Kaplan, A. S. (1976): Replication of human cytomegalovirus DNA: lack of dependence on cell DNA synthesis, *J Virol* 18 [3], Seite 1063-70.
- Dittmer, D. und Mocarski, E. S. (1997): Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition, *J. Virol.* 71 [2], Seite 1629-1634.
- Doniger, J.; Muralidhar, S. und Rosenthal, L. J. (1999): Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate, *Clin Microbiol Rev* 12 [3], Seite 367-82.
- Donovan, S.; Harwood, L.; Drury, L. S. und Diffley, J. F. (1997): Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast.
- Dulic, V.; Lees, E. und Reed, S. I. (1992): Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase, *Science* 257 [5078], Seite 1958-61.
- Ehmann, G. L.; McLean, T. I. und Bachenheimer, S. L. (2000): Herpes simplex virus type 1 infection imposes a G(1)/S block in asynchronously growing cells and prevents G(1) entry in quiescent cells, *Virology* 267 [2], Seite 335-49.
- El-Hodiri, H. M.; Che, S.; Nelman-Gonzalez, M.; Kuang, J. und Etkin, L. D. (1997): Mitogen-activated protein kinase and cyclin B/Cdc2 phosphorylate Xenopus nuclear factor 7 (xnf7) in extracts from mature oocytes. Implications for regulation of xnf7 subcellular localization, *J Biol Chem* 272 [33], Seite 20463-70.
- Flemington, E. K. (2001): Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments, *J. Virol.* 75 [10], Seite 4475-4481.
- Fortunato, E. A.; Sanchez, V.; Yen, J. Y. und Spector, D. H. (2002): Infection of cells with human cytomegalovirus during S phase results in a blockade to immediate-early gene expression that can be overcome by inhibition of the proteasome, *J Virol* 76 [11], Seite 5369-79.
- Fortunato, E. A.; Sommer, M. H.; Yoder, K. und Spector, D. H. (1997): Identification of domains within the human cytomegalovirus major immediate-early 86-kilodalton protein and the retinoblastoma protein required for physical and functional interaction with each other, *J. Virol.* 71 [11], Seite 8176-8185.

- Fujita, M.; Yamada, C.; Tsurumi, T.; Hanaoka, F.; Matsuzawa, K. und Inagaki, M. (1998): Cell cycle- and chromatin binding state-dependent phosphorylation of human MCM heterohexameric complexes. A role for cdc2 kinase, *J Biol Chem* 273 [27], Seite 17095-101.
- Geng, Y.; Eaton, E. N.; Picon, M.; Roberts, J. M.; Lundberg, A. S.; Gifford, A.; Sardet, C. und Weinberg, R. A. (1996): Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein, *Oncogene* 12 [6], Seite 1173-80.
- Gerna, G.; Zipeto, D.; Percivalle, E.; Parea, M.; Revello, M. G.; Maccario, R.; Peri, G. und Milanesi, G. (1992): Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients, *J Infect Dis* 166 [6], Seite 1236-44.
- Gonzalez Armas, J. C.; Morello, C. S.; Cranmer, L. D. und Spector, D. H. (1996): DNA immunization confers protection against murine cytomegalovirus infection, *J Virol* 70 [11], Seite 7921-8.
- Griffith, B. P.; Chen, M. und Isom, H. C. (1990): Role of primary and secondary maternal viremia in transplacental guinea pig cytomegalovirus transfer, *J Virol* 64 [5], Seite 1991-7.
- Hagemeier, C.; Caswell, R.; Hayhurst, G.; Sinclair, J. und Kouzarides, T. (1994): Functional interaction between the HCMV IE2 transactivator and the retinoblastoma protein, *EMBO J.* 13 [12], Seite 2897-2903.
- Harbour, J. W. und Dean, D. C. (2000): Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis, *Nat Cell Biol* 2 [4], Seite E65-7.
- Harkins, L.; Volk, A. L.; Samanta, M.; Mikolaenko, I.; Britt, W. J.; Bland, K. I. und Cobbs, C. S. (2002): Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer, *Lancet* 360 [9345], Seite 1557-63.
- Hartwell, L. H. und Weinert, T. A. (1989): Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events, *Science* 246 [4930], Seite 629-34.
- Hayashi, M. Lu; Blankenship, C. und Shenk, T. (2000): Human cytomegalovirus UL69 protein is required for efficient accumulation of infected cells in the G1 phase of the cell cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 [6], Seite 2692-2696.
- He, W.; Staples, D.; Smith, C. und Fisher, C. (2003): Direct activation of cyclin-dependent kinase 2 by human papillomavirus E7, *J Virol* 77 [19], Seite 10566-10574.
- Henzel, M. J.; Wei, Yi; Mancini, M. A.; Van Hooser, A.; Ranalli, T.; Brinkley, B. R.; Bazett-Jones, D. P. und Allis, C. D. (1997): Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation, *Chromosoma* 106, Seite 348-360.
- Hengst, L. und Reed, S. I. (1998): Inhibitors of the Cip/Kip family, *Curr Top Microbiol Immunol* 227, Seite 25-41.
- Horvat, R. T.; Parmely, M. J. und Chandran, B. (1993): Human Herpesvirus 6 inhibits the proliferative responses of human peripheral blood mononuclear cells, *J Infect Dis* 167, Seite 1274-1280.

