

Regulation der 5-Lipoxygenase durch humane Cytomegalovirus Infektion

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. phil. nat.)

Vorgelegt beim Fachbereich 14

Biochemie, Chemie und Pharmazie der

Johann Wolfgang Goethe Universität

in Frankfurt am Main

von

Laura Pufahl

aus Löhnberg

Frankfurt am Main (2011)

(D 30)

Vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Prof. Dr. Jindrich Cinatl jr.

Datum der Disputation: 09. Dezember 2011

Meinen Eltern

„Geh nicht nur die glatten Straßen.

Geh Wege, die noch niemand ging,

damit du Spuren hinterlässt

und nicht nur Staub.“

von Antoine de Saint-Exupéry (Citadelle)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	5-Lipoxygenase.....	1
1.1.1	Lipoxygenasen	1
1.1.2	Regulation der 5-Lipoxygenase	1
1.1.2.1	5-Lipoxygenase-Gen und -Promotor	1
1.1.2.2	Genregulation durch Sp1.....	4
1.1.2.3	Weitere Bindungsstellen und <i>Response</i> -Elemente im 5-LO-Promotor	6
1.1.2.4	Genregulation durch Histonmodifikation	11
1.1.2.4.1	Histonacetylierung	13
1.1.2.4.2	Histonmethylierung	14
1.1.2.5	Regulation des 5-Lipoxygenase-Promotors durch Histonmodifikationen.....	15
1.1.3	Proteinstruktur und Regulation der zellulären Aktivität der 5-Lipoxygenase.....	15
1.1.3.1	Struktur der humanen 5-Lipoxygenase	15
1.1.3.2	Leukotrienbiosynthese	17
1.1.3.3	5-Lipoxygenase-Expression und Regulation der zellulären Aktivität.....	18
1.1.4	Pathophysiologische Rolle der Leukotriene.....	22
1.1.5	Pharmakologische Inhibitoren der 5-Lipoxygenasekaskade.....	25
1.2	Humanes Cytomegalovirus.....	27
1.2.1	Strukturelle Eigenschaften des Humanen Cytomegalovirus.....	27
1.2.2	Zelltropismus	28
1.2.3	Lytischer Replikationszyklus.....	29
1.2.4	Latenz und Reaktivierung.....	31
1.2.5	Immediate Early Proteine.....	33
1.2.5.1	Struktureller Aufbau und Expressionsregulation der Immediate Early Proteine	33
1.2.5.2	Funktionelle und transaktivierende Eigenschaften der Immediate Early Proteine.....	36
1.2.5.3	Funktion der Immediate Early Proteine als Regulatoren des Histoncodes.....	38
1.2.6	Regulation der viralen Genexpression durch epigenetische Mechanismen	39
1.2.7	Beeinflussung zellulärer Kinasen und Wachstumsfaktoren durch HCMV.....	44
1.2.8	HCMV assoziierte Erkrankungen.....	48

2	ZIEL DER ARBEIT	50
3	MATERIAL UND METHODEN	51
3.1	Zelllinien und Zellkultur	51
3.2	Inkubationsreagenzien.....	52
3.3	Viren.....	52
3.3.1	Humane Cytomegalovirus-Stamm AD169	52
3.3.2	Humane Cytomegalovirus-Stamm Towne und CR208	52
3.4	Viruskultivierung.....	53
3.5	Virustitration und Aminoethylcarbazol-Färbung.....	53
3.6	Plasmide.....	54
3.6.1	5-LO-Reporterkonstrukte.....	54
3.6.2	Expressionsplasmide	54
3.6.3	Kontrollplasmide.....	54
3.7	Plasmidpreparationen.....	55
3.8	Klonierung von Immediate Early Deletionsplasmiden.....	55
3.8.1	Deletionsmutanten der viralen Proteine IE1 und IE2	55
3.8.2	Bakterielle Expressionsplasmide der viralen Deletionsmutanten.....	56
3.9	Transfektionen.....	57
3.9.1	Lipofektamin-Transfektion von humanen Vorhaut-Fibroblasten	57
3.9.2	Calciumphosphat-Transfektion von HEK293T-Zellen	57
3.10	Reportergenassay.....	58
3.11	Infektionsversuche mit HCMV AD169 und CR208	58
3.12	UV-Inaktivierung des Virus bzw. Filtration des Virusüberstandes	58
3.13	SDS PAGE und Coomassie-Färbung	58
3.14	Western Blot.....	59
3.15	Aufreinigung von Phospho-Proteinen.....	61
3.16	Immunocytochemie.....	61
3.17	5-Lipoxygenase-Aktivitätsassay	62
3.18	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	62
3.19	Chromatin Immunoprecipitation assay (ChIP).....	63
3.20	RNS-Extraktion und cDNS-Synthese	63

3.21	Quantitative real time PCR (qPCR)	64
3.22	Bradford-Messung	65
3.23	Proteinexpression.....	65
3.24	<i>Pull-down</i> -Versuche	66
3.25	<i>In vitro</i> -Kinaseassay.....	67
3.26	Circulardichroismus Spektrum.....	68
3.27	ATP-Bindungsanalyse.....	68
3.28	Co-Immunopräzipitation.....	68
3.29	Histondeacetylase-Aktivitätsassay	69
3.30	Lentiviraler <i>Knock-down</i>	70
3.31	Signifikanzberechnungen	70
4	ERGEBNISSE	71
4.1	Induktion von 5-LO-mRNS und -Protein durch IE1.....	71
4.1.1	Induktion der 5-LO nach Infektion mit HCMV AD169 auf mRNS-Ebene	71
4.1.2	Abhängigkeit der Induktion vom viralen Replikationszyklus.....	72
4.1.3	Transaktivierende Eigenschaften viraler Proteine auf den 5-LO-Promotor	74
4.1.4	Promotoraktivierung durch die IE1-defiziente Virusmutante CR208	76
4.1.5	Regulation der 5-LO-mRNS-Expression durch CR208.....	77
4.1.6	Regulation der 5-LO-Proteinexpression durch Immediate Early 1	79
4.1.7	5-LO-Aktivitätsassay nach Infektion beziehungsweise IE1-Überexpression	81
4.1.8	Expression von Enzymen des 5-LO-Signalweges in diversen Zelllinien.....	82
4.2	Mechanistische Untersuchungen zur IE1-vermittelten Induktion des 5-LO-Promotors über Sp1.....	83
4.2.1	Einfluss von IE1 auf die Transkriptionsfaktorregulation	83
4.2.2	Untersuchung der Induktion von 5-LO-Promotordelensionskonstrukten durch IE1	85
4.2.3	Einfluss von Mithramycin auf die Induktion des 5-LO-Promotors durch IE1	88
4.2.4	5-LO-Promotoraktivität in Abhängigkeit von Sp1-Überexpression	89
4.2.5	Transaktivierende Eigenschaften der Immediate Early Deletionsmutanten.....	91
4.2.6	Interaktion von Sp1 mit Immediate Early Proteinen	92
4.2.7	Zelluläres phospho-Sp1-Level nach Expression von IEP	93
4.2.8	Untersuchung der direkten Phosphorylierung von Sp1 durch IE1	94
4.2.9	Abhängigkeit des induktiven IE1-Effektes von Wortmannin	96

4.2.10	Untersuchung der Interaktion von DNS-PK und IE1	98
4.2.11	Untersuchung der Kinase-vermittelten Phosphorylierung von Sp1 durch IE1	99
4.2.12	Induktiver IE1-Effekt auf 5-LO in HFFΔSp1 Zellen	104
4.2.13	Charakterisierung der Komplexbildung im GC4-Promotorbereich	106
4.2.14	Bindung von Sp1 im GC4-Promotorbereich nach Infektion und IE1-Überexpression.....	107
4.3	HDAC-inhibitorische Effekte durch Immediate Early 1	109
4.3.1	Untersuchung der Interaktion zwischen HDACs und IE1 / IE2	109
4.3.2	Beeinflussung der HDAC-Aktivität durch IE1-Überexpression	110
4.3.3	Funktionelle Beeinflussung des 5-LO-Promotors nach HDAC-Überexpression	111
5	DISKUSSION	114
5.1	Charakterisierung des induktiven Effektes von HCMV auf 5-Lipoxygenase	114
5.2	Mechanistische Untersuchungen des Immediate Early 1-Effekts	120
5.2.1	Sp1-vermittelte Induktion des 5-Lipoxygenase-Promotors.....	120
5.2.2	HDAC-inhibitorischer Einfluss auf die 5-Lipoxygenase Promotoraktivität.....	133
6	ZUSAMMENFASSUNG	137
7	ABKÜRZUNGEN	141
8	ANHANG	148
8.1	Etablierung der viralen Proteinexpression.....	148
8.1.1	Aufreinigung bakteriell-exprimierter viraler Proteine.....	148
8.1.2	Faltungsanalyse der bakteriell-exprimierten Proteine.....	149
8.1.3	ATP-Bindung von Immediate Early 1	151
9	ABBILDUNGEN	152
	LEBENS LAUF	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	DANKSAGUNG	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 EINLEITUNG

1.1 5-Lipoxygenase

1.1.1 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LO) sind Dioxygenasen, die die Einführung von molekularem Sauerstoff in polyungesättigte Fettsäuren mit 1-, 4-cis Pentadienstruktur katalysieren können [2, 3]. Sie werden benannt nach der stereospezifischen Position, in welcher sie die Oxidation der Arachidonsäure (AA) durchführen. In Säugern gibt es 5-/8-/12- und 15-LO [4, 5] mit jeweils unterschiedlichen Isoformen. Human sind sechs funktionelle LO-Gene bekannt, die mit Ausnahme der 5-Lipoxygenase (5-LO) auf Chromosom 17 liegen. 1993 wurde zum ersten Mal die Kristallstruktur von Lipoxygenase-I aus Sojabohnen charakterisiert [3] und 2011 schließlich die der humanen 5-Lipoxygenase [2]. Diese wird primär in leukozytären Zellen wie polymorphonukleären Leukozyten (Neutrophilen/Eosinophilen), Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, B-Lymphozyten, dendritischen Zellen sowie in Schaumzellen arteriosklerotischer Plaques exprimiert. 5-LO ist das essentielle Enzym in der Synthese der proinflammatorischen Leukotriene und steht so in direktem Zusammenhang mit Krebs- und Entzündungserkrankungen.

1.1.2 Regulation der 5-Lipoxygenase

1.1.2.1 5-Lipoxygenase-Gen und -Promotor

Das humane 5-Lipoxygenase-Gen befindet sich auf Chromosom 10 und umfasst eine 71,9 kbp große Region. Charakterisiert wurde es erstmals 1989 durch Funk et. al. [4] und Hoshiko et. al. [5]. Strukturell besteht das 5-LO-Gen aus 14 Exons und einer Promotorregion, die 5,9 kb upstream des Transkriptionsstarts liegt. Diese Promotorregion besitzt weder TATA- noch CAT-reiche Regionen, dafür aber eine Vielzahl von GC-Boxen, was typisch für sogenannte Haushaltsgene ist [6]. Insgesamt umfasst der 5-LO-Promotor acht GC-Boxen, von denen fünf als Tandemstruktur (-176bp bis -147bp bezogen auf ATG) organisiert sind. In dieser Tandemstruktur sind überlappende Bindungsstellen für Sp1 (*Specificity protein 1*) (GGGCGGG) und Egr1 (*Early growth response factor-1*) (GCGGGGGCG) lokalisiert [7]. Daneben gibt es downstream noch eine weitere GC-Box (-120bp bis -114bp), die sogenannte GC4-Box und upstream (-239bp

bis -233bp; -223bp bis -216bp) die GC-Boxen 1 und 2. Im proximalen Promotorbereich ist außerdem noch eine nicht klassische GC-Box (GGGAGG) lokalisiert (Abb. 1). Über diese Strukturen wird, nach allem was bekannt ist, die basale Promotoraktivität reguliert. Mutationsanalysen haben ergeben, dass vor allem die GC4-Box essentiell für die Regulation der 5-LO Promotoraktivität ist [8, 9]. Aber auch durch Veränderungen der Tandemstruktur kommt es zur Hemmung der Aktivität, wohingegen die Mutation der nicht klassischen GC5-Box eine Transkriptionsinitiation auslöst, was für deren repressive Wirkung spricht.

Darüber hinaus gibt es auch natürlich vorkommende Mutationen, bei denen es zur Addition oder Deletion von Sp1-Bindungsstellen in der Tandemstruktur kommen kann, was die unterschiedlichsten physiologischen und pharmakogenetischen Auswirkungen zur Folge hat. Es wurde zum einen eine Intimaverdickung und Konzentrationserhöhung von C-reaktivem Protein durch vermehrte Leukotrienbildung aufgrund von 5-LO-Aktivitätssteigerung beschrieben [7]. Aber auch ein vermindertes Ansprechen auf den 5-LO-Inhibitor ABT-761 in klinischen Studien zur Asthmatherapie [10], was eher für eine verringerte Aktivität spricht. Generell lässt sich also sagen, dass die im 5-LO-Promotor vorhandenen GC-Boxen essentiell an dessen Aktivitätsregulation beteiligt sind.

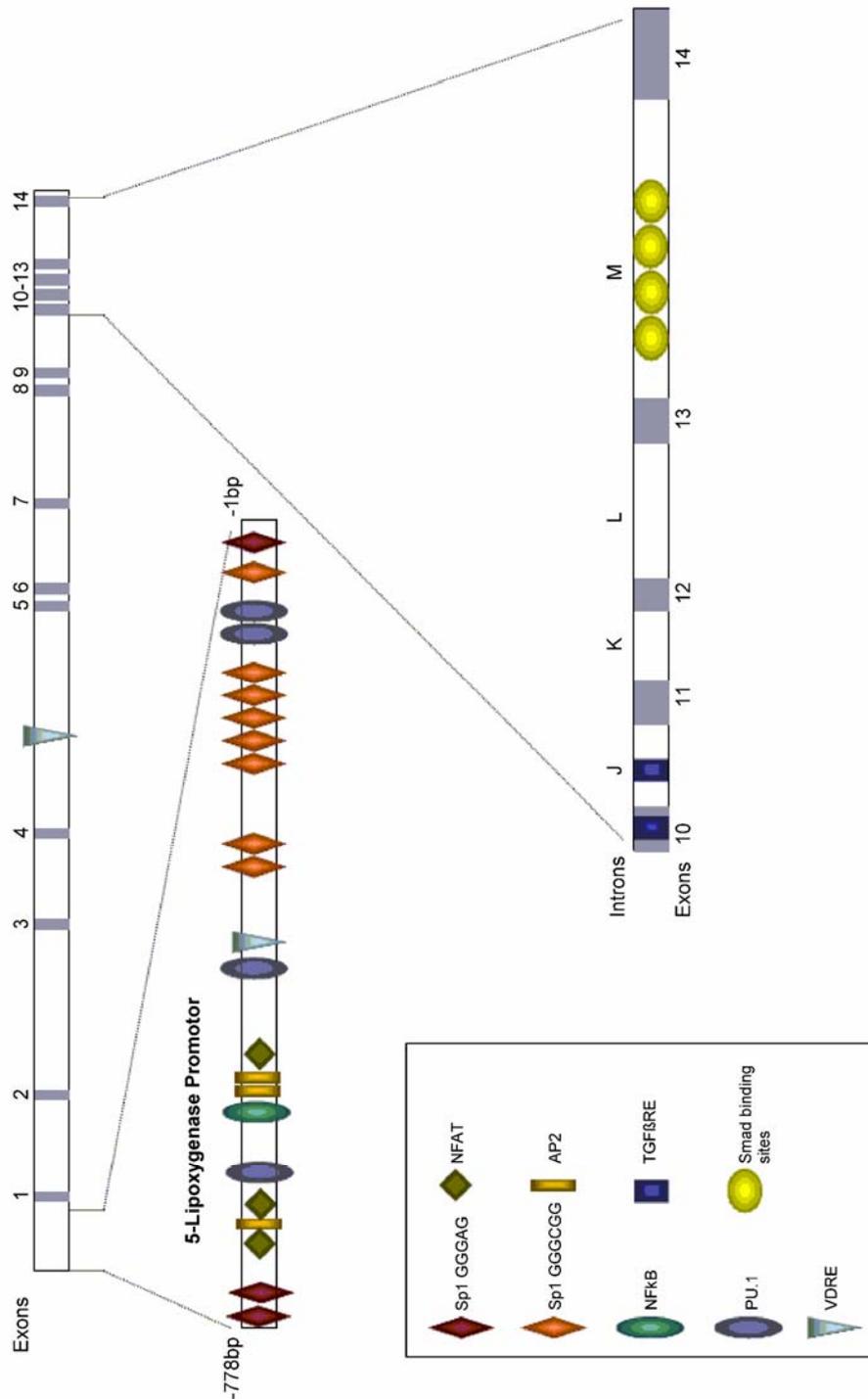


Abbildung 1: Struktur des 5-LO-Gens und Charakterisierung der GC-Boxen in der Promotorregion modifiziert nach Radmark et. al. [6]; Das 71,9kbp große 5-LO-Gen, welches auf dem Chromosom 10 lokalisiert ist, kann in 14 Exons unterteilt werden. Dargestellt sind die Bindungsstellen der verschiedenen Transkriptionsfaktoren im 5-LO-Promotor, sowie regulatorische Elemente im distalen Bereich.

1.1.2.2 Genregulation durch Sp1

Sp1 ist ein humaner Transkriptionsfaktor, der ubiquitär in nahezu jedem Gewebe exprimiert wird. Er kann sowohl aktivierende als auch reprimierende Wirkung auf Promotoren unterschiedlichster humaner und auch viraler Gene ausüben, und übernimmt so eine duale Rolle in der Genexpression [11, 12]. Gesteuert werden zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Onkogenese [13-15] und der Zellzyklus [16]. Sp1 gehört zur Familie der Sp/KLF (*Specificity protein/Krüppel like factors*) und weist eine zu 65% konservierte DNS-Bindungsdomäne mit drei Zinkfinger-Motiven auf [17]. Die Sp1-Expression ist autoreguliert, da sein Promotor über Sp1-Bindungsstellen verfügt [18]. Diese haben die Sequenz (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)CT oder (G/T)(G/A)GGCG(G/T)(G/A)(G/A)(C/T) [19-21]. In Studien konnte gezeigt werden, dass Sp1 für die basale Transkription verantwortlich zu sein scheint [9], während Sp3 (*Specificity protein 3*), ebenfalls ein Transkriptionsfaktor der Sp/KLF Familie, die induzierbare Transkription steuert [8, 11, 12, 22].

Die promotorbeeinflussende Wirkung von Sp1 kann durch vielfältige Regulationen verändert werden (Abb. 2). Zum einen ist das zelluläre Gleichgewicht von Sp1 und Sp3 entscheidend für die Promotoraktivität [12]. Am Beispiel des E2F (*E2-factor*)-assoziierten Phosphoprotein Promotor konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Sp1-Spiegel in Relation zu Sp3 zu einer verstärkten Transkription führt [23] und somit korreliert der Sp1-Spiegel mit der Prognose diverser Krebsarten wie Brustkrebs, Pankreaskrebs, Kolon- und Lungenkarzinomen [15, 24]. Ein weiterer Aspekt in der Sp1-vermittelten Promotoraktivierung ist die Veränderung der DNS-Bindungsaffinität aufgrund von unterschiedlichen Protein-Protein-Interaktionen [12, 25]. Sp1 bindet als Tetramer an seine *Response*-Elemente und kann weitere Proteine bzw. Proteinkomplexe wie Transkriptionsfaktoren oder *Chromatin-remodelling*-Faktoren [12] rekrutieren. Dies kann zur Aktivierung oder Repression der Transkription führen. Sp1 kann sowohl mit Histondeacetylasen (HDAC) wie HDAC1 [26] oder dem repressiven Sin3A HDAC1/HDAC2-Komplex [27], als auch mit der DNMT-1 (DNS-Cytosin-Methyltransferase-1) [28] interagieren und so auf den Chromatinstatus Einfluss nehmen. Daneben gibt es zahlreiche Veröffentlichungen zu Komplexen zwischen Sp1 und unterschiedlichsten Transkriptionsfaktoren wie AP-2 (*Activating protein-2*), NFAT-1 (*Nuclear Factor of activated T-cells-1*), p53, SMAD2-4 (*Sma and Mad related Family 2-4*), YY1 (*Ying Yang1*), Ets-1 (*v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*), c-myc, c-Jun, Egr-1 [15,

29-34], aber auch Interaktionen mit nukleären Rezeptoren wie RXR (*Retinoid-X-receptor*), VDR (*Vitamin-D-receptor*) oder PPAR (*Peroxisom-proliferator-activated-receptor*) [35-37].

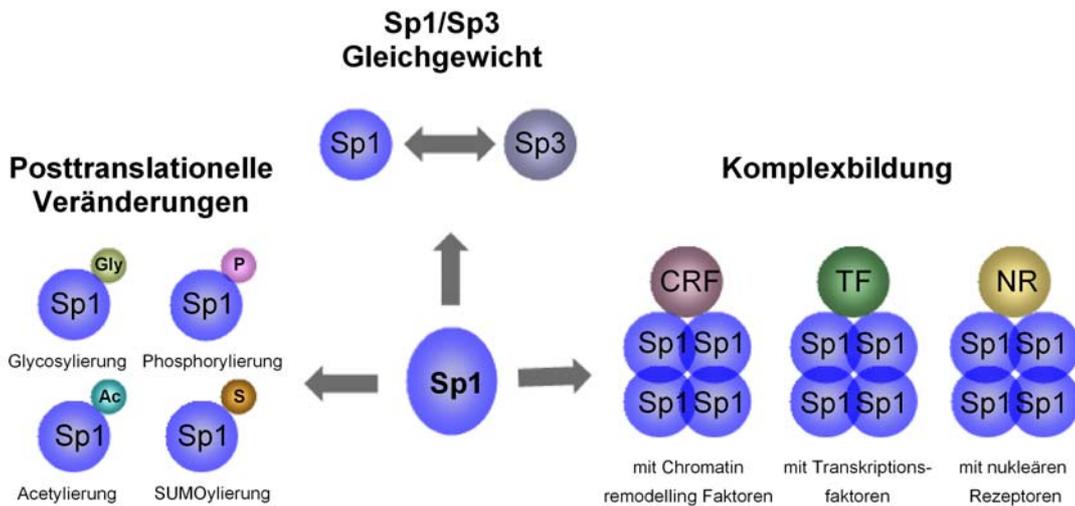


Abbildung 2: Regulation der zellulären Sp1-Aktivität; Die zelluläre Aktivität von Sp1 wird bestimmt durch das Sp1-Sp3 Gleichgewicht, aber auch durch posttranslationale Modifikationen wie Glycosylierung, Phosphorylierung, Acetylierung und SUMOylierung. Des Weiteren kann Sp1 regulative Komplexe mit Transkriptionsfaktoren, nukleären Rezeptoren oder Chromatin-remodelling-Faktoren eingehen.

Das Ausmaß der Aktivität von Sp1 kann weiterhin über posttranslationale Veränderungen wie Acetylierung, SUMOylierung, Glycosylierung und Phosphorylierung beeinflusst werden. Modifikationen durch SUMOs (*small ubiquitin-related modifiers*) wirken auf die Sp1-Proteinstabilität, die Chromatinregulierung sowie die Aktivität von Transkriptionsfaktoren ein [15, 38]. Im Fall von Sp1 wird die Aktivität herabgesetzt und der proteosomale Abbau durch Veränderung der subzellulären Lokalisation gesteigert. Eine weitere Modifikation stellt die Acetylierung von Sp1 durch p300 [39-41] dar, die eine Steigerung der DNS-Bindungsaffinität induziert [42]. Der Sp1-Glycosylierungsstatus wird durch β -N-Acetylglucosamin und N-Acetyl-D-glucosaminidase bestimmt. Er kann durch den verstärkten Abbau nach Hypoglycosylierung repressiven oder auch durch Veränderung der nukleären Lokalisation induktiven Einfluss nehmen [43]. Eine letzte, sehr wichtige regulative posttranslationale Modifikation ist die Phosphorylierung, welche eine Translokation von Sp1 aus dem Zytoplasma in den Zellkern hervorrufen [12] und dadurch die DNS-Bindungsaffinität positiv oder negativ beeinflussen [12, 44, 45] kann. Darüber hinaus kann

phosphoryliertes Sp1 auf das Aktivierungspotential von Transkriptionsfaktoren unabhängig von deren DNS-Bindung einwirken [46, 47]. Vermittelt wird diese Modifikation durch unterschiedliche Kinasen wie CDK (*Cyclin dependend kinase*) [44], ERK (*extracellular signal-related kinase*) [48], MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) [47] und die DNA-PK (*DNA dependend protein kinase*) [45].

1.1.2.3 Weitere Bindungsstellen und *Response*-Elemente im 5-LO-Promotor

Neben den bereits beschriebenen GC-Boxen als Bindungsstellen für Sp1 sind weitere Bindungsstellen im 5-LO-Promotor bekannt. Zum einen für klassische Transkriptionsfaktoren wie Pu.1 (*spleen focus forming virus proviral integration oncogene spi1*), NFAT, NFκB (*nuclear factor kappa B*), AP2, Egr-1 und YY1 aber auch *Response*-Elemente für Vitamin D3, TGFβ (*transforming growth factor-β*) und Smads.

Der Transkriptionsfaktor Pu.1, auch Spi1 genannt, ist ein Mitglied der ETS Familie und wird als Produkt des Protoonkogens sfpi-1 [49] ausschließlich in haemopoetischen Zellen wie Monozyten oder B-Zellen in hohen zellulären Konzentrationen exprimiert [49-52]. Pu.1 reguliert Gene, die mit Prozessen wie Apoptose, Differenzierung, Zellwachstum oder Immunantworten assoziiert sind, beispielsweise die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor*) und M-CSF (*macrophage colony-stimulating-factor*) [53, 54] sowie die Adhäsionsmoleküle CD14 (*cluster of differentiation 14*), CD18 [55] oder CD11b [56]. Allen Pu.1-regulierten Genen gemeinsam ist das Fehlen der TATA-Box in der Promotorregion. Stattdessen befinden sich strangaufwärts des Transkriptionsinitiationsstart (TIS) Pu.1-Bindungsstellen. Diese sehr purinreichen Sequenzen sind vom Typ GGAA und meist in räumlicher Nähe mit anderen Bindungsstellen ubiquitärer Transkriptionsfaktoren wie Sp1, RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*) oder C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) angeordnet. Die N-terminale transaktivierende Domäne von Pu.1 kann mit TBP (*TATA binding protein*) und verschiedensten TAFs (*TATA associated factors*) interagieren und so die basale Transkriptionsmaschinerie wie z.B. TFIID (*TATA box binding factor IID*) rekrutieren [57]. Darüber hinaus konnte eine synergistische Interaktionen zwischen Pu.1 und C/EBP [58-60] oder auch c-Jun und c-fos [61] gezeigt werden.

Ein direkter Nachweis der Bindung von Pu.1 an den 5-LO-Promotor bzw. eine funktionelle Beeinflussung konnte bisher nicht *in vivo* gezeigt werden.

Zu der Familie der NFAT Transkriptionsfaktoren gehören die vier, über Calciumstimulus regulierten Proteine NFAT1-4 und NFAT5, welches über hyperosmotischen Stress induziert wird [62, 63]. Erstmals wurden diese Faktoren in T-Zellen identifiziert [64], neuere Studien zeigen jedoch auch eine Expression in vielen anderen Zelltypen. So findet sich beispielsweise NFAT1 in Mastzellen, NK Zellen, Monozyten und Makrophagen, sowie in neuronalen Zellen, Endothelien, Myozyten, Chondrozyten, Keratinozyten und Adipozyten [65-68]. Sie regulieren zelluläre Vorgänge wie Zellzyklus, Differenzierung, Apoptose oder Tumorgenese über Bindung an Promotor/ Enhancer Regionen von Zytokinen wie IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ (*Interferon- γ*) oder TNF α (*tumor necrosis factor α*), aber auch Proteinen wie CD40L, CDK4 und Cyclooxygenase 2 (COX-2) [69-74]. Strukturell lassen sich die NFAT-Transkriptionsfaktoren in zwei Domänen aufteilen: Die stark konservierte DNS-Bindungsdomäne, die Ähnlichkeiten mit ihrem Analogon der REL (*v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog*)-Familie aufweist [75], und die N-terminale NFAT-Homologie Region [76]. Die DNS-Bindung erfolgt über die 9 bp Konsensussequenz (A/T)GGAAA(A/N)(A/T/C)N und geht oft mit einer Interaktion von AP1 einher [77], die die NFAT-DNS-Interaktion zusätzlich stabilisieren kann. Aktiviert wird NFAT über Calcineurin (*Calcium/Calmodulin activated Serin/Threonin Phosphatase*), welches nach Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels die Dephosphorylierung von NFAT induziert, sodass dieses in den Zellkern transloziert und an die Promotorregionen binden kann [76]. Bisher konnte jedoch keine Regulation der 5-LO-Promotoraktivität durch NFAT gezeigt werden.

NF κ B ist einer der am meisten untersuchtesten Transkriptionsfaktoren, da er in vielfältigen zellulären Regulationsmechanismen involviert ist. Er wird aktiviert durch inflammatorische Stimuli wie LPS, TNF α , IL-1, freien Radikalen, UV Strahlung, virale oder bakterielle Infektion oder auch B- und T-Zellaktivierung [78]. Beeinflusst werden dadurch die Immunantwort, Proliferation und Tumorgenese der Zelle. NF κ B stellt ein Heterodimer dar und kann aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sein: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF κ B1 (p50/p105), NF κ B2 (p52/p100), wobei nur die ersten drei transaktivatorische Aktivität zeigen [79]. NF κ B1 und NF κ B2 sind Precursorproteine und werden nach proteosomalem Abbau aktiv werden. Aufgebaut sind alle NF κ B-Faktoren aus einer N-terminalen Rel-Homologie Domäne (RHD), die sowohl die DNS-

Bindung als auch die Dimerisierung vermittelt. C-terminal befindet sich das nukleäre Lokalisationsignal (NLS), welches die Lokalisation des zytoplasmatischen Proteins bestimmt. In ruhenden Zellen ist NFκB an inhibitorische Proteine, die sogenannten IκBs (*inhibitors of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*), gebunden [80]. Diese tragen eine ankyrin repeat Domäne (ARD) aus 30-33 sich wiederholenden Aminosäuren, über welche sie mit NFκB interagieren und dessen NLS abdecken. Die Aktivierung von NFκB erfolgt über Phosphorylierung der IκB-Einheit durch den IκB-Kinase-Komplex (IKK), die daraufhin vom Ubiquitin-Ligase-Komplex polyubiquitinyliert wird, was zum proteosomalem Abbau führt. Im Anschluss können Coaktivatoren wie CBP/p300 rekrutieren werden, welche durch Histonacetylierung die Transkription zusätzlich steigern können [81, 82]. Die DNS-Bindung erfolgt an Sequenzen der Struktur GGG(A/G)NN(C/T)(C/T)CC oder (A/C/T)GGA(A/G)N(C/T)(C/T)CC und initiiert so die Promotoraktivierung. Ein direkter Nachweis der NFκB-Bindung am 5-LO-Promotor konnte bisher nicht erbracht werden, allerdings wird der Cyclooxygenase-2-Promotor über NFκB reguliert [83]. In vielen Veröffentlichungen ist darüber hinaus eine Beeinflussung der NFκB-Aktivität und -Lokalisation durch Fettsäuren beschrieben. So wird beispielsweise durch Arachidonsäure die NFκB-Aktivität erhöht [84] und durch cPLA₂ (zytosolische Phospholipase A₂)-Inhibitoren vermindert [85].

Zur Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren gehören fünf Proteine: AP-2α, AP-2β, AP-2γ, AP-2δ, AP-2ε [86]. Strukturell bestehen sie aus einer konservierten C-terminalen DNS-Bindungs- und Dimerisierungsdomänen und einer N-terminalen prolin- und glutaminreichen transaktivierenden Domäne [87, 88]. In dieser befinden sich je nach Isoform zumeist PY-Motive (XPPXY) die essentiell für die transkriptionelle Aktivität sind. AP-2 bildet Hetero- und Homodimere, die mit anderen Coaktivatoren oder Transkriptionsfaktoren wie CBP/p300 [89], Sp1 [32], c-myc [90], YY1 [91, 92] oder p53 [93] interagieren können. Die Aktivierung kann über zwei unterschiedliche Wege erfolgen: Zum einen über den Phorbolster-induzierten Proteinkinase C (PKC)-Pathway oder den cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) Pathway [94]. Aber auch Zellstress wie UV-Strahlung oder Sauerstoffradikale führen zur AP-2 Aktivierung [95, 96]. In vielen zellulären und viralen Enhancerregionen erfolgt die DNS-Bindung an palindromischen GC-reichen Sequenzen des Typs GCCNNNGGC [97]. Ebenso können GC-reiche Sequenzen von AP-2 mit niedrigerer Affinität gebunden werden [86]. Reguliert werden so Vorgänge wie Apoptose, Migration, Differenzierung oder Tumorgenese [97-99]. Die Regulierung der 5-Lipoxygenase über AP-2 konnte bislang

noch nicht gezeigt werden, es sind lediglich mögliche Bindungsstellen in der Promotorregion der 5-LO und 15-LO beschrieben [9, 119]. Für andere Enzyme des Fettsäurestoffwechsels wie COX-2 und cPLA₂ hingegen wurde der AP-2 Einfluss nachgewiesen [100].

Egr-1 ist im Unterschied zu NFκB ein Transkriptionsfaktor, der über die Biosynthese reguliert wird. Ohne Stimulation liegen zumeist nur niedrige zelluläre Proteinspiegel vor, die nach Aktivierung der Egr-1 Signalkaskade schnell ansteigen können. Vermittelt wird die Induktion von Egr-1 durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine. Nach dem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels erfolgt die Egr-1 Expression, die von verschiedenen Pathways wie MAPKs, ERK, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) oder p38 beeinflusst wird [101, 102]. Aufgebaut ist das Protein aus der DNS-Bindungsdomäne bestehend aus drei Zinkfingern [103], die GC-reiche Sequenzen binden können, und der N-terminalen transaktiven Domäne [23]. Darüber hinaus gibt es am 5'-Ende der Zinkfinger-Region eine inhibitorische Domäne. Egr-1 kann demnach sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Transkription einwirken. Dies ist unter anderem auch von der Assoziation mit Cofaktoren abhängig, so kann Egr-1 mit CBP/p300 [104] aber auch mit den Corepressoren NAB1/NAB2 (*NGFI-A binding protein*) interagieren [105]. Die Konsensussequenz der DNS-Bindung ist vom Typ TGCG(T/G)(G/A)GG(C/A/T)G(G/T) [106] und ähnelt damit sehr dem Bindungsmotiv der Transkriptionsfaktoren Sp1 oder WT1 (*Wilms tumor 1*) [107]. Diese Motive sind in vielen Promotorregionen vorhanden, so zum Beispiel bei TGFβ [106], M-CSF, PDGF-A/B (*platelet derived growth factor*) [30, 108, 109] oder auch im Egr-1 Promotor selbst [110], was eine positive Rückkopplung bewirkt. Vor allem in Endothelzellen, Myozyten, Monozyten und Makrophagen spielt Egr-1 vermittelte Transkription eine Rolle und greift in Vorgänge wie Entzündung, Wundheilung, Hyperpermeabilität und Apoptose ein [111-113]. Eine Verbindung zu arteriosklerotischen, vaskulären Erkrankungen konnte gezeigt werden [107, 114, 115]. Für den 5-LO-Promotor wurde die Egr-1-Bindung an der Tandem-GC-Box über Gel-Shift-Assays nachgewiesen [5]. Allerdings zeigte sich in Mono Mac 6 Zellen, dass nach Differenzierung mit Vitamin-D und TGFβ die Expression von 5-LO ansteigt, diese Induktion jedoch nicht mit dem zellulären Egr-1 Spiegel korreliert. Eine Induktion der Egr-1 Expression durch PMA resultierte nicht in einer verstärkten Expression der 5-LO. Egr-1 scheint damit, anders als Sp1, die basale Expression der 5-LO zu regulieren [7, 8].

YY1 ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor der GLI-Krüppel like Familie [116]. Er reguliert unter anderem Vorgänge wie Hematopoese, Wachstum, Differenzierung und Zellzyklus [117, 118]. Abhängig von der Zyklusphase ist er im Zellkern (G1) oder im Zytoplasma (S) lokalisiert [119]. YY1 besitzt vier Zinkfinger Motive [118, 120], eine C-terminale repressive und eine N-terminale transaktivierende Domäne und kann damit sowohl als Aktivator als auch als Repressor wirken [118, 121-123]. Zumeist interagiert er mit Coaktivatoren wie CBP oder p300 [124], Co-repressoren wie HDACs [124] oder den Transkriptionsfaktoren AP1, AP-2, Sp1, NFAT, NFκB [29, 73, 91, 92, 125]. Die Konsensussequenz der Bindung ist AGATGGC oder die verkürzten Versionen ACAT bzw. CCAT [126]. Die Transaktivierung kann unabhängig vom Vorhandensein einer TATA-Box ablaufen [29], da YY1 in der Lage ist, das TBP zu ersetzen und TFIIB (*transcription initiation factor IIB*) und die RNS-Polymerase II (RNA Pol II) direkt zu rekrutieren [127, 128]. Im 5-LO-Promotor sind partielle Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors YY1 zu finden, allerdings konnte bisher im Unterschied zu COX-2 keine Regulation gezeigt werden [129].