- Isom, H. C. (1979): Stimulation of ornithine decarboxylase by human cytomegalovirus, *J Gen Virol* 42 [2], Seite 265-78.
- Jackman, M. R. und Pines, J. N. (1997): Cyclins and the G2/M transition, *Cancer Surv* 29, Seite 47-73.
- Jault, F. M.; Jault, J.-M.; Ruchti, F.; Fortunato, E. A.; Clark, C.; Corbeil, J.; Richman, D. D. und Spector, D. H. (1995): Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest, *J. Virol.* 69 [11], Seite 6697-6704.
- Kalejta, R. F.; Bechtel, J. T. und Shenk, T. (2003): Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors, *Mol Cell Biol* 23 [6], Seite 1885-95.
- Kalejta, R. F. und Shenk, T. (2002): Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus, *Front. Biosci.* 7, Seite D295-306.
- Kalejta, R. F. und Shenk, T. (2003): The human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) accelerates progression through the G1 phase of the cell cycle, *J Virol* 77 [6], Seite 3451-9.
- Kalejta, R. F. und Shenk, T. (2003): Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [6], Seite 3263-8.
- Kishimoto, T. und Okumura, E. (1997): In vivo regulation of the entry into M-phase: initial activation and nuclear translocation of cyclin B/Cdc2, *Prog Cell Cycle Res* 3, Seite 241-9.
- Kondo, K.; Kaneshima, H. und Mocarski, E. S. (1994): Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 [25], Seite 11879-83.
- Labib, K.; Tercero, J. A. und Diffley, J. F. (2000): Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression, *Science* 288 [5471], Seite 1643-7.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [259], Seite 680-5.
- Lagenaur, L. A.; Manning, W. C.; Vieira, J.; Martens, C. L. und Mocarski, E. S. (1994): Structure and function of the murine cytomegalovirus sgg1 gene: a determinant of viral growth in salivary gland acinar cells, *J Virol* 68 [12], Seite 7717-27.
- Lazaro, J. B.; Bailey, P. J. und Lassar, A. B. (2002): Cyclin D-cdk4 activity modulates the subnuclear localization and interaction of MEF2 with SRC-family coactivators during skeletal muscle differentiation, *Genes Dev* 16, Seite 1792-1805.
- Lembo, D.; Gribaudo, G.; Cavallo, R.; Riera, L.; Angeretti, A.; Hertel, L. und Landolfo, S. (1999): Human cytomegalovirus stimulates cellular dihydrofolate reductase activity in quiescent cells, *Intervirology* 42 [1], Seite 30-6.
- Leone, G.; DeGregori, J.; Yan, Z.; Jakoi, L.; Ishida, S.; Williams, R. S. und Nevins, J. R. (1998): E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase, *Genes Dev* 12 [14], Seite 2120-30.

- Lew, D. J. und Kombluth, S. (1996): Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control, *Curr Opin Cell Biol* 8, Seite 795-804.
- Li, J.; Meyer, A. N. und Donoghue, D. J. (1997): Nuclear localization of Cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, Seite 502-507.
- Li, R. Y. und Tsutsui, Y. (2000): Growth retardation and microcephaly induced in mice by placental infection with murine cytomegalovirus, *Teratology* 62 [2], Seite 79-85.
- Liang, C.; Weinreich, M. und Stillman, B. (1995): ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome, *Cell* 81 [5], Seite 667-76.
- Ljungman, P. (2002): Betaherpesvirus Challenges in the Transplant Recipient, *The Journal of Infectious Diseases* 186, Seite S99-109.
- Lomonte, P. und Everett, R. (1999): Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 inhibits progression of cells through mitosis and from G1 into S phase of the cell cycle, *J Virol* 73, Seite 9456-9467.
- Lu, M. und Shenk, T. (1996): Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S, *J. Virol.* 70 [12], Seite 8850-8857.
- Lu, M. und Shenk, T. (1999): Human cytomegalovirus UL69 protein induces cells to accumulate in G1 phase of the cell cycle, *J. Virol.* 73 [1], Seite 676-683.
- Lukas, C.; Sorensen, C. S.; Kramer, E.; Santoni-Rugiu, E.; Lindeneg, C.; Peters, J. M.; Bartek, J. und Lukas, J. (1999): Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex, *Nature* 401 [6755], Seite 815-8.
- MacDonald, M. R.; Li, X. Y.; Stenberg, R. M.; Campbell, A. E. und Virgin, H. W. th (1998): Mucosal and parenteral vaccination against acute and latent murine cytomegalovirus (MCMV) infection by using an attenuated MCMV mutant, *J Virol* 72 [1], Seite 442-51.
- Mailand, N.; Podtelejnikov, A.V.; Groth, A.; Mann, M.; Bartek, J. und Lukas, J. (2002): Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability, *Embo J* 21 [21], Seite 5911-20.
- Masai, H. und Arai, K-I (2002): Cdc7 kinase complex: a key regulator in the initiation of DNA replication, *J Cell Physiol* 190, Seite 287-296.
- Masai, H.; Matsui, E.; You, Z.; Ishimi, Y.; Tamai, K. und Arai, K. (2000): Human Cdc7-related kinase complex. In vitro phosphorylation of MCM by concerted actions of Cdks and Cdc7 and that of a critical threonine residue of Cdc7 by Cdks, *J. Biol. Chem.* 275 [37], Seite 29042-29052.
- McElroy, A. K.; Dwarakanath, R. S. und Spector, D. H. (2000): Dysregulation of cyclin E gene expression in human cytomegalovirus-infected cells requires viral early gene expression and is associated with changes in the Rb-related protein p130, *J Virol* 74 [9], Seite 4192-206.
- Meijer, H.; Dreesen, J. C. und Van Boven, C. P. (1986): Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of the rat cytomegalovirus genome, *J Gen Virol* 67 ( Pt 7), Seite 1327-42.

- Meijer, L. (1996): Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases., Trends Cell Biol. 6, Seite 393-397.
- Melnick, J. L.; Adam, E. und DeBakey, M. E. (1995): Cytomegalovirus and atherosclerosis, Bioessays 17 [10], Seite 899-903.
- Mendez, J. und Stillman, B. (2000): Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis, Mol Cell Biol 20 [22], Seite 8602-12.
- Michelson, S. (1999): Human cytomegalovirus escape from immune detection, Intervirology 42 [5-6], Seite 301-7.
- Mocarski, E. S. (2001): Cytomegaloviruses and their replication, Knipe, D. M.; Howley, P. M. und al., et, Fields Virology Seite 2448-2492, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Morello, C. S.; Ye, M. und Spector, D. H. (2002): Development of a vaccine against murine cytomegalovirus (MCMV), consisting of plasmid DNA and formalin-inactivated MCMV, that provides long-term, complete protection against viral replication, J Virol 76 [10], Seite 4822-35.
- Morris, M. C.; Gondeau, C.; Tainer, J. A. und Divita, G. (2002): Kinetic mechanism of activation of the Cdk2/cyclin A complex. Key role of the C-lobe of the Cdk, J Biol Chem 277 [26], Seite 23847-53.
- Muralidhar, S.; Doniger, J.; Mendelson, E.; Araujo, J. C.; Kashanchi, F.; Azumi, N.; Brady, J. N. und Rosenthal, L. J. (1996): Human cytomegalovirus mtrII oncoprotein binds to p53 and down-regulates p53-activated transcription, J Virol 70 [12], Seite 8691-700.
- Muranyi, W.; Haas, J.; Wagner, M.; Krohne, G. und Koszinowski, U. H. (2002): Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina, Science 297, Seite 854-857.
- Nyberg, K.; Michelson, R. J.; Putnam, C. W. und Weinert, T. A. (2002): Toward maintaining the genom: DNA damage and replication checkpoints, Annu. Rev. Genet. 36, Seite 617-56.
- Oegema, K.; Desai, A.; Rybina, S.; Kirkham, M. und Hyman, A. A. (2001): Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*, J Cell Biol 153 [6], Seite 1209-26.
- Ohtani, K.; DeGregori, J.; Leone, G.; Herendeen, D. R.; Kelly, T. J. und Nevins, J. R. (1996): Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor, Mol Cell Biol 16 [12], Seite 6977-84.
- Ohtani, K.; DeGregori, J. und Nevins, J. R. (1995): Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1, Proc Natl Acad Sci U S A 92 [26], Seite 12146-50.
- Pass, R. F. (1985): Epidemiology and transmission of cytomegalovirus, J Infect Dis 152 [2], Seite 243-8.
- Pass, R. F. (2001): Cytomegalovirus, Knipe, D. M. und Howley, P. M., Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