Neben den hier aufgeführten klassischen Transkriptionsfaktoren kann der 5-LO-Promotor auch über den Vitamin-D Rezeptor, respektive die VDRE (*Vitamin-D Response element*) reguliert werden. Die Synthese des aktiven Vitamin-D-Metaboliten Calcitriol (1,25-Dihydroxy Vitamin-D) als VDR-Ligand, ist ein mehrstufiger Prozess. In der Epidermis wird zunächst aus Cholecalciferol unter UV-Einwirkung 7-Dehydrocholesterol gebildet, welches in der Leber an Position 25 und anschließend in der Niere an Position 1 zum Dihydroxy-Vitamin-D metabolisiert wird. Diese aktive Form kann über Bindung an den nukleären Vitamin-D-Rezeptor regulativ wirken [130]. Daraufhin kommt es zur VDR-Phosphorylierung, was eine Konformationsänderung bewirkt. VDR bildet Heterodimere mit RXR und gleichzeitig kommt es zur Freisetzung von Corepressoren wie NCoR (*nuclear receptor corepressor*), SMRT (*nuclear receptor corepressor 2*) oder HDACs sowie zur Rekrutierung von Coaktivatoren wie SKIP (*SNW domain containing 1 protein*), CREB (*cAMP responsive element binding protein*) oder p300 [36, 131]. Diese Coaktivatoren vermitteln über Beeinflussung des Histonacetylierungsstatus eine Öffnung der Chromatinstruktur, so dass der VDR-Komplex an das VDRE binden kann. Diese hat die Sequenz GGTCANNNGGTCCA. Klassischerweise reguliert Calcitriol die Calciumendokrinologie [132], aber auch Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Die Heterodimere bilden darüber hinaus eine Plattform zur Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren [133], was zur Verknüpfung unterschiedlichster zellulärer Signalwege führen kann. Gut beschrieben ist die synergistische Wirkung von Calcitriol und TGFβ [134,

135]. Für die 5-LO konnte bestätigt werden, dass die Behandlung von Calcitriol und TGF β die Genexpression in myeloiden Zellen während der Differenzierung steigern kann [136]. Die Sequenz des Promotors zeigt einige VDREs sowohl im proximalen als auch im distalen Bereich für die mittels DNaseI-Footprint-Assay eine Bindung von VDR nachgewiesen wurde, wobei das VDRE2 (-2304 bp bis -2287 bp) im Reporter-genassay die höchste Bindungsaffinität zeigt [137]. Weitere 22 VDREs fanden sich in der codierenden Sequenz der 5-LO [138]. Gel-Shift-Assays und Immunopräzipitationen konnten drei VDREs außerhalb des Promotors (Exon10, Exon12, Intron M) verifizieren, die entscheidend für die 5-LO-Expression sind. Nach Calcitriol/TGF β -Behandlung ändert sich der Histon-Code hin zu einem offenen Chromatin mit H4-Acetylierung, H4K20-Monomethylierung und H3K36-Trimethylierung, was dem VDR-Komplex eine Bindung ermöglicht [139]. Die Induktion läuft demnach promotorunabhängig über alternative Mechanismen wie Stabilisierung der Elongation ab.

1.1.2.4 Genregulation durch Histonmodifikation

Die organisierte humane DNS, bezeichnet als Chromatin, bildet eine Nucleosomenstruktur. Je 146 bp umschließen ein Octamer aus zwei Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4. Darüber hinaus bildet das Histonprotein H1 einem Linker, der den Komplex stabilisiert (Abb.3) [140].

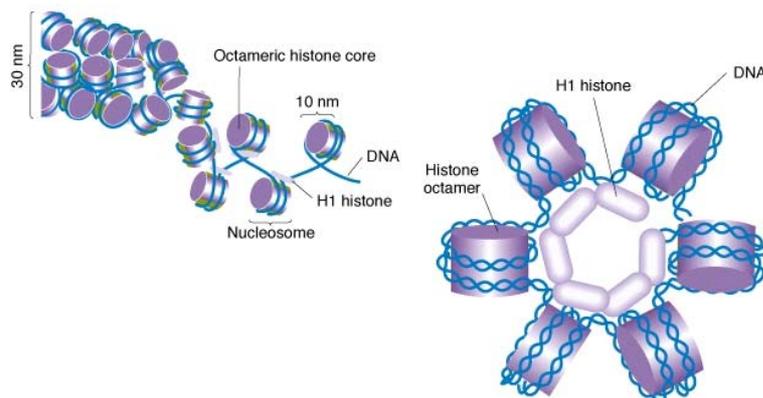


Abbildung 3: Nucleosomale DNS-Organisation [141]; Im Chromatin liegt die DNS um Histonproteine gewickelt vor und bildet so die kleinste Untereinheit, das Nucleosom; 146 bp umschließen dabei ein Octamer aus Histonen, welches über Histon H1 als Linker stabilisiert wird.

Das so organisierte Chromatin kann weitergehend nach transkriptioneller Aktivität in das Eu- und das Heterochromatin unterteilt werden. Das Euchromatin ist transkriptionell aktiv, da hier Transkriptionsfaktoren und der RNS-Polymerase-Komplex binden können, wohingegen man als Heterochromatin die transkriptionell inaktiven Strukturen bezeichnet. Hierzu zählen Regionen wie die Zentromere oder Telomere, die zumeist stark methyliert vorliegen [142]. Die Histone bestehen aus einem globulären Zentrum mit endständigen N-terminalen Lysinresten, die aus der Struktur herausragen. Diese unterliegen verschiedenen posttranslationalen Modifikationen (PTM). Veränderungen entstehen durch Acetylierung [143], Methylierung [144], Ubiquitinylierung [145], Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung, Deimination, Prolin-Isomerisierung und Propionylierung sowie SUMOylierung. Muster für posttranslationale Modifikationen sind bereits für über 60 Histonreste bekannt [146] und durch Mono-, Di- bzw. Trimethylierungen an Lysin- oder Arginin-Resten erhöht sich die Möglichkeit für weitere PTMs. Der resultierende Histoncode bestimmt durch die Kombination der Veränderungen den Status des Genabschnitts [147-150] und reguliert so Prozesse wie Transkription, Replikation und DNS-Reparatur. Eine Übersicht der wichtigsten Modifikationen und ihrer funktionellen Einflüsse auf die Transkription sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die posttranslationale Modifikationen verschiedener Histone nach [151]

Modifikation	Aminosäure	Histon (Position)	Auswirkung	Enzymklasse
Acetylierung	Lysin	H3 (9,14,18,23,56)	Aktivierung	Histonacetyltransferasen (p300/CBP)
		H4 (5,8,12,16)		
		H2A, H2B		
Phosphorylierung	Serin, Threonin	H3 (S19)	Aktivierung	Proteinkinasen (MSK1, MSK2)
		H2A		
		H2B		
Methylierung	Arginin	H3 (17)	Aktivierung	Protein Arginin Methyltransferase (PRMT4)
		H4 (3)		
	Lysin	H3 (4,36,79)	Aktivierung	Histonmethyltransferasen (G9a)
		H3 (9,27)	Repression	
Ubiquitinylierung	Lysin	H2B (120)	Aktivierung	Ubiquitin konjugierende Enzyme (UBCH6)
		H2A (119)	Repression	
		H4 (20)		
SUMOylierung	Lysin	H2B (6/7)	Repression	SUMO konjugierende Enzyme (UBC9)
		H2A (126)		

1.1.2.4.1 Histonacetylierung

Der Acetylierungsstatus der Histone entscheidet über Aktivierung oder Repression der Transkription der betroffenen Gene und wird durch Histonacetyltransferasen (HAT) und HDAC reversibel reguliert. Acetylierung von Histonen führt zu einer Aktivierung der Transkription, da es zu einer Neutralisation der positiv geladenen Lysin-Reste kommt. Dadurch nimmt die Interaktion zwischen den Histonen und der DNS sowie zwischen den Nucleosomen untereinander ab [152, 153] und die Chromatinstruktur wird destabilisiert, sodass der Transkriptionsinitiationskomplex binden kann und Transkription stattfindet.

HATs übertragen vom Substrat Acetyl-CoA den Acetylrest auf das N-terminale Ende der Histon-Lysinreste [154]. Das so entstandene hyperacetylierte Chromatin ist transkriptionell aktiv. Allerdings dienen nicht nur Histone als Empfänger, auch weitere Proteine wie Transkriptionsfaktoren können durch HATs acetyliert werden. Die ubiquitär exprimierte p300/CBP-Gruppe ist der bedeutendste Vertreter der HAT-Familie [155] und reguliert meist als Komplexpartner den Acetylierungsstatus von Histonen, Transkriptionsfaktoren wie Sp1 und Sp3, aber auch mit nukleären Rezeptoren [39, 42, 148].

Deacetylierungen durch HDACs hingegen reduzieren den Abstand zwischen Nucleosom und DNS und führen zu einem geschlossenen Chromatin. Die Familie der HDACs ist in 4 Klassen unterteilt (Tab.2). Alle Enzyme sorgen für die Hypoacetylierung des Chromatins und somit für Repression der Transkription [156]. Klasse I, IIa, IIb und IV sind Zink-abhängige Enzyme [157], während die Klasse III, die sogenannten Sirtuine, Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) als Cofaktor benötigen. Die Lokalisation der einzelnen HDACs ist Typ-abhängig, während zum Beispiel HDAC1 und 2 nur im Zellkern vorkommen wie, liegt HDAC3 sowohl zytosolisch als auch nukleär vor. Die Klasse II hingegen zeigt eine definierte Gewebsspezifität, so sind zum Beispiel HDAC4, 5 und 9 in Herz-, Skelettmuskulatur und Gehirn exprimiert. Die HDACs sind wie die HATs hauptsächlich Partner regulatoriver Komplexe [149], so ist HDAC3 Teil des repressiven SMRT/NCOR-Komplexes [151, 158]. Neben Histonen können HDACs auch weitere Proteine deacetylieren, darunter fallen unter anderem p53, E2F oder MyoD [159].

Tabelle 2: Klassifizierung der Histondeacetylasen nach ihrer Homologie zu Sequenz- und Domänenverwandtschaft nach Gregoretta et. al. [160]

Klasse	Histondeacetylase
I	HDAC1
	HDAC2
	HDAC3
	HDAC8
IIa	HDAC4
	HDAC5
	HDAC7
	HDAC9
IIb	HDAC6
	HDAC10
III	Sirtuine
IV	HDAC11

1.1.2.4.2 Histonmethylierung

Auch Histonmethylierungen beeinflussen die Aktivität der Transkription in repressiver Weise. Im Gegensatz zu den Acetylierungen stellt die Histonmethylierung eine Modifikation der Stickstoffatome in den Seitenketten von Arginin oder Lysin dar [161]. Hauptsächlich betroffen sind die Histone H3 und H4. Katalysiert wird die Methylierung von Arginin durch die Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs), die eine Mono-, Di- oder Trimethylierung induzieren können [162]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Argininmethylierung eine mögliche Rolle in der Genregulierung bei Tumorsuppression spielt [162-164]. Methylierungen an Lysinresten werden durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) katalysiert. Oft sind die methylierten Lysinreste ebenso Targets für Acetylierungen. p300 erkennt H3K4me und acetyliert daraufhin H3 und H4 [165]. Im Unterschied zu Argininmethylierung, die immer zur Aktivierung führt, zeigt die Lysinmethylierung sowohl repressiven als auch aktivierenden Einfluss. Zum Beispiel wird durch H3K9 oder H4K20 eine heterochromatine Struktur erzeugt und H3K4 und H3K36 sorgen für eine Aktivierung der Transkription [166]. Ebenso wie die Acetylierung kann auch die Methylierung revertiert werden, durch die sogenannten Demethylasen wie LSD (*Lysin Demethylase*) [167] oder JMJD (*jumonji-domain-containing Demethylase*) [168], sodass sich auch für diese posttranslationale Modifikation eine dynamische Regulationsmöglichkeit ergibt.

1.1.2.5 Regulation des 5-Lipoxygenase-Promotors durch Histonmodifikationen

Der Promotor der 5-Lipoxygenase kann durch Histonmodifikationen in seiner Aktivität beeinflusst werden. Ein erster Hinweis hierfür war die Veröffentlichung von Koshihara et al. [169], in welcher eine Aktivitätserhöhung nach Inkubation mit n-Butyrat, einem HDAC-Inhibitor [170], gezeigt werden konnte. Eine Korrelation zwischen der HDAC-Inhibition durch den pan-HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TsA) und der 5-LO-Promotoraktivität sowie der mRNA-Expression lieferte 2003 Klan et. al. [171]. Es konnte darüber hinaus durch Mutationsanalysen geklärt werden, dass dieser Effekt hauptsächlich GC4- bzw. GC5-Box abhängig zu sein scheint (1.1.2.1), da durch Deletion dieser Region die Induktion nahezu verloren geht. Chromatinimmunopräzipitationen bestätigten, dass nach TsA-Behandlung Sp1 verstärkt an den proximalen 5-LO-Promotor und Sp3 an die distalen Promotorbereiche rekrutiert wird [9]. Durch Untersuchung selektiver HDAC-Inhibitoren sowie dem gezielten *Knock-down* einzelner HDACs, wurde verdeutlicht, dass die Regulation des 5-LO-Promotors hauptsächlich durch HDAC3, aber auch durch HDAC2, vermittelt wird [172].

1.1.3 Proteinstruktur und Regulation der zellulären Aktivität der 5-Lipoxygenase

1.1.3.1 Struktur der humanen 5-Lipoxygenase

Die humane 5-Lipoxygenase ist ein 78 kDa großes Enzym, welches aus zwei funktionellen Domänen besteht: der N-terminalen regulatorischen Domäne (AS 1-121) und der C-terminalen katalytischen Domäne (AS 121-673) [2, 173, 174]. 2011 wurde die Struktur der humanen 5-Lipoxygenase von Gilbert et al. aufgeklärt (Abb.4) [2].

Die regulatorische Domäne besteht aus acht antiparallelen β -Faltblättern und weist somit Ähnlichkeit zu C2-Domänenstrukturen auf. Über diese Domäne wird die Calcium-abhängige Bindung der 5-LO an die Kernmembran vermittelt. Essentiell sind dafür die Tryptophane W13, W75 und W102 [175] (Abb. 6). Darüber hinaus können Liganden wie Lipide (z.B. Phosphatidylcholin (PC)), zweiwertige Kationen (Calcium, Magnesium) oder Coactosin-like protein (CLP) gebunden werden [176, 177], die sich positiv auf die Aktivität des Enzyms auswirken.

Die katalytische Domäne dagegen besteht aus α -Helices und enthält das aktive Zentrum [174]. In diesem ist ein nicht Häm-Eisen lokalisiert, welches essentiell für die Enzymaktivität ist. Das Eisenatom wird über drei Histidine (372, 367, 550), ein Isoleucin (673) und ein Asparagin (554) in seiner Position verankert [178]. Im inaktiven Zustand liegt Fe^{2+} , im aktiven Fe^{3+} , vor. Die katalytische Aktivität der 5-LO korreliert mit dem Redoxzustand des Eisens [179, 180]. Zellulär kann diese Oxidation durch Lipidhydroperoxide, reaktive Sauerstoffspezies und Glutathionperoxidasen (GPx) beeinflusst werden [181].

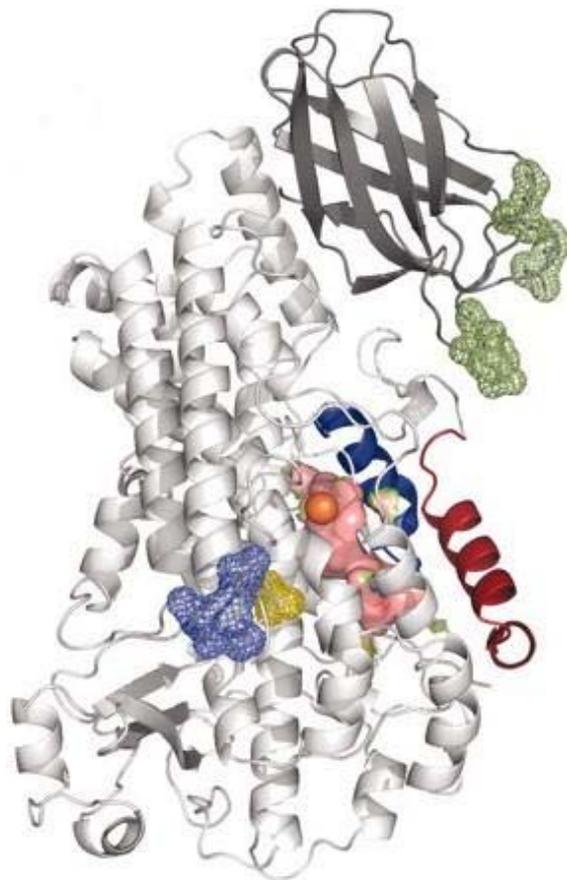


Abbildung 4: Struktur der humanen 5-Lipoxygenase; Dunkelgrau die C2-ähnliche regulatorische Domäne, hellgrau die katalytische Domäne mit dem aktiven Zentrum (rosa) und den nicht Häm-Eisen (orange) aus Gilbert et. al. [2]

1.1.3.2 Leukotrienbiosynthese

Die 5-LO katalysiert die ersten zwei Schritte der Leukotrienbiosynthese. Mittels der Oxygenaseaktivität wird die Arachidonsäure nach Entfernung eines Wasserstoffs am C-7 und Insertion von molekularem Sauerstoff am C-5 zur 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE) oxidiert. Im nächsten Schritt dehydratisiert die 5-LO 5-HPETE zu dem instabilen Epoxid Leukotrien A₄ (LTA₄). Neben der Reaktion zu LTA₄ kann 5-HPETE auch zum korrespondierenden Alkohol 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) durch Glutathionperoxidasen oder auch durch die Pseudoperoxidaseaktivität der 5-LO umgewandelt werden. In einem weiteren Oxidationsschritt bildet sich aus 5-HETE 5-oxo-Eicosatetraensäure (5-oxo-ETE), katalysiert durch 5-Hydroxyeicosanoid Dehydrogenase (5-HEDH) (Abb.5). Das Verhältnis der Bildung von LTA₄ und 5-oxo-ETE ist abhängig von zellulären Faktoren wie z.B. oxidativem Stress [6, 182].

LTA₄ kann im Weiteren je nach Zelltyp zu Leukotrien B₄ (LTB₄) oder zu Cysteinyl-Leukotrienen (CysLT) konvertiert werden. So kommt es in Neutrophilen und Monozyten zur LTB₄-Bildung durch die LTA₄-Hydrolase. LTB₄ ist ein starkes Chemotaktikum für Leukozyten und wird pathogenetisch mit Erkrankungen wie Arteriosklerose in Verbindung gesetzt [183-187].

In eosinophilen und basophilen Granulozyten bzw. Mastzellen dagegen kommt es, vermittelt durch die LTC₄-Synthase, zur Konjugation mit Glutathion. LTC₄ wird über ATP-abhängige Multidrug-resistance Proteine wie MRP1/MRP2 aus der Zelle exportiert [188] und nachfolgend zu LTD₄ und LTE₄ metabolisiert. Zunächst wird der γ -Glutamylrest des Glutathions abgespalten und LTD₄ gebildet. Weitergehend erfolgt die Abspaltung des Glycin zu LTE₄ [182]. Die Gruppe der Cysteinyl-Leukotriene zeichnen sich durch ihre bronchokonstruktive Wirkung und Fähigkeit, die Gefäßpermeabilität zu erhöhen, aus. Des Weiteren stimulieren sie die Mukusproduktion in der Lunge und rekrutieren Phagozyten [189].