- Piatti, S.; Bohm, T.; Cocker, J. H.; Diffley, J. F. und Nasmyth, K. (1996): Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a 'point of no return' after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast, *Genes Dev* 10 [12], Seite 1516-31.
- Piatti, S.; Lengauer, C. und Nasmyth, K. (1995): Cdc6 is an unstable protein whose de novo synthesis in G1 is important for the onset of S phase and for preventing a 'reductional' anaphase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Embo J* 14 [15], Seite 3788-99.
- Pines, J. und Hunter, T. (1989): Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2, *Cell* 58 [5], Seite 833-46.
- Pines, J. und Hunter, T. (1990): Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B, *Nature* 346 [6286], Seite 760-3.
- Plachter, B.; Sinzger, C. und Jahn, G. (1996): Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus, *Adv Virus Res* 46, Seite 195-261.
- Planas-Silva, M. D. und Weinberg, R. A. (1997): The restriction point and control of cell proliferation, *Curr Opin Cell Biol* 9 [6], Seite 768-72.
- Poma, E. E.; Kowalik, T. F.; Zhu, L.; Sinclair, J. H. und Huang, E.-S. (1996): The human cytomegalovirus IE1-72 protein interacts with the cellular p107 protein and relieves p107-mediated transcriptional repression of an E2F-responsive promoter, *J. Virol.* 70 [11], Seite 7867-7877.
- Priscott, P. K. und Tyrrell, D. A. (1982): The isolation and partial characterisation of a cytomegalovirus from the brown rat, *Rattus norvegicus*, *Arch Virol* 73 [2], Seite 145-60.
- Prösch, S.; Wendt, C. E.; Reinke, P.; Priemer, C.; Oppert, M.; Kruger, D. H.; Volk, H. D. und Docke, W. D. (2000): A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation, *Virology* 272 [2], Seite 357-65.
- Quelle, D. E.; Ashmun, R. A.; Shurtleff, S. A.; Kato, J. Y.; Bar-Sagi, D.; Roussel, M. F. und Sherr, C. J. (1993): Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts, *Genes Dev* 7 [8], Seite 1559-71.
- Rawlinson, W. D.; Farrell, H. E. und Barrell, B. G. (1996): Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus, *J Virol* 70 [12], Seite 8833-49.
- Razzaque, A.; Zhu, F. und Jones, C. (1991): Functional analysis of human cytomegalovirus morphological transforming region II (mtrII), *Virology* 181 [1], Seite 399-402.
- Reddehase, M. J.; Dreher-Stumpp, L.; Angele, P.; Balthesen, M. und Susa, M. (1992): Hematopoietic stem cell deficiency resulting from cytomegalovirus infection of bone marrow stroma, *Ann Hematol* 64 Suppl, Seite A125-7.
- Reddehase, M. J.; Podlech, J. und Grzimek, N. K. (2002): Mouse models of cytomegalovirus latency: overview, *J Clin Virol* 25 Suppl 2, Seite S23-36.

- Roizman, B. und Jr., P. R. R. (1964): Multiplication of herpes simplex virus. II. The relation between protein synthesis and the duplication of viral DNA in infected HEp-2 cells., *Virology* 22, Seite 262-269.
- Roizman, B. und Knipe, D. M. (2001): Herpes simplex viruses and their replication, Knipe, D. M. und Howley, P. M., *Fields Virology*, 4. Auflage, Seite 2399-2459, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Roizman, B. und Pellett, P. E. (2001): The Family *Herpesviridae*: A Brief Introduction, Knipe, D. M. und Howley, P. M., *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Saederup, N.; Lin, Y. C.; Dairaghi, D. J.; Schall, T. J. und Mocarski, E. S. (1999): Cytomegalovirus-encoded beta chemokine promotes monocyte-associated viremia in the host, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [19], Seite 10881-6.
- Salvant, B. S.; Fortunato, E. A. und Spector, D. H. (1998): Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription, *J. Virol.* 72, Seite 3729-3741.
- Sanchez, V.; McElroy, A. K. und Spector, D. H. (2003): Mechanisms governing maintenance of Cdk1/Cyclin B1 kinase activity in cells infected with human Cytomegalovirus, *J Virol* 77 [24], Seite 13214-13224.
- Shadan, F. F.; Cowsert, L. M. und Villarreal, L. P. (1994): n-Butyrate, a cell cycle blocker, inhibits the replication of polyomaviruses and papillomaviruses but not that of adenoviruses and herpesviruses, *J Virol* 68 [8], Seite 4785-96.
- Shanley, J. D.; Morningstar, J. und Jordan, M. C. (1985): Inhibition of murine cytomegalovirus lung infection and interstitial pneumonitis by acyclovir and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, *Antimicrob Agents Chemother* 28 [2], Seite 172-5.
- Sherr, C. J. (1995): D-type cyclins, *Trends Biochem Sci* 20 [5], Seite 187-90.
- Sinclair, J.; Baillie, J.; Bryant, L. und Caswell, R. (2000): Human cytomegalovirus mediates cell cycle progression through G(1) into early S phase in terminally differentiated cells, *J Gen Virol* 81 [Pt 6], Seite 1553-1565.
- Singer, J. D.; Gurian-West, M.; Clurman, B. und Roberts, J. M. (1999): Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells, *Genes Dev* 13 [18], Seite 2375-87.
- Sinzger, C. und Jahn, G. (1996): Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis, *Intervirolgy* 39 [5-6], Seite 302-19.
- Smith, M. G. (1954): Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:435-440.
- Smits, V. A. J. und Medema, R. H. (2001): Checking out the G2/M transition, *Biochimica et Biophysica Acta* 1519, Seite 1-12.

- Soderberg-Naucler, C.; Fish, K. N. und Nelson, J. A. (1997): Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors, *Cell* 91 [1], Seite 119-26.
- Song, B.; Liu, J. J.; Yeh, K. C. und Knipe, D. M. (2000): Herpes simplex virus infection blocks events in the G1 phase of the cell cycle, *Virology* 267 [2], Seite 326-34.
- Song, Y. J. und Stinski, M. F. (2002): Effect of the human cytomegalovirus IE86 protein on expression of E2F-responsive genes: A DNA microarray analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 [5], Seite 2836-2841.
- Span, A. H.; Grauls, G.; Bosman, F.; van Boven, C. P. und Bruggeman, C. A. (1992): Cytomegalovirus infection induces vascular injury in the rat, *Atherosclerosis* 93 [1-2], Seite 41-52.
- Speir, E.; Modali, R.; Huang, E. S.; Leon, M. B.; Shawl, F.; Finkel, T. und Epstein, S. E. (1994): Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis, *Science* 265 [5170], Seite 391-4.
- Stagno, S.; Pass, R. F.; Cloud, G.; Britt, W. J.; Henderson, R. E.; Walton, P. D.; Veren, D. A.; Page, F. und Alford, C. A. (1986): Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome, *Jama* 256 [14], Seite 1904-8.
- Stals, F. S.; Zeytinoglu, A.; Havenith, M.; de Clercq, E. und Bruggeman, C. A. (1993): Rat cytomegalovirus-induced pneumonitis after allogeneic bone marrow transplantation: effective treatment with (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)cytosine, *Antimicrob Agents Chemother* 37 [2], Seite 218-23.
- Swanton, C.; Mann, D. J.; Fleckenstein, B.; Neipel, F.; Peters, G. und Jones, N. (1997): Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition of CDK inhibitor proteins, *Nature* 390, Seite 184-7.
- Sweet, C. (1999): The pathogenicity of cytomegalovirus, *FEMS Microbiol Rev* 23 [4], Seite 457-82.
- Taylor-Wiedeman, J.; Sissons, J. G.; Borysiewicz, L. K. und Sinclair, J. H. (1991): Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells, *J Gen Virol* 72, Seite 2059-64.
- Thompson, J.; Doniger, J. und Rosenthal, L. J. (1994): A 79 amino acid oncogene is responsible for human cytomegalovirus mtrII induced malignant transformation, *Arch Virol* 136 [1-2], Seite 161-72.
- Todorvo, I. T.; Attaran, A. und Kearsey, S. E. (1995): BM28, a human member of the MCM2-3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication., *J Cell Biol* 129, Seite 1433-1445.
- Toorkey, C. B. und Carrigan, D. R. (1989): Immunohistochemical detection of an immediate early antigen of human cytomegalovirus in normal tissues, *J Infect Dis* 160 [5], Seite 741-51.
- Tsutsui, Y. (1995): Developmental disorders of the mouse brain induced by murine cytomegalovirus: animal models for congenital cytomegalovirus infection, *Pathol Int* 45 [2], Seite 91-102.