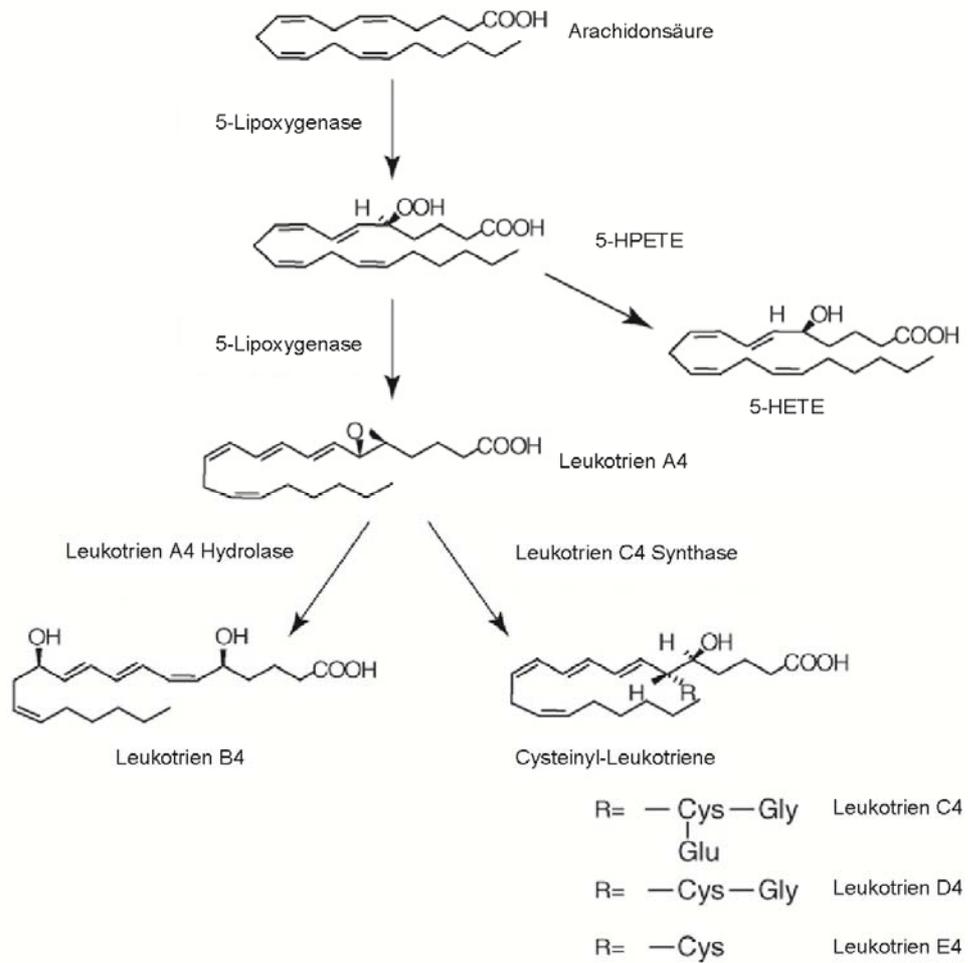


Abbildung 5: Übersicht der Leukotrienbiosynthese nach Radmark et. al. [190]; 5-LO katalysiert die Oxidation von Arachidonsäure zu 5-HPETE, nachfolgend dehydratisiert 5-LO 5-HPETE zum instabilen Epoxid LTA4, welches durch die LTA4-Hydrolase zu LTB4 bzw. durch die LTC4-Synthase zu den Cysteinyl-Leukotrienen umgelagert wird. Anstatt der LTA4-Bildung kann aus 5-HPETE durch Glutathionperoxidasen der korrespondierende Alkohol 5-HETE gebildet werden.

1.1.3.3 5-Lipoxygenase-Expression und Regulation der zellulären Aktivität

Die 5-LO wird trotz ihres Haushaltsgen-verwandten Promotors nicht ubiquitär exprimiert, sondern ist nahezu ausschließlich in Zellen myeloiden Ursprungs zu finden. Darunter fallen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten. Ihre Expression wird durch Reifung bzw. Differenzierung der Zellen verstärkt. 5-LO-mRNS- und Pro-

teinlevel steigen nach Zugabe von Differenzierungs-induzierenden Agenzien wie DMSO, Retinsäure, 1α -25-dihydroxyvitamin-D3 oder TGF β stark an [136, 139, 191].

Die Regulation der Leukotrienbiosynthese bzw. der Aktivität der 5-LO im zellulären Kontext ist von vielen Faktoren abhängig. Der erste begrenzende Schritt ist die zytosolische Phospholipase $A_2\alpha$ (cPLA $_2\alpha$)-vermittelte membranäre Freisetzung der AA (Abb.6).

Die cPLA $_2\alpha$ gehört zur Familie der Phospholipase A_2 -Enzyme. Man unterscheidet die sekretorische PLA $_2$ (sPLA $_2$), zytosolische PLA $_2$ (cPLA $_2$), die Calcium-unabhängige PLA $_2$ (iPLA $_2$) und die lysosomale PLA $_2$ [192]. PLA $_2$ Enzyme katalysieren die Esterhydrolyse von unterschiedlichen Glycerolphospholipiden in zellulären Membranen und generieren so freie Fettsäuren wie Arachidonsäure, Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA) [193]. cPLA $_2\alpha$ wird ubiquitär und konstitutiv in fast allen Zellen und Geweben exprimiert und kann durch Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert werden [194]. Die Aktivität des Enzyms ist darüber hinaus von der intrazellulären Calciumkonzentration, Phosphorylierungen und Lipidmessengern abhängig. Das Enzym besteht ähnlich der 5-LO aus einer N-terminalen C2-Domäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne [194, 195]. Die Bindung von Calcium an die C2-Domäne verstärkt die Translokation an intrazelluläre Membranen und somit die Freisetzung von Arachidonsäure [175, 186]. Unabhängig von Calcium-induzierter Translokation können durch die MAP (*mitogen activated protein*) Kinasen ERK1/2 und p38 Ser-505, durch die CamKII (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) Ser-515 und durch die Mnk-1 (*MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1*) Ser-727 phosphoryliert werden, was die Enzymaktivität steigert [196-199]. Auch anionischen Phospholipide, besonders Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP $_3$) können über Verankerung der cPLA $_2\alpha$ an die Membran Calcium-unabhängig die cPLA $_2\alpha$ Aktivität erhöhen [185-187, 193, 194].

Bei ausreichender Arachidonsäurefreisetzung ist die 5-LO-Aktivität der nächste Parameter, der entscheidend für die Leukotrienbiosynthese ist. Die Regulation der Enzymaktivität ist komplex und in Abbildung 6 schematisch dargestellt. In unstimulierten Zellen liegt die 5-LO im löslichen Kompartiment vor. Abhängig vom Zelltyp kann dies entweder im Zytoplasma (z.B. bei Neutrophilen, Eosinophilen oder Monozyten) oder in Assoziation mit dem Chromatin im Zellkern (z.B. Mastzellen, Langerhanszellen, alveolare Makrophagen) sein [6, 200].

Im Falle der 5-LO sind für die Translokation in den Zellkern drei entscheidende nukleäre Importsequenzen identifiziert worden. Dabei handelt es sich um einen Zusammenschluss basischer Aminosäuren die mit Importinen wechselwirken können und so den Import vermitteln [201-203]. Darüber hinaus gibt es auch eine nukleäre Exportsequenz (NES) [204]. Zusammen bestimmen NLS und NES die Lokalisation der 5-LO. Durch Zytokine, Glycogen oder Zelladhäsion kommt es zum nukleären Transport ohne Beeinflussung der Enzymaktivität [173, 204]. Nach Stimulation der 5-LO transloziert das Enzym zur Kernmembran. Dabei assoziiert zytoplasmatische 5-LO mit dem endoplasmatischen Retikulum und der äußeren Kernmembran und intranukleäre 5-LO mit der inneren Kernmembran [205].

Für die Aktivität sind neben der Lokalisation der Redoxstatus, die Calciumkonzentration, Phosphorylierungsstatus, endogene Diacylglyceride sowie Interaktion mit zellulären Proteinen ausschlaggebend. Wie bereits erwähnt trägt die 5-LO in der katalytischen Domäne im aktiven Zentrum ein Eisenatom, dessen Oxidationsstatus mit der Aktivität des Enzyms korreliert. Demnach verstärken reaktive Sauerstoffspezies die 5-LO-Aktivität wohingegen aktive Glutathionperoxidasen (GPx) inhibierend wirken. In Mono Mac 6 (MM6) Zellen konnte gezeigt werden, dass GPx-1 die Leukotrienbiosynthese reprimiert, in HL-60 Zellen vermittelt dies die GPx-4 [206, 207].

Der zweite aktivitätsbeeinflussende Stimulus ist die Calciumkonzentration. Ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration auf 200-300 nM bewirkt eine Translokation der 5-LO an die Kernmembran. Durch Stimulation mit Calcium Ionophor konnte die Leukotrienbiosynthese stark induziert werden [208]. Aber auch physiologische Calcium-Mobilisierende Agenzien wie fMLP (*N-formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin*), PAF (*platelet-activating factor*), Thapsigargin oder Interleukin-8 wirken aktivierend [209-211].

Neben der essentiellen Calciumbindung kann 5-LO phosphoryliert und damit in seiner Aktivität stimuliert werden. Aktivierende Phosphorylierungen sind dabei die ERK1/2-vermittelte Modifikation von Ser-663 und die über p38 und MK2 (*mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*)-regulierte Aktivierung über Ser-271 [197, 212]. Stimuliert werden diese Phosphorylierungen durch Zellstress oder osmotische Reize; so kann es auch unabhängig vom Anstieg des Calcium-Spiegels zur Veränderung der 5-LO-Aktivität kommen. Die Phosphorylierung des Serinrests 523 über PKA allerdings zeigt eine inhibierende Wirkung. Wahrscheinlich kommt es zu

allosterischen Änderungen und einer Akkumulation im Zytoplasma [213]. Vermittelt wird die PKA-Inhibierung über einen Anstieg der cAMP-Konzentration, ausgelöst beispielsweise durch PGE₂ (Prostaglandin E₂) oder Adenosin. In Neutrophilen führen polyungesättigte Fettsäuren zur Inhibierung des cAMP-Anstiegs und damit zur Aktivierung der 5-LO [211].

Einen weiteren regulativen Einfluss stellen endogene Diacylglyceride (DAG) dar. So steigert 1-Oleyl-2-acetyl-glycerol (OAG) die 5-LO-Aktivität in polymorphonukleären Leukozyten (PMNL) [214]. Die DAGs erleichtern die Assoziation an die Kernmembran und erniedrigen die benötigte Calciumkonzentration für eine Aktivierung. Allerdings sind sie ohne Calciumanstieg nicht in der Lage 5-LO zu stimulieren [215].

Schließlich ist die 5-LO-Regulation abhängig von der Bindung mit zellulären Proteinen. Hier sind vor allem CLP (*Coactosin-like Protein*) und FLAP (*5-lipoxygenase-activating protein*) zu nennen. CLP ist ein zytosolisches Protein, was nach Stimulation nukleär transloziert. Es bindet 5-LO und kann induktiv auf sie einwirken. Der Komplex beider Proteine erleichtert die Bildung von 5-HPETE und 5-HETE, CLP dient hier als Gerüstprotein. Darüber hinaus koordiniert CLP im Komplex mit 5-LO die Membranbindung, was die Leukotriensynthese erleichtert [176, 216, 217]. Ein zweites wichtiges Protein der 5-LO-Kaskade ist FLAP, ein 18 kDa großes Membranprotein, welches zur Familie der MAPEG (*membran associated proteins in eicosanoid and glutathion metabolism*)-Proteine gehört, zu denen auch LTC₄-Synthase mPEG Synthase-1 oder MGST (*microsomal glutathione S-transferase-1,2-3*) zählen [218]. Das Protein ist permanent an der nukleären Zellmembran lokalisiert und kann hier funktionell mit der 5-LO interagieren, indem es Arachidonsäure bindet und so die Substratverfügbarkeit für 5-LO erhöht.

Fasst man die Regulation der 5-LO-Aktivität zusammen, so liegt die inaktive 5-LO im Zytosol oder löslichen Kompartiment des Zellkerns vor. Nach Aktivierung durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration oder durch Phosphorylierung über MAP-Kinasen interagiert die 5-LO mit CLP, wodurch die Bindung an die Membran erleichtert wird. Das Eisen im aktiven Zentrum wird mittels Lipidhydroperoxiden in die aktive Form oxidiert und es kommt zur Translokation des Komplexes zur Kernmembran. Dort setzt cPLA₂α Arachidonsäure frei, welche FLAP-vermittelt der 5-LO als Substrat für die Leukotriensynthese zugeführt wird.

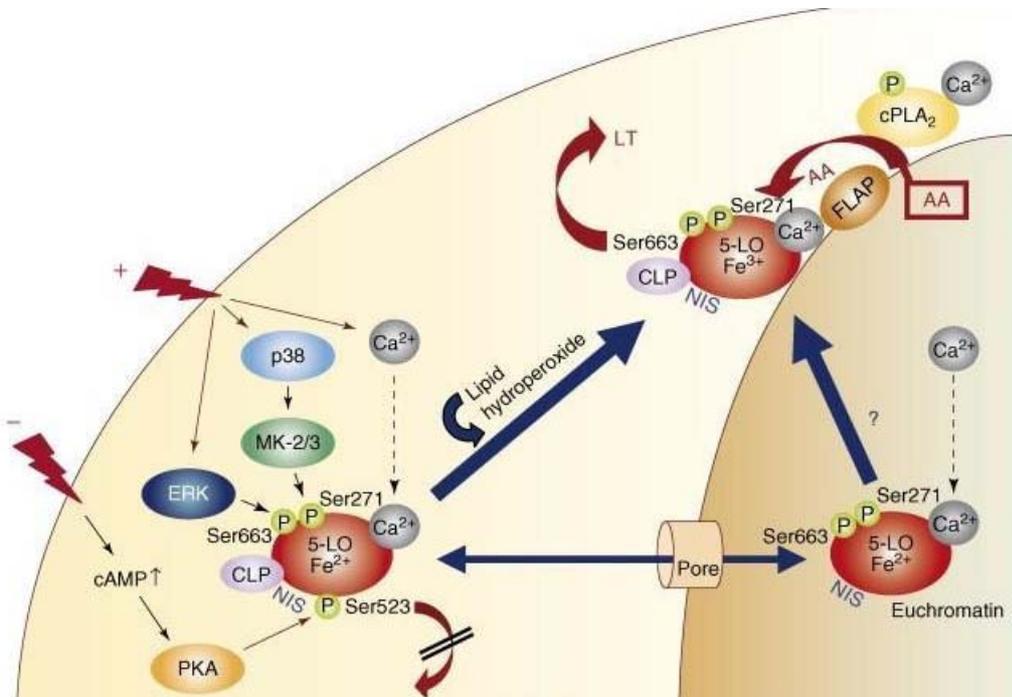


Abbildung 6: Zelluläre Regulation der 5-Lipoxygenase nach Radmark et. al. [6]; In unstimulierten Zellen befindet sich die 5-LO im Zytosol oder im löslichen Kompartiment des Zellkerns. Nach Aktivierung wandert die 5-LO zum Zellkern, wo cPLA₂ verstärkt Arachidonsäure freisetzt, welche die 5-LO FLAP vermittelt bindet. CLP unterstützt dabei die Komplexbildung an der Membran. Induziert werden kann die 5-LO durch Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels und/oder durch Phosphorylierung mittels MAPK.

1.1.4 Pathophysiologische Rolle der Leukotriene

Die Leukotriene vermitteln ihre Wirkung über LT-Rezeptoren. Diese sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren von Rhodopsintyp mit sieben transmembranären Domänen. Sie können G_q-gekoppelt sein und nach Aktivierung die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen, oder G_i-gekoppelt und die cAMP-Konzentration erniedrigen. Leukotrien B₄ kann an den BLT1- oder BLT2-Rezeptor binden. BLT1 ist vorwiegend in Leukozyten exprimiert, findet sich aber in geringer Dichte auch in Milz, Thymus oder Knochenmark. Gebunden wird ausschließlich LTB₄, welches daraufhin chemotaktische Reize auslöst. BLT2 hingegen ist ubiquitär exprimiert und bindet nicht nur LTB₄ sondern auch weitere Eicosanoide wie z.B. 12-HETE und 15-HETE [219, 220].

Neben der Bindung an die klassischen BLT1- und BLT2-Rezeptoren kann LTB₄ auch an den nukleären Rezeptor PPAR α binden und somit in den Lipidstoffwechsel eingreifen [221].

Die Cysteinyl-Leukotriene vermitteln ihre Wirkung ebenfalls über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, CysLT1 und CysLT2. CysLT1 wird in Eosinophilen, Monozyten, Lungenmakrophagen und Endothelzellen exprimiert und bindet vorrangig LTD₄ [222-225]. CysLT2 dagegen bindet eher LTC₄ und LTD₄. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf einen dritten CysLT Rezeptor, der eine Präferenz für LTE₄ zeigt [226]. Die rezeptorvermittelten Wirkungen zwischen LTB₄ und den CysLTs sind unterschiedlich, so aktiviert LTB₄ Granulozyten, Makrophagen und Monozyten und initiiert eine Entzündungsantwort. Leukozyten adhären am Endothelium, degranulieren und schütten lysosomale Enzyme aus, die zur Chemotaxis und nachfolgenden Phagozytose führen. LTB₄ vermittelt so eine wichtige Rolle in der zellulären Immunantwort und fördert die gewebe-spezifische Entzündungsreaktion [187]. Cysteinyl-Leukotriene hingegen sind potente Broncho-konstriktoren der glatten Muskulatur, sie erhöhen die Schleimbildung in den Bronchien, führen zur Zellreifung bei dendritischen Zellen, und fördern die Ödembildung durch Einlagerung von Plasma in Endothelzellen [223, 226, 227].

Die Krankheitsbilder, die mit den Leukotrienen in Verbindung gebracht werden, sind sehr vielfältig. Zunächst ist das Bronchialasthma zu nennen, bei dem hauptsächlich CysLTs an der Pathogenese beteiligt sind. Sie sorgen für die Bronchokonstriktion und Hypersensitivität, regen die Schleimproduktion an und rekrutieren Eosinophile in das Lungengewebe [228]. Versuche mit 5-LO (-/-) Mäuse bestätigen den Einfluss der CysLTs in die Entwicklung von Asthma [226, 227].

Darüber hinaus wird der Einfluss von Leukotrienen in die Entstehung von entzündlichen Hauterkrankungen wie atopischer Dermatitis oder Psoriasis diskutiert. Obwohl Keratinozyten selbst keine 5-LO exprimieren, konnten nach Erkrankung hohe LTA₄-Level nachgewiesen werden, welche durch infiltrierende Leukozyten erklärt werden können [200]. Der Nachweis von erhöhten LTB₄- und CysLT-Spiegeln in psoriatischen Läsionen sprechen ebenfalls für den Einfluss in der Entwicklung dieser Krankheitsbilder [229, 230]. Jedoch zeigte der Einsatz von Inhibitoren der Leukotrienbiosynthese keinerlei therapeutischen Benefit, was gegen die Beteiligung von 5-LO in der Entwicklung von Psoriasis spricht [231].