- Turtinen, L. W.; Saltzman, R.; Jordan, M. C. und Haase, A. T. (1987): Interactions of human cytomegalovirus with leukocytes in vivo: analysis by in situ hybridization, *Microb Pathog* 3 [4], Seite 287-97.
- van Den Pol, A. N.; Mocarski, E.; Saederup, N.; Vieira, J. und Meier, T. J. (1999): Cytomegalovirus cell tropism, replication, and gene transfer in brain, *J Neurosci* 19 [24], Seite 10948-65.
- Vieira, J.; Farrell, H. E.; Rawlinson, W. D. und Mocarski, E. S. (1994): Genes in the HindIII J fragment of the murine cytomegalovirus genome are dispensable for growth in cultured cells: insertion mutagenesis with a lacZ/gpt cassette, *J Virol* 68 [8], Seite 4837-46.
- Vink, C.; Beuken, E. und Bruggeman, C. A. (2000): Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome, *J Virol* 74 [16], Seite 7656-65.
- Vousden, K. H. (1995): Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins, *Semin Cancer Biol* 6 [2], Seite 109-16.
- Wade, M.; Kowalik, T. F.; Mudryj, M.; Huang, E. S. und Azizkhan, J. C. (1992): E2F mediates dihydrofolate reductase promoter activation and multiprotein complex formation in human cytomegalovirus infection, *Mol Cell Biol* 12 [10], Seite 4364-74.
- Waterborg, J. H. und Matthews, H. R. (1994): The Lowry method for protein quantitation, *Methods Mol Biol* 32, Seite 1-4.
- Weinreich, M. und Stillman, B. (1999): Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and RAD53 checkpoint pathway, *Embo J* 18, Seite 5334-5346.
- Wentworth, B. B. und French, L. (1970): Plaque assay of CMV strains of human origin, *P.S.E.B.M.*
- Wiebusch, L.; Asmar, J.; Uecker, R. und Hagemeyer, C. (2003): Human cytomegalovirus immediate-early over protein 2 (IE2)-mediated activation of cyclin E is cell-cycle-independent and forces S-phase entry in IE2-arrested cells, *J Gen Virol* 84 [Pt 1], Seite 51-60.
- Wiebusch, L. und Hagemeyer, C. (2001): The human cytomegalovirus immediate early 2 protein dissociates cellular DNA synthesis from cyclin-dependent kinase activation, *EMBO J.* 20 [5], Seite 1086-1098.
- Wiebusch, L.; Uecker, R. und Hagemeyer, C. (2003): Human cytomegalovirus prevents replication licensing by inhibiting MCM loading onto chromatin, *EMBO Rep* 4 [1], Seite 42-6.
- Won, K. A. und Reed, S. I. (1996): Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E, *EMBO J.* 15 [16], Seite 4182-93.
- Yam, CH.; Fung, TK. und Poon, RY. (2002): Cyclin A in cell cycle control and cancer, *Cell Mol Life Sci.* 59 [8], Seite 1317-26.
- Ye, M.; Duus, K. M.; Peng, J.; Price, D. H. und Grose, C. (1999): Varicella-zoster virus Fc receptor component gI is phosphorylated on its endodomain by a cyclin-dependent kinase, *J Virol* 73 [2], Seite 1320-30.

- Zafiropoulos, A.; Tsenteliero, E.; Billiri, K. und Spandidos, D. A. (2003): Human herpes viruses in non-melanoma skin cancers, *Cancer Lett* 198 [1], Seite 77-81.
- Zhang, H. S.; Gavin, M.; Dahiya, A.; Postigo, A. A.; Ma, D.; Luo, R. X.; Harbour, J. W. und Dean, D. C. (2000): Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF, *Cell* 101 [1], Seite 79-89.
- Zhang, Z.; Huong, S. M.; Wang, X.; Huang, D. Y. und Huang, E. S. (2003): Interaction between human cytomegalovirus IE1-72 and cellular p107: Functional Domains and Mechanisms of up-regulation of cyclin E/ cdk2 kinase activity, *J Virol* 77 [23], Seite 12660-12670.
- Zhu, H.; Cong, J. P.; Mamtora, G.; Gingeras, T. und Shenk, T. (1998): Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [24], Seite 14470-5.

## 6. Zusammenfassung

Das humane Zytomegalievirus, ein DNA-Virus aus der Familie der Herpesviren, ist ein ubiquitäres Pathogen, welches akute und persistierende Infektionen verursacht. So sind weltweit ungefähr 60% der über 35jährigen HCMV-seropositiv, allerdings wird hier das Virus in aller Regel durch das Immunsystem kontrolliert und persistiert im latenten Zustand. Bei immunsupprimierten Patienten hingegen (z. B. Transplantationsempfängern, AIDS-Kranken, und Frühgeborenen) kann das Virus zu schweren Erkrankungen, wie Hepatitis, Pneumonie, Retinitis und bei kongenitaler Infektion außerdem zu Schädigungen des ZNS führen.

Im Verlauf der letzten Jahre hat sich mehr und mehr herausgestellt, dass HCMV bei lytischer Infektion das Zellzyklusgeschehen der Wirtszelle tiefgreifend beeinflusst. Einerseits blockiert HCMV die Zellproliferation sehr effektiv durch einen Arrest am G1/S-Übergang des Zellzyklus, andererseits wird aber gleichzeitig die Expression S-Phase spezifischer Gene aktiviert.

Somit steht in den blockierten Zellen dem G1-DNA-Gehalt ein für die S-Phase spezifisches Expressionsmuster von Enzymen und Zellzyklusregulatoren gegenüber. Dieser scheinbar widersprüchliche Zellzyklus-Phänotyp infizierter Zellen erklärt sich, zumindest teilweise, durch eine vom Virus vermittelte spezifische Inhibition der zellulären DNA-Replikation sowie durch eine massive Deregulation Zyklin-assoziiierter Kinasen, die die Zellzyklusprogression steuern. Durch diese Regulationsschritte scheint sich das Virus der kompetitiven zellulären DNA-Replikation zu entledigen, aber gleichzeitig mit den notwendigen zellulären Replikationsfaktoren und Nukleotiden für die eigene DNA-Synthese zu versorgen.

Zellkulturexperimente deuten darauf hin, dass die Zellzyklusalterationen wichtige Voraussetzungen für eine erfolgreiche und effiziente Virusreplikation darstellen. Es ist hingegen nicht bekannt, welche Relevanz sie für die Virusvermehrung *in vivo* und das pathologische Erscheinungsbild von HCMV-Infektionen im erkrankten Organismus besitzen. Damit lässt sich zurzeit auch nicht abschätzen, ob sich die potentielle Abhängigkeit der Virusreplikation vom Zellzyklusverhalten infizierter Zellen als Basis zur Entwicklung neuer antiviraler Strategien eignen könnte.

Dieser Fragenkomplex kann nur in einem Tiermodell sinnvoll angegangen werden. Aufgrund der ausgeprägten Wirtsspezifität der Zytomegalieviren, ist man bei der Erforschung der pathogenetischen Mechanismen dieses Virus im Tiermodell allerdings auf die Verwendung der jeweiligen artspezifischen CMV angewiesen. Murines CMV (MCMV) und Ratten-CMV (RCMV) sind dabei die bislang bestuntersuchteten Systeme, jedoch liegen keinerlei Daten über mögliche Zellzyklusalterationen durch diese CMV-Spezies vor.

Das Anliegen dieser Arbeit war es deshalb zu prüfen, inwieweit die für HCMV beschriebenen Zellzyklusregulationen in etablierten Infektionsmodellen für MCMV und RCMV auf Zellkulturbasis konserviert sind, um damit eine grundlegende Basis für relevante Untersuchungen im Tiermodell zu schaffen.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die beiden Stämme RCMV („Maastricht“ und „England“) als auch MCMV einen starken antiproliferativen Effekt auf infizierte Zellen besitzen und ebenso wie HCMV zu einem Zellzyklusarrest führen. Hervorzuheben ist dabei, dass zusätzlich zu dem G1-Arrest, Nager-Zytomegalieviren Zellen auch in der G2-Phase arretieren und in dieser Zellzyklusphase auch effizient replizieren können. Die Infektion mit Nager-Zytomegalieviren führt außerdem auf breiter Basis zur Veränderung Zyklin-assoziiierter Kinaseaktivitäten. Die Zyklin D1-, E- und B1-assoziierte Kinaseaktivitäten sind ähnlich dem humanen Zytomegalievirus-System dereguliert, allerdings sind die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen zwischen den CMV-Systemen zum Teil unterschiedlich. Im Gegensatz zu HCMV wird durch die Infektion mit Nager-Zytomegalieviren die Zyklin A-assoziierte Kinaseaktivität hochreguliert.

Allen Zytomegalieviren ist die Hemmung der zellulären DNA-Synthese am G1/S-Übergang gemein. Dabei erfolgt die Hemmung durch RCMV auf die gleiche Weise wie durch HCMV, in dem die Bindung des Präreplikationskomplexes an das Chromatin verhindert wird. Im Unterschied dazu inhibiert MCMV jedoch nicht die DNA-Bindung sondern vielmehr die Aktivierung des Präreplikationskomplexes nach erfolgter Assoziation mit der DNA. Dies geschieht durch die Inhibition der Phosphorylierung des essentiellen Replikationsfaktors MCM2, die im Übrigen auch in HCMV infizierten Zellen fehlt.