Auch bei chronisch entzündliche Darmerkrankungen und rheumatoide Arthritis wurden erhöhte Leukotrienspiegeln in der Kolonmukosa [232] und der Synovialflüssigkeit [233] nachgewiesen. Der 5-LO-Pathway ist damit möglicherweise in die Pathogenese involviert.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass bei kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose, Myokardinfarkt, Apoplexie und das Aortenaneurysma die Leukotriensynthese eine wichtige Rolle spielt. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankungen und der LT-Konzentration [224, 227, 234-238]. Die vasokonstriktorische Wirkung sorgt für einen verminderten koronaren Blutfluss, was das Auftreten dieser Krankheiten erhöht [239].

Eine Verbindung zwischen Krebserkrankungen und Leukotrienen konnte ebenfalls bestätigt werden. So zeigen entartete Zellen aus Brust, Gehirn, Lunge, Prostata, Pankreas und Niere einen erhöhten 5-LO-Spiegel, wohingegen in nicht-entarteten Zellen des gleichen Gewebetyps 5-LO nicht exprimiert wird. Die Leukotriene fördern die Proliferation und somit das Überleben von Krebszellen [190]. Auch für die Entwicklung von chronisch myeloiden Leukämie (CML) wird der 5-LO eine bedeutende Rolle zugesprochen, da gezeigt werden konnte, dass bei vorhandener 5-LO-Defizienz die Ausprägung der Krankheit vermindert ist [240].

Zwei weitere Krankheitsbilder die mit inflammatorischen Mediatoren des 5-LO-Pathways in Verbindung gebracht werden konnten, sind Adipositas [241] und Osteoporose. 5-LO-Produkte erhöhen die Calciumfreisetzung und stimulieren die Osteoklasten, was den Knochenabbau fördert. Zusätzlich haben sie eine negativ modulatorische Wirkung auf die Osteoblasten [242, 243].

Als letzten Punkt ist die Involvierung in das körpereigene Immunsystem zu nennen. Die Generierung von Leukotrienen nach Infektion mit Bakterien, Mycobakterien oder auch Viren wie Influenza, EBV oder HCMV sorgen für eine verstärkte Immunabwehr der Krankheitserreger [244-248]. So führt die Zugabe von Leukotrien B4 zu HCMV-infizierten Leukozyten zu einer signifikanten Reduktion des Virustiters [249]. LTB4 zeigt hier neben den inflammatorischen auch antivirale Eigenschaften. Für die murine Form des CMV konnte *in vivo* gezeigt werden, dass LTB4 die Reaktivierung der latenten Infektion unterdrücken kann. In 5-LO defizienten Mäusen wurden nach Infektion deutlich höhere Virustiter im Drüsengewebe gefunden, was die antiviralen Eigenschaften von 5-LO-Produkten bestätigt [250].

1.1.5 Pharmakologische Inhibitoren der 5-Lipoxygenasekaskade

Es existieren unterschiedliche Möglichkeiten um pharmakologisch in die Biosynthese der Leukotriene einzugreifen. Neben der Inhibition von 5-LO-assoziierten Enzymen wie cPLA₂ oder FLAP, scheint die direkte 5-LO-Hemmung über Inhibitoren eine erfolgversprechende Strategie.

Zum einen werden Redoxinhibitoren verwendet, die das Eisen im aktiven Zentrum der 5-LO reduzieren und das Enzym so im inaktiven Zustand halten. Diese Inhibitorenklasse umfasst vor allem lipophile Naturstoffe wie Cumarine, Polyphenole oder auch Flavonoide und zeigt *in vivo* jedoch meist eine schlechte Bioverfügbarkeit sowie aufgrund des unspezifischen Wirkmechanismus hohe Nebenwirkungen wie Methämoglobinbildung [184, 251]. Des Weiteren können chelatbildende Eisenliganden verwendet werden, welche über Komplexierung des Eisens 5-LO inhibitorisch wirken. Hierzu zählen Substanzen mit N-Hydroxylharnstoff oder Hydroxamsäurederivate. In diese Inhibitorklasse fällt der Wirkstoff Zileuton (Zyflo[®]) (Abb.7), der bisher einzige zugelassene 5-LO-Inhibitor [198].

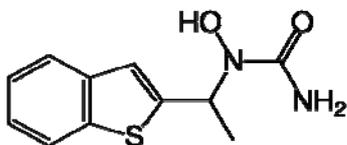


Abbildung 7: Strukturformel Zileuton

Nicht Redoxinhibitoren konkurrieren als kompetitive Inhibitoren mit der Arachidonsäure um die Bindung der 5-LO. In diese Inhibitorklasse fallen Substanzen unterschiedlichste Strukturgruppen wie substituierte Cumarine, Harnstoffderivate, Imidazole oder auch Pyrazole [199]. In neusten Ansätzen wird die Entwicklung von dualen Cyclooxygenase (COX)-/5-LO-Inhibitoren untersucht. Dieser Ansatz ist vielversprechend, da es sich in beiden Fällen um eisenabhängige Redoxenzyme handelt, die Arachidonsäure als Target haben. Dadurch ergeben sich viele Ansatzpunkte um einen effektiven Kombinationsinhibitor zu entwickeln. Da die Cyclooxygenase die Umlagerung von Arachidonsäure in Prostaglandine katalysiert, welche ebenfalls Mediatoren entzündlicher Prozesse sind, würden die antientzündlichen Wirkungen zusätzlich unterdrückt werden. Allerdings ist bisher noch keine Substanz dieses Wirkmechanismus zugelassen [252-254].

Eine weitere Strategie um in die Leukotrien-vermittelte Pathogenese einzugreifen, ist die Hemmung der Bindung von Leukotrienen an deren CysLT-Rezeptoren. Die Substanzklasse der Lukaste wie Montelukast (Singulair[®]), Zafirlukast (Accolate[®]) oder Pranlukast (Ono[®]) werden als Leukotrienantagonisten eingesetzt und haben eine Zulassung für Asthma bronchiale [255] (Abb.8).

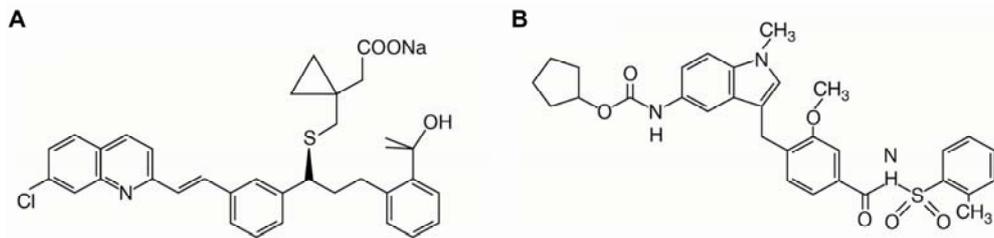


Abbildung 8: Strukturformel Montelukast (A) und Zafirlukast (B)

1.2 Humanes Cytomegalovirus

1.2.1 Strukturelle Eigenschaften des Humanen Cytomegalovirus

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) oder auch humane Herpesvirus 5 zählt zu den doppelsträngigen DNS-(dsDNS)-Viren [256]. Es ist der klassische Vertreter der β -Herpesvirus Familie und zeichnet sich durch einen sehr langen Replikationszyklus von 72 Stunden aus. Nach einer Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang in Zellen myeloiden Ursprungs. HCMV besitzt das größte Genom der Herpesviren mit 235 kb und 165 daraus resultierenden Genen. Der DNS-Kern, eine fibrilläre Proteinmatrix in der das lineare Genom assoziiert ist, wird von einem icosahedralem Nucleocapsid umschlossen. Dieses enthält die, für dsDNS-Viren typische Portal vertex Struktur, eine Pore durch die der DNS-Transport erfolgt. Umgeben wird das Capsid von einer Proteinmatrix, dem sogenannten Tegument. Abgeschlossen wird das etwa 230 nm große Virion mit dem Envelop, einer Lipidbilayerschicht mit diversen viralen Glycoproteinen [257-259] (Abb.9).

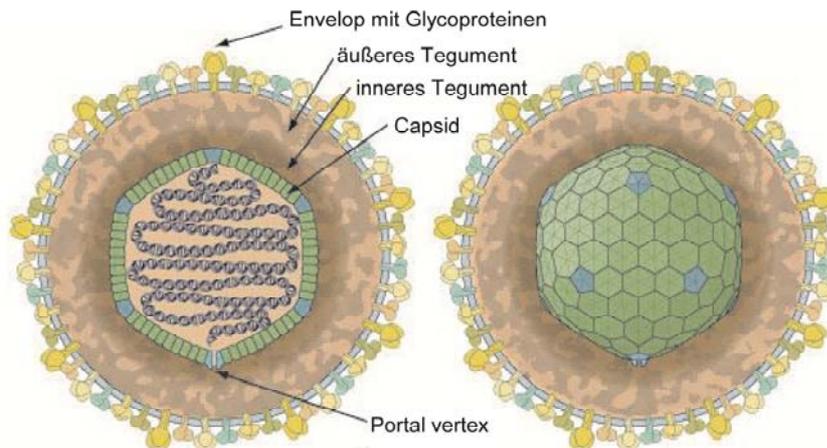


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Cytomegalovirions nach expasy [260]; Das Virion ist aus einem, das Genom umschließenden Capsid umgeben. Zwischen Capsid und Envelop liegt das Tegument, eine Proteinmatrix, die in die innere und äußere Schicht unterschieden werden kann.

Die Übertragung des HCMV kann über Speichel, sexuellen Kontakt, Muttermilch, Blut, Transplantationen oder die Plazenta erfolgen [261]. Die Prävalenz einer HCMV-Infektion steigt mit der Lebensdauer an, so dass im Alter von 50 Jahren bereits 90,8% infiziert sind [262].

Das HCMV war zunächst unter dem Namen *salivary gland virus* (Speicheldrüsen Virus) bekannt und wurde 1960 durch Weller et. al. aufgrund des zytopathischen Effekts infizierter Zellen in Cytomegalovirus umbenannt [263]. Bereits in den 1970ern erkannte man den Zusammenhang zwischen kongenitalen Geburtsschäden [264] wie neurologischen Erkrankungen oder Gehirnschäden und HCMV-Infektion. In den darauffolgenden Jahren, als die Transplantationstechnik und AIDS-Erkrankungen in den Fokus der Medizin rückten, zeigte sich HCMV als opportunistischer Erreger, der mit Immunsuppression einhergeht und bei einer produktiven Infektion eine hohe Morbidität und Mortalität zeigt. Nach einer Primärinfektion, die in immunkompetenten Individuen in der Regel asymptomatisch verläuft, kommt es zu einer lebenslangen Latenz, die durch Schwächung des Immunsystems zu vaskulären [265], chronisch entzündlichen Erkrankungen [266] oder Krebserkrankungen wie dem Glioblastom [267-269] führen kann.

1.2.2 Zelltropismus

Das humane Cytomegalovirus ist in seiner Wirtsspezifität ausschließlich auf den Menschen begrenzt. Hier kommt es jedoch zu einer sehr ausgeprägten Permissivität unterschiedlichster Zell- und Gewebetypen [270]. Ausnahmen zeigten sich bei Lymphozyten und PMNL, die zwar in der Lage sind Virionen aufzunehmen, allerdings im Folgenden keine virale DNS-Synthese unterstützen [271, 272]. In der akuten Infektionsphase kann das Virus in fast jedem Organ nachgewiesen werden. Schwerpunkte bilden die spezialisierten Parenchymzellen von Leber, GI-Trakt, Retina und Gehirn, also die Hepatozyten [273], alveolaren Epithelzellen [271] und neuronale Zellen [274, 275]. Die effektive Virusproduktion findet hauptsächlich in den permissiven Fibroblasten, glatten Muskelzellen sowie Endothel- und Epithelzellen statt [276, 277]. Im Gegensatz dazu wird in undifferenzierten myeloiden Zellen die lytische Transkription unterdrückt und die Latenzphase eingeleitet [278, 279], da diese Zelltypen im undifferenzierten Zustand nicht in der Lage sind die virale Immediate Early (IE) Genexpression zu unterstützen, welche essentiell für den lytischen Replikationszyklus ist. Durch Differenzierung wird dieser Expressionsblock aufgehoben [280-283]. So kann in der monozytären Zelllinie THP-1 nach Induktion der Differenzierung durch

Zugabe von Phorbolestern, eine produktive Virusreplikation stattfinden [284]. Für myeloide Zellen gibt es eine direkte Korrelation zwischen dem Differenzierungsstatus und der Ausprägung der lytischen Virusreplikation. Neuste Untersuchungen haben gezeigt, dass die Regulation der viralen Promotoren und damit die Entscheidung zwischen lytischen Zyklus und Latenzphase abhängig vom Chromatinstatus des jeweiligen Zelltyps ist [1] (s. 1.1.11).

1.2.3 Lytischer Replikationszyklus

In permissiven Zellen, die von HCMV infiziert werden können, kommt es zur Ausbildung des produktiven lytischen Replikationszyklus. Das Virus wird dabei zunächst über eine spezifische Interaktion zwischen Heparansulfatmolekülen der Zytoplasmamembran [285-287] und dem viralen Glycoprotein gp150 [288, 289] in die Zelle aufgenommen und das Capsid sowie das Tegument freigegeben [279, 290-293]. Die Capside lagern sich an die Mikrotubuli an und werden zu den Kernporen transportiert und das Genom schließlich in das Kernplasma entlassen. Dort zirkularisiert die DNS und liegt nun als Episom vor (Abb. 10a).

Die anschließende Expression der viralen Proteine erfolgt über einen dreistufigen, kaskadenartigen Mechanismus: Immediate Early (IE), Early (E) und Late (L) Proteine [294-297] (Abb. 10). Das virale Phosphoprotein pp71 induziert zunächst durch Bindung an AP1 bzw. ATF/CRE (*activating transcription factor*) Bindungsmotive [298] des Major Immediate Early-Promotors (MIEP) und Rekrutierung von zellulärer RNS-Polymerase II die Transkription von Immediate Early-mRNS [299] (Abb. 10b). Diese 5'-gecappten, teilweise gespleißten und polyadenylierten RNS werden im Zytoplasma translatiert. Immediate Early Proteine sind wichtige Transaktivatoren die unter anderem über Histonmodifikationen (1.2.5.2 und 1.2.5.3) die Aktivität der Early und Late-Promotoren regulieren [300-306]. In der zweiten Expressionsphase werden die Early Proteine, vor allem Enzyme und DNS-bindende Polypeptide, die für die Replikation des Virusgenoms essentiell sind, synthetisiert (Abb. 10c). Es folgt die Replikation des Virusgenoms (Abb. 10d). Das Genom des HCMV ist wie das von Herpes-simplex Viren in ein langes (UL) und ein kurzes Segment (US) unterteilt, welche von sich wiederholenden Sequenzen flankiert werden [307-309]. Durch intramolekulare Rekombination können vier Isoformen entstehen [310-313]. Im Zentrum der UL-Region liegt die oriLyt-Sequenz, der Ausgangspunkt der viralen DNS-Synthese. Diese

erfolgt nach dem „*rolling cycle*“-Prinzip. Am Replikationsursprung lagern sich oriLyt-bindende Proteine an, welche den DNS-Polymerase/Helicase/Primase-Komplex rekrutieren. Ein Strang des zirkulären DNS-Moleküls wird am Replikationsursprung geschnitten, am 3'-OH Ende lagert sich die DNS-Polymerase an, deren Sequenz bei allen Herpesviren konserviert ist, und synthetisiert fortlaufend [314, 315]. Der intakte Strang dient als Matrize. Das 5'-Ende löst sich kontinuierlich vom Doppelstrang ab und es entsteht ein viraler DNS-Strang der viele repetitive virale Genome in konkatemerer Anordnung umfasst. Durch Okazaki-Bruchstücke wird er zum Doppelstrang ergänzt und Endonucleasen schneiden die DNS in einzelne Genomkopien [293, 316].

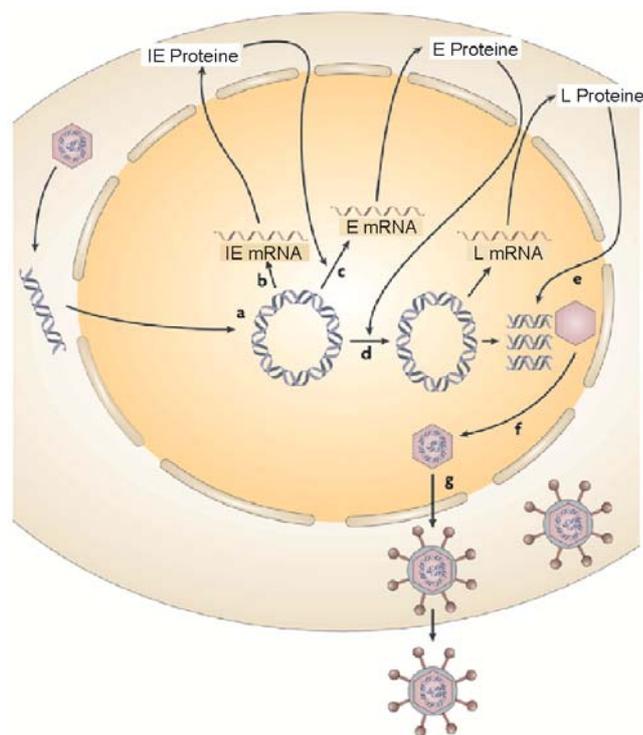


Abbildung 10: Darstellung des lytischen Replikationszyklus nach Knipe et. al. [317]; a) Das virale Genom tritt in die Zelle ein und zirkularisiert b) IE-Genexpression durch Stimulation von pp71 c) IE Proteine werden in den Kern transportiert und aktivieren die E-Promotoren d) DNS-Replikation und Expression von L Proteinen e/f) Zusammenlagerung des viralen Capsids und Assoziierung mit viraler DNS im Kern g) Freisetzung von Virionen aus der Zelle

Zeitgleich mit der viralen DNS-Replikation werden die Late Proteine exprimiert, bei denen es sich hauptsächlich um Strukturproteine wie Glycoproteine handelt. Die Bildung erfolgt am endoplasmatischen Retikulum. Während die Glycoproteine in die Zytoplasmamembran eingelagert

werden, wo sie als körperfremde Polypeptidstrukturen Ziel der zellulären antikörpervermittelten Immunreaktion darstellen, werden die Capsid und Tegumentproteine in den Zellkern transportiert, wo der Zusammenbau von Vorläufervirionen stattfindet.

Zunächst lagern sich die Vorcapside zusammen. An ihren Seitenflächen angelagerte Proteine (UL48) wechselwirken mit Verpackungssignalen der viralen Genome, lokalisiert zwischen den UL- und US-Regionen [318-320], und bewirken eine Einschleusung der DNS, wobei der Doppelstrang durch Endonuclease linearisiert wird. Die Capside binden an die, mit der Kernmembran assoziierten Tegumentproteine, die Membran stülpt sich aus und setzt die tegumentummantelten Capside aus dem Kern frei. Die viralen Partikel sind zu diesem Zeitpunkt mit einer Hülle aus Kernmembranglycoproteinen umgeben, welche darauffolgend mit dem endoplasmatischen Retikulum verschmelzen. Anschließend werden sie in das Zytoplasma freigesetzt und akkumulieren am trans-Golgi-Netzwerk, von wo aus sie unter Ausbildung ihres endgültigen Envelops in das intrazelluläre Membrankompartiment knospen. Nach Reifung zu infektiösen Partikeln durch Modifikation der Glycoproteine des Envelops werden sie zur Zelloberfläche transportiert und freigesetzt. Alternativ kann die Infektion aber auch bei Zellfusionen oder Zell-Zellkontakten über tegumenthaltige Nucleocapside erfolgen [317] (Abb. 10e).

1.2.4 Latenz und Reaktivierung

Wie alle Herpesviren ist auch HCMV in der Lage, nach einer initialen Infektion im Latenzzustand lebenslang zu persistieren [321]. Latenz bezeichnet das Vorhandensein von viraler DNS ohne Nachweis von infektiösen Viruspartikeln. In Unterschied zum lytischen Infektionszyklus liegt die virale DNS hier als extrachromosomales Episom im Kernplasma vor und wird parallel mit dem Zellgenom durch die zelluläre DNS-Polymerase repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Während HCMV in der Primärinfektionsphase in unterschiedlichsten Zelltypen replizieren kann (s. 1.1.6), wird durch die einsetzenden Immunantwort die produktive Virusreplikation kontrolliert und es stellt sich das Latenzstadium ein, das vor allem in Lunge und Milz sowie in undifferenzierten Vorläuferzellen wie CD34+ und Monozyten erhalten bleibt [322-325].

Durch Reaktivierung kann die Latenz überwunden werden und das Virus wieder in den lytischen Zyklus übergehen. Für diesen Regulationsmechanismus gibt es unterschiedliche Ansatzpunkte. Zum einen konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass CMV durch Immunsuppression reaktiviert werden kann [326-329]. Dabei wird angenommen, dass während der Latenz weiterhin infektiöse Viruspartikel gebildet, diese aber durch Immunreaktionen bekämpft und beseitigt werden [328]. Dafür sprechen unter anderem Veröffentlichungen von Bevan et. al. [330] oder Kurz et. al. [331], die während der Latenzphase von murinem CMV IE1-RNS-Expression nachweisen konnten. Konträr dazu konnte Koffron et. al. [332] keine IE1-Transkripte in latent infizierten Zellen detektieren. Es ist bisher nicht geklärt, ob es in der Latenzphase zur Produktion von infektiösen Viruspartikeln kommt, oder ob der Nachweis von IE1-RNS lediglich den ersten Schritt der Reaktivierung widerspiegelt. Ebenso unklar ist, ob die Immunsuppression selbst oder die dadurch freigesetzten entzündlichen Zytokine TNF α und IFN- γ Auslöser der Reaktivierung des latenten Virus sind [333-335].

Ein alternativer Erklärungsansatz für die Reaktivierung von HCMV ist die Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus. So wurde gezeigt, dass die IE1-Genexpression mit dem Differenzierungsgrad myeloider Zellen korreliert [279-281, 284, 322] (s.1.1.6). Durch Differenzierung kann die Blockade des MIEP aufgehoben und die virale Infektion reaktiviert werden [322, 336]. Besonders die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen durch TNF α oder IFN- γ , normalerweise eine entzündliche Immunreaktion, zeigt starke Effekte auf die Reaktivierung [336]. Für diesen regulativen Mechanismus sind vor allem Änderungen im Histonstatus entscheidend (s.1.1.11). Allerdings scheint der Differenzierungsgrad nur in monozytären Zellen relevant zu sein, da latente Formen der Infektion gleichfalls in vollständig ausdifferenzierten Endothelzellen auftreten können.

Auch in Verbindung mit allogenen Immunreaktionen nach Transplantationen wurden Reaktivierungsprozesse von HCMV beobachtet [336-339]. Die allogene Stimulation gleicht in ihrem Verlauf entzündlichen Immunreaktionen [340, 341]. Es kommt zu einer verstärkten Expression der Zytokine TNF α , IL-2 und IFN- γ , die daraufhin Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und AP1 aber auch Chemokine und immunmodulatorische Rezeptoren induzieren [342, 343], was den MIEP aktiviert.

Alle diese Möglichkeiten der Überwindung des Latenzstadiums beinhalten körpereigene Immunreaktion auf entzündliche Prozesse bzw. bilden diese nach. Infolgedessen scheinen Entzündungsprozesse der initiale Auslöser des Übergangs in den lytischen Zyklus zu sein.

1.2.5 Immediate Early Proteine

1.2.5.1 Struktureller Aufbau und Expressionsregulation der Immediate Early Proteine

Für das humane Cytomegalovirus sind vier Genomregionen bekannt, die durch das Tegumentprotein pp71 sehr früh während des Replikationszyklus aktiviert werden. Zum einen der Major Immediate Early-Promotor, der die Expression der beiden Hauptproteine IE1 (UL123) und IE2 (UL122) reguliert, daneben aber auch die Leserahmen UL36/UL37, US3 sowie TRS1/IRS1 (Abb. 11) [344-350].

Der Major Immediate Early-Promotor ist eine Enhancerregion aus kurzen repetitiven Elementen, die durch pp71-vermittelte Bindung von AP1 oder CRE/ATF Faktoren aktiviert werden kann [298]. Außerdem sind Bindungssequenzen für zelluläre Faktoren wie Sp1, Sp3, C/EBP, NFκB oder TFII/TBP bekannt [351-359]. Durch multiple Interaktionen von Transkriptionsfaktoren kommt es zur Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie und zur Rekrutierung der RNS-Polymerase II [360, 361], was die Expression der viralen Proteine IE1 und IE2 fördert [294, 295, 362-364]. Das phosphorylierte Immediate Early 1 Protein ist das mengenmäßig am stärksten gebildete Produkt. Es wird von einer mehrfach gespleißten mRNS aus drei Exons (Exon 2, 3, 4) translatiert und bildet ein 72 kDa großes Protein, das im Zellkern akkumuliert [347, 365-369]. In seiner Funktion als Transaktivator verstärkt IE1 unter anderem die NFκB-Aktivität, worüber es sowohl Promotoren der Early und Late-Gene als auch seinen eigenen Promotor autoregulativ induziert [357, 363]. Neben der Expression von IE1 werden auch IE2 Proteine in unterschiedlichen Spleißvarianten durch MIEP-Aktivierung gebildet [346-348, 370, 371]. Überwiegend wird die 82 kDa Variante von IE2 synthetisiert. Sie entspricht in ihren 85 aminoterminalen Aminosäuren (Exon 2, 3) IE1, carboxyterminal beinhaltet sie jedoch den Leserahmen UL122 (Exon 5) anstatt UL123 (Exon 4). Durch alternative Spleißvorgänge im Exon 5 entsteht das verkürzte, 54 kDa große IE2 Protein [300, 347, 348]. Darüber hinaus kann ein intern im Leserahmen UL122 gelegener Promotor die

Synthese von einem weiteren IE2 Protein induzieren, das lediglich aus Exon 5 besteht und 40 kDa groß ist. Die Hauptaufgabe dieser verkürzten Variante scheint die autoregulative Repression durch Bindung an eine dem Transkriptionsstart vorgelagerte cis-repressive Sequenz (crs) zu sein [372]. Zwar kann auch IE2 (82 kDa) hier binden, doch dieses Protein transaktiviert hauptsächlich in Kombination mit IE1 zelluläre, Early und Late-Promotoren (s.1.1.9.2) (Abb. 11).

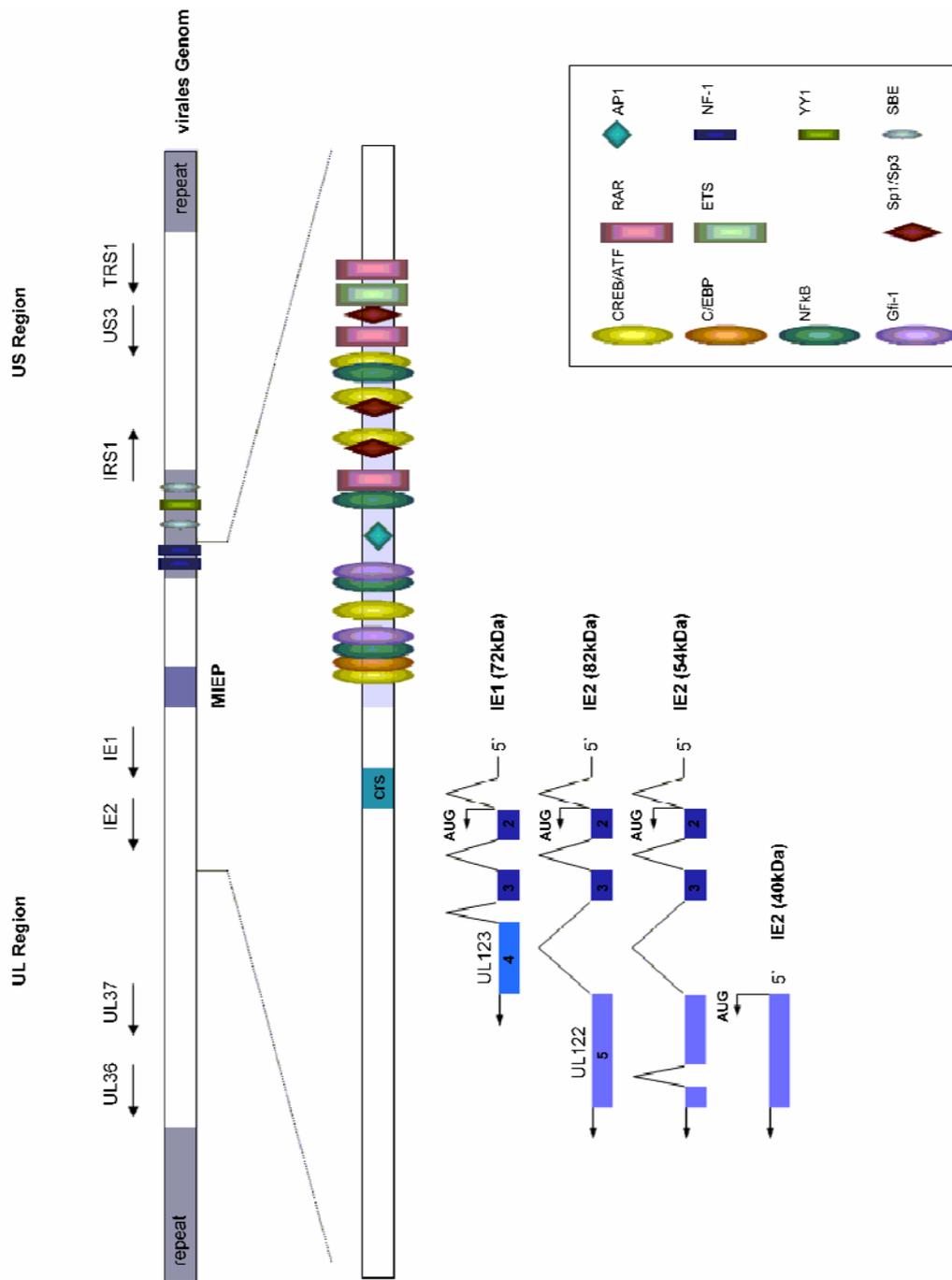


Abbildung 11: Charakterisierung der Transkriptionsfaktor Bindungsstellen im Major Immediate Early-Promotor sowie Struktur der Immediate Early Proteine; Der MIEP reguliert die Expression von IE1, IE2 sowie zwei verkürzten Spleißvarianten von IE2. IE1 und IE2 stimmen in den Exons zwei und drei überein und unterscheiden sich im carboxyterminalen Bereich.

1.2.5.2 Funktionelle und transaktivierende Eigenschaften der Immediate Early Proteine

Die Immediate Early Proteine des humanen Cytomegalovirus sind, wie die meisten Immediate Early Proteine von Herpesviren, Transaktivatoren, die den Ablauf der lytischen Infektion regulieren, indem sie die Expression der Early und Late Gene aktivieren, aber auch modulatorisch auf zelluläre Promotoren und Regulationsprozesse einwirken können [300, 301, 373-376]. Obwohl sie in ihrer Struktur teilweise identisch sind, unterscheiden sich Immediate Early 1 und 2 in ihren funktionellen Domänen und transaktivierenden bzw. reprimierenden Eigenschaften, können aber auch in Kombination synergistische Wirkungen zeigen [302, 305, 306, 377].

Immediate Early 1 besitzt mehrere transaktivierende Domänen im Exon 3 und 4. Prolin- und leucinreiche Sequenzen im aminoterminalen Bereich vermitteln Cyclinmodulationen sowie die Aktivierung von viralen Early beziehungsweise Late Promotoren und damit den sequentiellen Ablauf des lytischen Zyklus [346, 348, 378, 379]. Die universellen Regionen im Exon 4 dienen der Transaktivierung des MIEPs und der Induktion zellulärer Promotoren wie hTERT (*humane Telomerase*), Dihydrofolatreduktase und DNS-Polymerase- α [380-383]. Neben einer Leucin-Zipper- und einer Zinkfinger-Domäne findet sich hier eine ATP-Bindungsstelle [384-386]. Über diese intrinsische Kinaseaktivität kann sowohl Autophosphorylierung als auch Phosphorylierung zellulärer Faktoren wie p107, p130 und E2F-1/2/3 induziert werden [384]. IE1 kann darüber hinaus posttranslational SUMOyliert werden, was seine Funktion hinsichtlich Proteinstabilität, subzellulärer Lokalisation und Genexpression beeinflusst [387, 388].

Das virale Protein kann TATA-reiche und TATA-lose virale und zelluläre Promotoren aktivieren. Zumeist interagiert IE1 hierzu mit IE2 in synergistischer Wirkung, jedoch sind bestimmte Promotoren ausschließlich IE1 induzierbar [305, 344, 350, 374, 376, 389-399]. Vermittelt wird die Aktivierung über die regulative Interaktion von IE1 mit Transkriptionsfaktoren und Histonmodifikatoren. Dabei konnte eine direkte physikalische Interaktion zwischen IE1 und TFIID, E2F, CTF-1 (*cardiotrophin 1*), p107, Rb (*retinoblastoma 1*), hDaxx (*human death-domain associated protein*) sowie Sp1 nachgewiesen werden [383, 387, 400-404]. IE1 selbst ist nicht in der Lage an DNS zu binden, konnte aber am Chromatin lokalisiert werden, was für eine Interaktion mit nukleären Faktoren spricht, die die räumlich Nähe vermitteln [379, 405, 406]. Des Weiteren steigert IE1 die

Expression und Aktivität verschiedenster Transkriptionsfaktoren. Durch Aktivierung von NFκB wird beispielsweise die Induktion des MIEP oder auch des COX-2-Promotors hervorgerufen [363, 407]. Yurochko et. al. konnten zeigen, dass der Promotor der NFκB-Untereinheit p65 aufgrund verstärkter Sp1-Aktivität nach HCMV-Infektion aktiviert wird und so nachgeschaltet der NFκB-Spiegel steigt [401]. Einen weiteren wichtigen Transkriptionsfaktor stellt Sp1 dar, für den neben einer direkten Interaktion mit beiden Immediate Early Proteinen (IEP), ein zweiphasiger Aktivitätsanstieg nach HCMV-Infektion gezeigt werden konnte [387]. In der frühen Immediate Early vermittelten Phase steigt die Konzentration an aktivem, phosphoryliertem Sp1 an und dessen DNS-Bindung nimmt zu. Immediate Early 1 reguliert demnach viele viraler Effekte zellulärer Prozesse über die direkte und Transkriptionsfaktor vermittelte Aktivierung von Promotoren.

Immediate Early 2 unterscheidet sich sowohl strukturell als auch funktionell von IE1. Zwar teilen die beiden viralen Proteine die Exons 2 und 3, in denen die prolin- bzw. leucinreiche Domänen lokalisiert sind, welche essentiell die Aktivierung von Early Promotoren beeinflussen, jedoch besitzt IE2 das vom Leserahmen UL122 codierte Exon 5 anstatt Exon 4. Hier befinden sich Zinkfinger-Regionen und weitere leucinreiche Sequenzen. Mutationsanalysen haben ergeben, dass dieses Exon entscheidend für die transrepressive IE2-Wirkung auf den Major Immediate Early-Promotor ist [305, 306].

Funktionell zeigt IE2 sowohl aktivierende als auch repressive Wirkung auf virale und zelluläre TATA-haltige Promotoren [397]. Das virale Protein und die verkürzte Spleißvariante IE2 (40 kDa) können an ein *crs* im Major Immediate Early-Promotor binden und so auf die eigene Transkription inhibierend einwirken [256]. Aber auch anderer virale oder zelluläre Promotoren wie UL54 oder Cyclin E können IE2 vermittelt sowohl aktiviert als auch reprimiert werden [408]. Dies wird über Bindung mit Transkriptionsfaktoren wie Sp1, Tef-1 (*EA domain family member 1*), c-Jun, Egr-1, E2F, AP1 Interaktionen mit Faktoren der Translationsmaschinerie wie TBP und TFIIB, Co-faktoren wie CBP/p300, P/CAF (*Lysin acetyltransferase 2B*), CREB oder aber auch Rb, p53 und andere virale Proteine wie UL84 als Multiproteinkomplex reguliert [387, 409-419]. Darüber hinaus kann IE2 zelluläre Zytokin und Chemokinrezeptoren inaktivieren und auf die Kontrolle des Zellzyklus einwirken [420-422]. Vermittelt werden die IE2 Regulationen über eine Kombination aus Protein-Protein-Interaktionen und DNS-Bindung, denn im Unterschied zu IE1 konnte für IE2 eine direkte DNS-Bindung nachgewiesen werden [304, 399, 423-428].