Durch diese vergleichende Studie wird einerseits deutlich, dass wesentliche funktionelle Schritte der Zellzyklusregulation zwischen den Zytomegalieviren konserviert sind, aber andererseits die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen zum Teil deutlich variieren.

Nach diesen Untersuchungen können nun weitere Studien initiiert werden, die die Frage nach der physiologischen Relevanz der Zellzyklusregulation *in vivo*, also im lebenden Organismus, adressieren. Dabei helfen die Erkenntnisse dieser Arbeit sich auf die Analyse solcher viraler Aktivitäten zu konzentrieren, die zwischen Nager- und Mensch-CMV konserviert und somit von potentieller humanpathologischer Relevanz sind.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Keine Erklärung finden die Abkürzungen für chemische Elemente und internationale Standardeinheiten (SI-Einheiten).

<b>Abk.</b>	<b>Begriffe</b>
4 N	4-fach
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
Ci	Curie
CKI	Cdk-Inhibitor
CPE	zytopathischer Effekt
CYC	Zyclin
d	Durchmesser
d. h.	das heißt
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eaglemedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoresceinthionylcarbonat
FKS	fötale Kälberserum
G1, G2	G1-, G2-Phase ( $g = gap$ )
GCV	Ganciclovir
GST	Glutathion-S-Transferase
(H)CMV	(humanes) Zytomegalievirus
HHV	Humanes Herpesvirus

---

<b>Abk.</b>	<b>Begriffe</b>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HSV	Herpes simplex Virus
i. d. R.	in der Regel
IE	<i>immediate-early</i>
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPB	Immunpräzipitationspuffer
M	Mitose-Phase
MCMV	murines Zytomegalievirus
min, h	Minute, Stunde
MOI	Multiplizität der Infektion
mtr	<i>morphological transforming region</i>
NKS	Neugeborenenkälberserum
Nr.	Nummer
ORC	<i>Origin-Recognition Complex</i>
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Foscarnet
PFU	Plaquebildende Einheit
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastomprotein
Pre-RC	Prereplikationskomplex
PVDF	Poly-Vinyliden-Difluorid
RCMV E/M	Ratten-Zytomegalievirus Stamm „England“/ „Maastricht“
S	S-Phase
SDS	Natriumdodekylsulfat
s. u.	siehe unten
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TTP	Thymin-5'-Triphosphat
U	Unit
WF	Wachstumsfaktoren
z. B.	zum Beispiel

## 7.2 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht:

### a) als Vortrag und Posterpräsentation auf wissenschaftlichen Kongressen

Neuwirth A., Wiebusch L., Voigt S. and Hagemeyer C.

S phase evasion as a common strategy of cytomegaloviruses.

*9<sup>th</sup> International Cytomegalovirus Workshop and 1<sup>st</sup> International Betaherpesvirus Workshop*, Maastricht, 20.-25. Mai 2003, Poster J.08

Neuwirth A., Wiebusch L., Voigt S. and Hagemeyer C.

Cell cycle alterations by Cytomegaloviruses.

*14<sup>th</sup> European Students' Conference*, Berlin, 4.-9. November 2003, Vortrag act078

### b) als Zeitschriftenartikel

eingereicht bei *Journal of Virology*:

Neuwirth A., Wiebusch L., Voigt S. and Hagemeyer C.

Common and distinct characteristics of human and rodent cytomegalovirus-mediated cell cycle regulation (Manuskript JVI02057-04)

### **7.3 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Ausserdem stellt die Arbeit keine Kopie anderer Arbeiten dar, und die Literatur ist vollständig angegeben.

Berlin, 10.12.04

Anke Neuwirth

#### **7.4 Danksagung**

Denen, die zur Entstehung dieser Arbeit unterstützend beigetragen haben möchte ich herzlich Danken.

Für die Förderung der Arbeit, die vorbildliche Betreuung, die Überlassung des Themas, die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten, sowie die hervorragende Ausbildung in praktischen Fertigkeiten möchte ich besonders meinem Betreuer Lüder Wiebusch und meinem Doktorvater Christian Hagemeyer danken.

Für fachliche, mentale und praktische Unterstützung danke ich der gesamten AG Hagemeyer, insbesondere Ralf Ücker, Christina Montag, Jasmin Asmar, Sebastian Voigt und Anneliese Lingelbach. Sebastian Voigt und Hartmut Hengel danke ich für den M/RCMV- Stock.

Frau PD Dr. H. Neitzel danke ich für die Einführung in die Anfertigung der Chromosomenpräparationen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich stets mit Einsatz, Geduld und Erfolg unterstützt haben.

Für ihre Unterstützung und ihr Verständnis danke ich Johannes Meier und Sandra Welsandt, die immer ein offenes Ohr hatten.