1.2.5.3 Funktion der Immediate Early Proteine als Regulatoren des Histoncodes

Viele Herpesviren sind in der Lage über Histonmodifikationen regulativ auf ihren Replikationszyklus einzuwirken [429, 430]. So können auch die Immediate Early Proteine IE1 und IE2 neben ihrer Transkriptionsfaktor-vermittelten induktiven Wirkung auf Promotoren, diese zusätzlich über Interaktionen mit Histondeacetylasen bzw. Histonmethylasen beeinflussen [382, 383, 401, 411, 431]. Das virale Chromatin ist, ebenso wie das humane, teilweise mit Histonen assoziiert und kann durch Modifikationen des Histoncodes in seiner Struktur verändert und damit reguliert werden [432-434] (s. 1.1.10). Nevels et. al. konnten zeigen, dass IE1 die Early-Genexpression über Histonacetylierung reguliert [435]. Die Infektion mit CR208, einer IE1-Mangelmutante des HCMV, führte in niedrigen MOIs (*multiplicity of infection*) zu einer ausgeprägten Verminderung der Genexpression, die durch Zugabe von HDAC-Inhibitoren wie TSA, Natriumbutyrat [436] oder HC-Toxin [437] wieder ausgeglichen werden konnte [438-440]. HDAC-Inhibitoren zeigen keinen stimulatorischen Effekt auf den Wildtyp HCMV, wonach davon ausgegangen werden kann, dass sie die IE1-Funktion in der Mangelmutante kompensieren [435]. IE1, aber auch IE2, fördert die virale Transkription über Antagonisierung der Histondeacetylierung. Vermittelt wird diese Regulation wahrscheinlich über Protein-Protein-Interaktion. Für IE1 konnte *in vivo* eine Bindung an HDAC3 [435], für IE2 an HDAC1/2/3 sowie die Histonmethyltransferase G9a und Suvar(3-9)H1 [441, 442] nachgewiesen werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass HDAC3-Überexpression das Fortschreiten der HCMV-Infektion hemmt [432], was für eine Regulation des MIEP über HDAC3 spricht. Wie diese physikalische Interaktion zwischen HDAC3 und den Immediate Early Proteinen vermittelt wird ist noch ungeklärt. Naheliegend wäre eine Interaktion über die gemeinsamen Domänen in Exon 2 und 3, da sowohl IE1 als auch IE2 gebunden werden können. Alternativ könnten Zinkfinger-Motive, die beide viralen Proteine in ihren universellen Regionen besitzen die Interaktion vermitteln, da HDAC3 im zellulären Kontext über diese Motive mit nukleären Rezeptoren interagiert [158]. Generell kann es sich aber auch um eine indirekte Bindung vermittelt über PML (*promyelocytic leukemia*) handeln. IE1 und HDAC3 sind in der Lage an PML zu binden [92, 443, 444]. Für IE2 sind Interaktionen mit allen drei HDACs der Klasse 1 beschrieben. Während HDAC2 und HDAC3 Inhibition vor allem die Regulation der nachgeschalteten viralen Promotoren regulieren, vermittelt IE2 seinen autorepressiven Effekt auf den MIEP über Inhibition von HDAC1-Aktivität [442]. Die Beeinflussung von HDACs ist demnach eine maßgebliche Regulationsmöglichkeit der viralen Immediate Early Proteine auf ihren lytischen Zyklus, aber auch auf

zelluläre Promotoren [380] Bislang ist noch nicht geklärt, wie die Rekrutierung der HDACs zu den Promotorstrukturen abläuft, da für IE1 zwar eine Interaktion mit ND10 (*nuclear domain 10*)-Bodies oder auch dem Chromatin gezeigt werden konnte, jedoch keine direkte DNS-Bindung stattfindet [379, 443, 445-447]. Da IE1 neben seiner Bindung von HDAC3 auch mit diversen Transkriptionsfaktoren interagieren kann, besteht die Theorie, dass ein Komplex aus Transkriptionsfaktor, viralem Protein und HDAC die Lokalisation an der DNS begründen könnte [435].

1.2.6 Regulation der viralen Genexpression durch epigenetische Mechanismen

Die Regulation der viralen Infektion ist maßgeblich über den Chromatinstatus des viralen Genoms reguliert. Zum einen entscheidet der Differenzierungsgrad der infizierten Zelle über Latenz oder lytische Phase, indem der Major Immediate Early Promotor durch posttranslationale Histonmodifikationen entweder reprimiert oder aktiviert wird [1]. Zum anderen erfolgt die Regulation von Early bzw. Late Promotoren während des lytischen Zyklus über Immediate Early-induziertes Chromatin-remodelling [448]. (s.1.1.9.3)

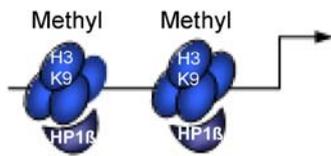
Voraussetzung für eine histonmodifikationsabhängige Regulation ist eine Assoziation des viralen Genoms mit Histonen. In der Veröffentlichung von Nitzsche et. al wurde die Dynamik der Histonbesetzung des Episoms während des lytischen Zyklus von HCMV untersucht [449]. Direkt nach Freisetzung des viralen Genoms in das Kernplasma ist dieses gänzlich frei von Histonen und Proteinen. Mit Fortschreiten der Infektion kommt es jedoch zu einer immer stärkeren Chromatinisierung und die Besetzung mit zellulären Histonen nimmt stetig zu. Am Ende des Replikationszyklus, bevor die Freisetzung neuer Virionen eintritt, liegt das Genom wieder unassoziiert vor. Die Regulation dieses Entpackungsmechanismus ist bislang noch ungeklärt, anzunehmen ist jedoch die Beteiligung von viralen oder zellulären ATP-abhängigen Chromatin-remodelling-Faktoren, welche die DNS-Histon-Interaktion aufheben können [449].

Nach zellulärer Infektion mit HCMV kann es entweder zur viralen Genexpression und damit lytischer Virusreplikation kommen oder die Transkription wird unterdrückt und das Virus geht in die Latenzphase über. Entscheidend dafür, welche Regulation eintritt, ist der Differenzierungsstatus der jeweiligen infizierten Zelle. In undifferenzierten myeloiden Zellen, wie zum Beispiel Monozy-

ten wird die Expression der Immediate Early Proteine durch posttranslationale Veränderungen, der mit dem Major Immediate Early Promotor-assoziierten Histone unterdrückt, sodass keine Aktivierung der Early und Late Promotoren eintreten kann. Das Virus geht in die Latenzphase über [280-282]. Reaktivierung aus der Latenz korreliert mit der Differenzierung und damit der Änderung der Histonmodifikationen. So konnte Taylor-Wiedeman et. al. zeigen, dass infizierte Monozyten keine Immediate Early-RNS aufweisen, aber durch Differenzierung zu Makrophagen in den lytischen Zyklus übergehen können und darauffolgend Immediate Early Proteine exprimierten [322].

Der Block der Immediate Early-Genexpression in undifferenzierten Zellen kommt durch Hemmung des Major Immediate Early-Promotors zustande. Dieser weist neben DNS-Bindungssequenzen für aktivierende Transkriptionsfaktoren wie NFκB, CREB/ATF und AP1 [357, 371, 450, 451] auch Sequenzen repressiver Transkriptionsregulatoren wie YY1 und ERF (*Ets2 repressor factor*) auf [354, 452-454]. Diese Transkriptionsfaktoren vermitteln ihre transkriptionelle Aktivität unter anderem über Rekrutierung von Cofaktoren, die in die Histonmodifikation involviert sind [123, 124, 455]. Die essentielle Beteiligung der Histonmodifikationen konnte durch ChIP (Chromatin Immunopräzipitation)-Experimente in THP-1 gezeigt werden. So ist der Major Immediate Early Promotor im undifferenzierten Zustand mit Silencerproteinen wie HP1 (*heterochromatin protein 1*) assoziiert, im differenzierten Zustand mit acetyliertem H4 [432, 456, 457]. Bestärkt werden diese Ergebnisse durch Veröffentlichungen von Murphy et. al. und Meier et. al., die gezeigt haben, dass die Behandlung von nicht permissiven Zellen mit dem HDAC-Inhibitor TSA die Immediate Early-Genexpression fördert und die Überexpression von HDAC3 die Immediate Early Promotoraktivität reduziert [432, 458]. Die Regulation der Promotoraktivität erfolgt demnach über die Balance von aktivierenden und inhibierenden Transkriptionsfaktoren bzw. deren assoziierter histonmodifizierender Cofaktoren [1] (Abb.12). Während die positiven Regulatoren durch Differenzierung induziert werden, bleibt die zelluläre Konzentration der inhibitorischen Faktoren nahezu unverändert bzw. werden repressive Histonmodifikatoren wie HDAC1 zusätzlich herunterreguliert [117, 455], was zur transkriptioneller Aktivierung des MIEP führt. Der virale Promotor imitiert so in seiner Regulation inflammatorische Gene, die normalerweise bei Differenzierung induziert werden [459].

**Major Immediate Early Promotor
undifferenzierter Status**



**Major Immediate Early Promotor
differenzierter Status**

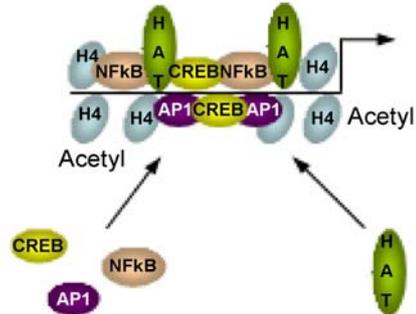


Abbildung 12: Regulation des Major Immediate Early Promotors über Histonmodifikation nach Sinclair et. al. [1]; Im undifferenzierten Zustand ist der MIEP H3K9 methyliert und damit transkriptionell inaktiv, während im differenzierten Zustand H4 acetyliert wird und damit das Chromatin offen vorliegt, sodass Transkriptionsfaktoren binden können.

Neben der Regulation des Major Immediate Early-Promotors durch Differenzierung wird auch die Regulation des lytischen Replikationszyklus maßgeblich von Histonmodifikationen beeinflusst (Abb.13).

Unmittelbar nach der Virusaufnahme in die Zelle assoziiert das virale Herpesgenom mit den ND10-Bodies [460, 461]. Dies sind nukleäre Strukturen mit den Komponenten hDaxx, PML oder ATRX (*alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked protein*), die unter anderem mit histonmodifizierenden Enzymen wie Histondeacetylasen und Methylasen interagieren können [444]. Diese Bindung vermeidet die Immediate Early-Genexpression durch Repression des Major Immediate Early Promotors [462]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl durch *Knock-down* von hDaxx, als auch durch Vorbehandlung der Zellen mit TsA, dieser frühe Schritt der Repression vermieden werden kann [462] und eine ausgeprägtere Immediate Early-Genexpression stattfindet. Diese intrinsische, antivirale Zellantwort scheint ein Grund für den relativ langen Replikationszyklus von HCMV zu sein. Allerdings ist die Ausprägung der Repression abhängig von der MOI. Bei hohen Virusmengen kann der Effekt überwunden werden, was für eine begrenzte Kapazität spricht [463].

Nach Expression der beiden Hauptproteine der Immediate Early Phase IE1 und 2 regulieren diese nachgeordnet die Aktivität von Early bzw. Late Promotoren. Dies erfolgt unter anderem über die Bindung von HDAC1, 2 und 3, die den Acetylierungsstatus der Promotorsequenzen erhöhen und diese transkriptionell aktivieren [381, 441, 464]. In der Veröffentlichung von Cuevas-Bennett et. al. [465] wurde die genaue Veränderung des Histoncodes der unterschiedlichen viralen Promotoren während des lytischen Zyklus untersucht. Man muss generell zwischen Immediate Early Promotoren und den restlichen viralen Promotoren unterscheiden, die in ihrer Regulation deutliche Unterschiede zeigen. Zu Infektionsbeginn ist der MIEP H3K9 hypomethyliert und H3K9 sowie H3K14 hyperacetyliert, während sowohl Early als auch Late Promotoren mit dem repressiven Histonmarkern di-methyl-H3K9 und hypoacetylierten H3 assoziiert sind [466]. Schreitet die Infektion fort in die Late Phase, steigt das Level an H3-Methylierung am MIEP während diese an den restlichen Promotorregionen abnimmt. Die maximalen Expressionslevel der Early und Late Proteine stimmen mit der, durch den Histoncode beeinflussten, transkriptionellen Promotoraktivität, überein. Die Repression des MIEP durch Reduktion des Acetylierungsstatus von H3 wird durch die autoregulatorische Fähigkeit von Immediate Early 2 vermittelt. Dieses bindet an die cis-repression Sequenz (crs) [424, 426] des MIEP, rekrutiert HDAC1 sowie G9a und Suvar(3-9)H1 und blockiert die Transkription [442, 465]. IE2 hat demnach sowohl aktivierende als auch repressive Funktion auf die viralen aber auch auf diverse zelluläre Promotoren über die Bindung bzw. Rekrutierung von histonmodifizierenden Enzymen [381, 435, 441, 442]. Entscheidend für die IE2-Regulation des MIEP ist dabei das Verhältnis zwischen viralem Genom und IE2-Proteinmenge in der Zelle. Zu Beginn der Infektion überwiegt die DNS-Menge, bei Expression der IEPs werden immer mehr crs-Sequenzen blockiert, der Promotor hypoacetyliert und damit inhibiert. Die transaktivierende Regulation anderer viraler und zellulärer Promotoren über IE2 erfolgt über dessen Fähigkeit, Histonacetyltransferasen zu binden und so die H3-Acetylierung zu erhöhen [467, 468].

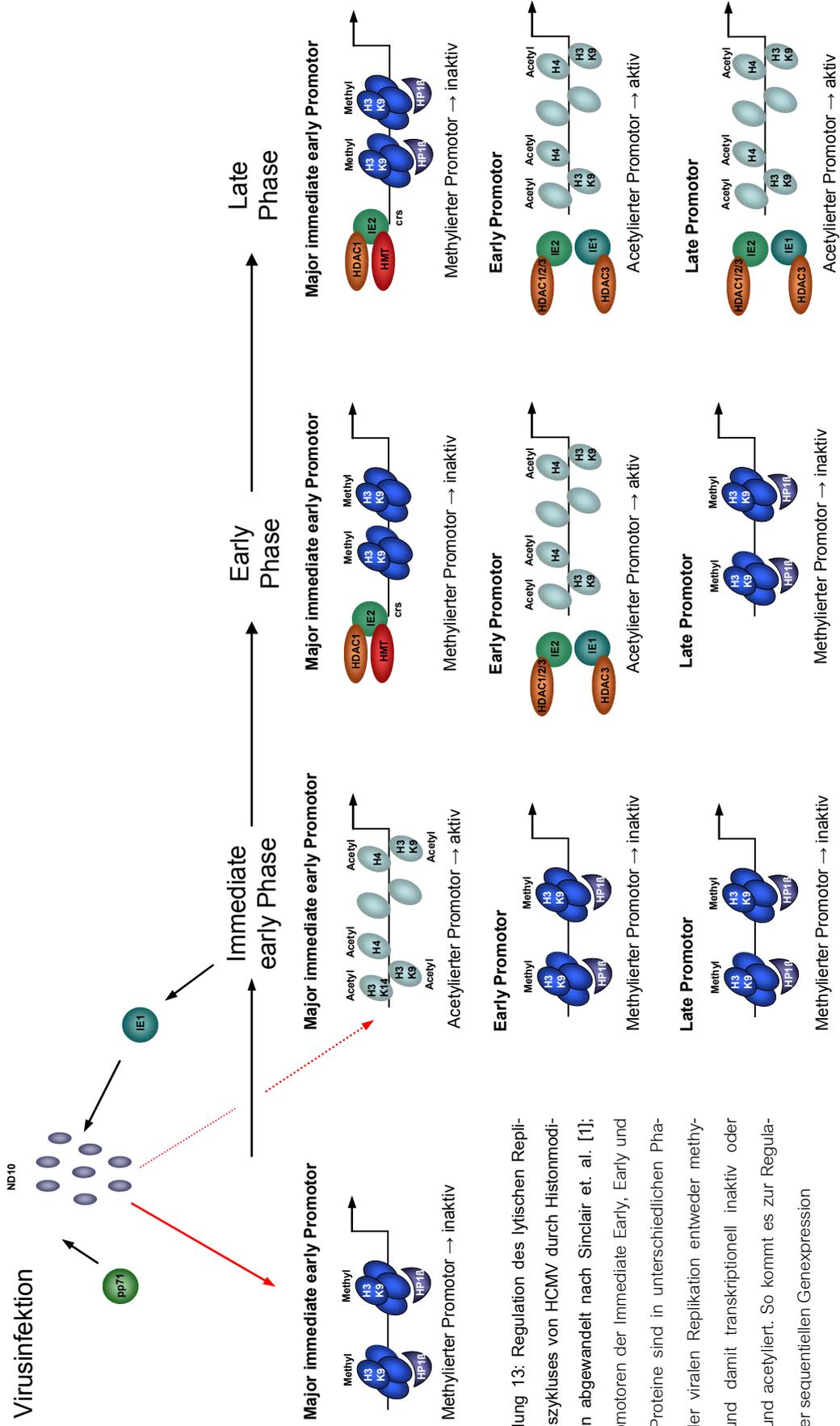


Abbildung 13: Regulation des lytischen Replikationszykluses von HCMV durch Histonmodifikation abgewandelt nach Sinclair et. al. [1]; In Promotoren der Immediate Early, Early und Late Proteine sind in unterschiedlichen Phasen der viralen Replikation entweder methyliert und damit transkriptionell inaktiv oder aktiv und acetyliert. So kommt es zur Regulation der sequentiellen Genexpression

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Mechanismus zwischen selektiver positiver und inhibitorischer Promotorregulation essentiell für die sequentielle Genexpression des HCMV ist. Nach Eintritt des viralen Genoms in den Zellkern wird es mit Histonen assoziiert und zunächst an ND10-Bodies gebunden, die als initiale zelluläre Antwort das virale Genom über Histonmodifikationen wie Methylierungen transkriptionell inaktivieren. Bei einer bestimmten Viruskonzentration wird dieser Mechanismus überwunden, H3 im MIEP hyperacetyliert und hypomethyliert, woraufhin Transkriptionsfaktoren, HATs und Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie rekrutiert werden und die Transkription beginnt. Zur gleichen Zeit sind die Early und Late Promotoren hypoacetyliert und hypermethyliert, sodass keine Rekrutierung erfolgen kann und sie inaktiv sind. Akkumulieren die Immediate Early Proteine, interagieren diese physikalisch und funktionell mit histonmodifizierenden Enzymen. IE1 inhibiert die HDAC-Aktivität [464] und IE2 rekrutiert u.a. HATs [381] um die Early und Late Promotoren zu aktivieren. Der MIEP ist zu diesem Zeitpunkt durch die autoregulative Repression über IE2 inhibiert. Am Ende des Replikationszyklus kommt es vor dem Zusammenbau neuer Virionen zur Entfernung der assoziierten Histone über einen bislang noch nicht geklärten Mechanismus.

1.2.7 Beeinflussung zellulärer Kinasen und Wachstumsfaktoren durch HCMV

Zelluläre Kinasewege spielen eine essentielle Rolle in der Regulation des lytischen Zyklus, aber auch in der Ausbildung inflammatorischer Symptome durch Induktion von beispielsweise COX-2. Daran beteiligt sind unterschiedlichste Kinasen, die im Zusammenhang mit der viralen Infektion in ihrer Aktivität beeinflusst werden können.

Proteinkinase A und C sind bekannt als Aktivatoren des Major Immediate Early Promotors [469, 470]. Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zur Aktivierung dieser Kinasewege, woraufhin CREB, an cAMP-Response-Elemente zellulärer Promotoren bindet und diese transaktivieren kann. Kristoffersen et. al. [471] konnten zeigen, dass die Aktivität dieser Kinasen im frühen Infektionsstadium ansteigt, jedoch ohne dass dabei ihre Expression erhöht wird. Des Weiteren ist PKC essentiell am Transport der Viren in die Zelle bzw. der Capside aus dem Kern beteiligt. Nach HCMV-Infektion verstärkt sich die PKC- und Tyrosinkinase-vermittelte Phosphorylierung zellulärer Membranrezeptoren über die die Virusaufnahme erfolgt [472]. Auch für die

Ausschleusung der neugebildeten Capside aus dem Kern ist eine lokale Destabilisierung durch Lamin-Phosphorylierung notwendig, die durch einen Multiproteinkomplex aus den viralen Proteinen UL50/UL53 und PKC induziert wird [473, 474]. Im Unterschied zu den membranregulatorischen Eigenschaften von PKC, konnte für PKA eine Phosphorylierung von IE2 nachgewiesen werden, die dessen DNS-Bindungs Kapazität vermindert [475].

Den Proteinkinasen A und C vorgeschaltet ist die PI3K (*phosphoinositide-3-kinase*), eine phosphorylierende Kinase, die darüber hinaus auch Akt und NFκB aktivieren kann [476-480]. Unmittelbar nach Infektion mit HCMV kommt durch Bindung viraler Glycoproteine an zelluläre Rezeptoren zu einem starken Anstieg der PI3K-Aktivität durch Phosphorylierung der p86-Untereinheit [401, 481, 482]. Die Kinaseaktivität ist essentiell an der Expression von Major Immediate Early Proteinen beteiligt und wird wiederum von ihnen verstärkt, was zu einem zweiten Aktivitätsmaximum etwa 4 Stunden nach der Infektion führt [482]. Die PI3K-nachgeschalteten Signalwege führen über NFκB und Akt (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) zu einer Erhöhung von Mcl-1 (*myeloid cell leukemia sequence 1*), einem Protein der Bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) Familie, welches antiapoptotische Wirkung zeigt [483]. Darüber hinaus zeigt HCMV auch direkte Transaktivierung von NFκB durch Erhöhung des mRNA-Spiegels sowie Homo- und Heterodimerbildung, was die Apoptose zusätzlich unterdrückt [484-486]. Die Aktivierung von PI3K durch HCMV führt also zu einem Apoptoseblock kurz nach Infektion, was den ersten Schritt zur Ausbildung des Latenzstadiums darstellt [483].

Auch die Familie der MAP-Kinasen wird durch HCMV-Infektion beeinflusst. Zu ihr zählen ERK1/2, JNK und p38, welche über eine dreistufige Phosphorylierungskaskade aktiviert werden. Die MEKK phosphoryliert die MEK bzw. MKK (*mitogen-activated protein kinase kinase*), welche daraufhin die MAPK aktiviert [487, 488]. Diese phosphoryliert nachgeschaltet eine Vielzahl von zellulären Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression steigern [82, 489, 490]. Für HCMV konnte eine Aktivierung von ERK1/2 und p38 gezeigt werden [491, 492]. ERK1/2 wird sehr schnell nach der viralen Anlagerung und in einer zweiten Phase 8-48 Stunden nach Infektion stimuliert [493]. Über die Aktivierung von ERK können AP1, Elk-1, CREB und SAP1α (*prosaposin α*) phosphoryliert werden, welche unter anderem an der Regulation des Zellwachstums beteiligt sind. HCMV-Infektion vermittelt via ERK antiapoptotische Effekte über Bcl-2 [494]. Die Stimulation der Kinase erfolgt über Inhibition der inaktivierenden Phosphatasen wie DUSP6/MKP3 (*dual*

specificity phosphatase 6 / MAP kinase specific phosphatase 3), sodass ERK länger im phosphoryliertem Zustand bleibt und darauffolgend die Transkriptionsfaktoren AP1 und CREB zelluläre und virale Promotoren aktivieren kann [396, 409, 492, 495-499]. Diese Inhibition wird wahrscheinlich über Immediate Early Proteine vermittelt, da UV-inaktiviertes, replikationsdefizientes Virus keine Erhöhung der Kinaseaktivität zeigt [492]. ERK kann die Immediate Early Proteine IE1 und IE2 *in vitro* direkt phosphorylieren, was deren Promotorbindung positiv beeinflusst [500]. Yi et al. [501] zeigten für die COX-2 eine ERK-vermittelte aber Immediate Early Protein unabhängige Induktion nach Infektion über welche die entzündliche Symptomatik mediiert wird. Ein weiterer regulativer Mechanismus an dem der ERK-Pathways beteiligt ist, ist die Reaktivierung aus der Latenz. Differenzierung von latent infizierten Zellen mittels TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat*) induziert unter anderem über ERK-Aktivierung den Übergang in die lytische, produktive Virusreplikation [284]. Im Unterschied dazu zeigt die Inhibition von p38 keinen Einfluss auf die virale Genexpression, sondern reguliert eher zelluläre Mechanismen [502]. Auch für p38 sind zwei Aktivitätsmaxima nach Infektion zu beobachten. In der frühen Phase kommt es zur Induktion von p38 über Inhibition der Dephosphorylierung, in der späten Phase wird die Aktivität der vorgeschalteten MKK3/6 erhöht [491]. Regulativ wirkt p38 unter anderem auf HSP27 (*heat shock protein*) und Rb. HSP27 ist ein Chaperon, welches die Faltung, die Translokation und die Komplexbildung von Proteinen unterstützt [503]. Nach HCMV-Infektion kommt es p38 induziert zur HSP27-Aktivierung und damit zur Generierung einer zellulären Umgebung, welche die Permissivität des Virus erhöht und Apoptose unterdrückt. Rb ist ein zellulärer Regulator, der mit Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie interagieren kann und essentielle Enzyme der DNS-Replikation wie HDACs oder RNS-Polymerase II rekrutiert [504-507]. HCMV fördert durch Hyperphosphorylierung von Rb über p38 die virale DNS-Replikation. Es konnte auch eine direkte Bindung von IE2 an Rb gezeigt werden, die diesen Prozess zusätzlich unterstützt und auch unabhängig von der Phosphorylierung E2F aktivieren kann [508]. Die Veröffentlichungen zur Interaktion zwischen HCMV und JNK sind hingegen widersprüchlich. Wang et. al [509] und Dou et. al. [510] konnten eine Aktivierung der JNK nach Infektion zeigen. Diese wird durch ein synergistisches Zusammenwirken von IE1 und MEKK1 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) hervorgerufen, was nachgeordnet zur Aktivierung des JNK- und ERK-Signalweg führt. JNK phosphoryliert die c-Jun Untereinheit von AP1 und fördert so die Genexpression [511]. Allerdings führt aktive JNK zur Inhibition des antiapoptotischen Bcl-2 und Aktivierung des proapoptotischen BH3-Proteins, was verstärkten Zelltod hervorruft [512, 513]. Die Gruppe um Xuan

et. al. [514] dagegen hat eine, durch das virale Immediate Early Protein pUL38 vermittelte, Unterdrückung der JNK-Phosphorylierung veröffentlicht, die entsprechend antiapoptotisch wirkt [515]. Die Regulation scheint damit von unterschiedlichen viralen Proteinen in verschiedenster Weise beeinflusst zu sein.

Auch die Regulation des Zellzyklus ist durch HCMV-Infektion maßgeblich beeinflusst. So aktiviert und induziert das Virus die Expression vieler Wirtsproteine, um eine zelluläre Umgebung zu erzeugen, die ideal für seine Genexpression und DNS-Replikation ist. Hierbei spielen die Aktivität von CDKs und die Unterdrückung der DNS-Replikation der Wirtszelle eine wichtige Rolle [516]. Der Übergang der einzelnen Phasen des Zellzyklus wird von CDKs und Cyclinen bestimmt [517, 518]. In der G₀/G₁ Phase kommt es zur exzessiven Expression von Immediate Early Proteinen [519, 520]. Dabei fördern CDK7 und CDK9 die virale Transkription durch Hyperphosphorylierung der RNS-Polymerase II [521, 522]. In späteren Phasen der viralen Replikation sorgen CDK2 und CDK9 für posttranslationale Modifikation und nukleäre Lokalisation viraler Proteine wie UL69 und UL83. CDKs sind maßgeblich für die Akkumulation und Prozessierung viraler Proteine verantwortlich [523, 524]. Durch Hemmung der CDK-Aktivität mit Inhibitoren wie z.B. Roscovitin kommt es zur kompletten Unterdrückung der HCMV-Replikation [525]. Des Weiteren inhibiert HCMV CDK-vermittelt die Wirtszellreplikation. Zelluläre Pre-Replikationskomplexe werden nicht gebildet [516], die DNS-Synthese schreitet nicht voran, Chromosomsegregation und Zytokinese werden geblockt [526-529]. Die Zelle verweilt aufgrund einer viral induzierten Dysregulation der zellulären Cyclinlevel in einer Pseudo-G₁ Phase [526]. Der Zellzyklus kontrolliert demnach entscheidend die virale Replikation. Dieser Aspekt ist auch entscheidend für den Übergang zwischen Latenzphase und lytischem Zyklus. Ein Zusammenhang zwischen p53-Aktivierung nach beispielsweise Entzündungsprozessen und Regulation der Aktivität nachgeordneter CDKs konnte gezeigt werden [530].

Für viele Herpesviren ist bekannt, dass sie nach der Infektion proentzündliche und prokoagulierende Veränderungen hervorrufen können [531]. Auch das humane Cytomegalovirus ist in der Lage, durch Induktion von Wachstumsfaktorrezeptoren vor allem Erkrankungen wie Arteriosklerose und Vaskulopathien hervorzurufen. So konnten in glatten Muskelzellen aus Plaques der Koronararterien virale Nukleinsäuren und Antikörper nachgewiesen werden [532]. Es scheint unterschiedliche Regulationsmöglichkeiten für die Induktion der Rezeptorexpression zu geben.

Für VEGF (*vascular endothelial growth factor*) konnte gezeigt werden, dass sowohl ein virales Strukturprotein, als auch ein im lytischen Zyklus synthetisiertes Protein, für die Regulation verantwortlich sind [533]. Mechanistisch erfolgt die Induktion zumindest teilweise Sp1-vermittelt über Promotoraktivierung. VEGF reguliert vaskuläre Permeabilität und Integrität, sowie Angiogenese und Neovaskularisierung [534-536]. Bei erhöhten Spiegeln kommt es zur Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Chemotaxis von Monozyten, was nachfolgend die Entzündung unterstützt [537, 538]. Ebenso konnte für PDGF (*platelet-derived growth factor*) eine verstärkte Aktivierung nach HCMV-Infektion gezeigt werden [539]. Durch Immediate Early Proteine wird der PDGFR- β (*platelet-derived growth factor receptor β*) in Zellen der glatten Muskulatur stärker exprimiert [540], was ebenfalls Chemotaxis stimuliert und zu einer erhöhten Zellmigration führt, dieses begünstigt Progression von Artherosklerose und Restenosen [536, 541-543]. Ob die Regulation wie bei VEGF promotorvermittelt oder posttranskriptional erfolgt ist bislang nicht geklärt. Generell finden sich erhöhte PDGF-Konzentrationen in arteriosklerotischen Läsionen [544-546]. Durch Aktivierung der Synthese von Wachstumsfaktoren bzw. ihrer verstärkten Rezeptorexpression begünstigt die HCMV-Infektion demnach die Entstehung arteriosklerotischer Erkrankungen, welche aufgrund ihres entzündlichen Charakters dem Virus die lytischen Replikation beziehungsweise Reaktivierung aus der Latenz ermöglichen.

1.2.8 HCMV assoziierte Erkrankungen

Die Infektion mit dem HCMV ist vor allem mit entzündlichen, vaskulären, aber auch Tumor- und Autoimmunerkrankungen verknüpft. Generell benötigt das Virus eine Immunsystemaktivierung um aus dem Latenzstatus zu reaktivieren, welche im Folgenden die Krankheitssymptome hervorruft. Im immunkompetenten Patienten bildet sich nach der asymptomatischen Primärinfektion eine lebenslange Latenz aus, wobei das Virus hauptsächlich in undifferenzierten Zellen wie Monozyten persistiert. Nach Reaktivierung durch entzündliche Prozesse kommt es in immunsupprimierten Patienten, also klassischerweise nach Organtransplantationen oder Ausbruch von AIDS, zur Ausprägung der Folgesymptomatik. Hierzu zählen akute Symptome wie Fieber, Leukopenie, Hepatitis, Pneumonie oder Retinitis aber auch Langzeitschäden durch Arteriosklerose oder Restenose [542, 547, 548]. Des Weiteren gibt es eine Verknüpfung zwischen HCMV-Infektion und Autoimmunerkrankungen, so konnten in psoriatischen Plaques, aber auch in Zel-

len entzündlicher Gefäßerkrankungen, erhöhte Viruskonzentrationen nachgewiesen werden [549]. Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematosus und das Sjögren-Syndrom sind weitere Autoimmunerkrankungen, deren Pathogenese von der HCMV-Infektion abhängig zu sein scheint [266]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit atopischer Dermatitis und Sepsis eine HCMV-Reaktivierung aus der Latenzphase möglich ist, was durch die Aktivierung des MIEP durch erhöhte NF κ B-Spiegel zu begründen ist [550, 551] (s.1.1.2.5). Eine aktive HCMV-Infektion fördert weiterhin eine existierende Immunsuppression und erhöht so das Risiko für opportunistische bakterielle und Pilzinfektionen [552, 553]. Ein zusätzlicher Formenkreis an Erkrankungen der mit HCMV assoziiert ist, sind Krebserkrankungen vor allem des Kolons, der Prostata oder Glioblastome [267, 554, 555]. Als weitere Langzeiterkrankung ist noch Diabetes Typ 1 zu nennen. Die virale Infektion führt hierbei über direkte β -Zelllyse und Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen zum Fortschreiten der Erkrankung [556, 557].

Neben den bereits erwähnten Krankheitsbildern, die durch Reaktivierung des Virus durch Immunsystemaktivierung hervorgerufen werden, zeigt das HCMV auch pathogene Auswirkungen auf die Fötusentwicklung. Kommt es während der Schwangerschaft zur Infektion, muss mit schweren Geburtsschäden wie Taubheit oder geistiger Retardierung gerechnet werden [558]. Kongenitale Infektionen mit HCMV stellt heute noch die häufigste Ursache für intrauterine Infektionen dar [559].

Generell lassen sich demnach die HCMV-assoziierten Erkrankungen in kongenitale Infektionsfolgen und in entzündliche Erkrankungen in Folge von Immunsystemaktivierungen unterteilen. Die aktive Virusinfektion fördert dabei durch regulative Prozesse wie Apoptose, Migration, Angiogenese oder Beeinflussung des Zellzyklus zur Ausprägung der Symptomatik [560].

2 ZIEL DER ARBEIT

Ziel der Arbeit war es, die von Qiu et. al. [248] in vaskulären Zellen der glatten Muskulatur beschriebenen Effekte der 5-Lipoxygenase-Induktion durch HCMV-Infektion auf eine eventuelle Zellspezifität zu untersuchen. Hierzu wurde das Zellsystem der HFF gewählt und die Regulation der 5-LO auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen.

Ein zweiter Schwerpunkt lag in der detaillierten Aufklärung des induktiven Effektes. Das verantwortliche virale Protein sollte identifiziert und der zugrundeliegende Mechanismus näher charakterisiert werden. Besonders die promotorvermittelte Induktion stand im Fokus der Untersuchungen. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass die Regulation der 5-LO von verschiedensten Faktoren bestimmt wird. Hierzu zählen epigenetische Einflüsse wie der Acetylierungszustand der assoziierten Histonproteine [9, 139, 171] und die DNS-Methylierung [561], aber auch die Bindung verschiedenster Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sp1 oder Egr-1 [7] beeinflussen die Promotoraktivität.

Im Laufe der Arbeit sollte, darauf Bezug nehmend, abgeklärt werden, ob der durch das humane Cytomegalovirus ausgelöste induktive Effekt über einen dieser Regulationswege abläuft.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zelllinien und Zellkultur

Humane Vorhaut-Fibroblasten (HFF) wurden aus einem Isolat eines gesunden Spenders gewonnen (Universitätsklinikum Frankfurt/Main) und freundlicherweise vom Arbeitskreis Prof. Dr. Jindrich Cinatl jr. (Institut für Med. Mikrobiologie, Virologie & Infektionsepidemiologie des Universitätsklinikums Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte für 13 Passagen in DMEM-HAM's F12 supplementiert mit 10% FCS (v/v), 0,4 mM Glutamin, 2 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und einer gesättigten 5% CO₂ Atmosphäre.

Die Kultivierung von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T) (ATCC CRL-11268™) erfolgte in DMEM mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂.

Die humane monozytäre Zelllinie Mono Mac 6 (MM6) wurde in RPMI1640 mit 10% FCS, 2mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 10µg/ml Insulin, 1mM Oxalacetat, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 1% nicht essentiellen Aminosäuren bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

HT-29, eine humane Kolonadenomzellen, wurde über ATCC bezogen (ATCC HTB-38™). Das verwendete Wachstumsmedium beinhaltete DMEM-HAM's F12 supplementiert mit 10% FCS (v/v), 0,4 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Humane PMNL wurden aus Leukozyten-Konzentraten frisch isoliert. Die Konzentrate wurden vom Markus-Krankenhaus in Frankfurt zur Verfügung gestellt. 40 ml der 1:1 mit PBS verdünnten Konzentrate wurden mit 10 ml einer 10%igen Dextran / PBS-Lösung gemischt, 30 Minuten sedimentiert und die Erythrozyten abgetrennt. 10 ml Nycoprep-Dichtegradientenmedium wurde mit den Überständen überschichtet und bei einer Drehzahl von 800 rpm 10 Minuten bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml PBS (4°C) resuspendiert und erneut bei einer Drehzahl von 300 rpm für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml MilliQ (4°C) aufgenommen. Die hypotonen Lyse der Erythrozyten wurde exakt nach 45 Sekunden durch Zugabe von 40 ml PBS (RT) gestoppt. Nun zentrifugieren (200 rpm, 10

Minuten, RT), das Pellet mit PBS waschen und nochmals lysieren. Nach erneuter Zentrifugation (200 rpm, 10 Minuten, RT) wird das Pellet in PBS/Glucose (1 mg/ml) resuspendiert.

3.2 Inkubationsreagenzien

Eingesetzt wurden Foscarnet als Inhibitor der viralen DNS-Polymerase (Fa. Sigma Aldrich, Cat. No.79510), gelöst in DMEM HAM'S F12 zu einer Endkonzentration von 5 mM sowie der DNS-abhängige Proteinkinase-Inhibitor Wortmannin (Fa. Sigma Aldrich, Cat. No. W3144) in DMSO.

Des Weiteren fand ein Proteinkinase-Inhibitor-Screening (Screening Set, Fa. Proteinkinase.de, Cat. No. PKI-SCREENSET-500) mit den Substanzen Apigenin, Chelerythrine, H-8, PD169316, Roscovitin, SL327, SP600125, SU4312, SU6656, Triciribine (alle gelöst in DMSO) sowie Lithiumchlorid, gelöst in MilliQ, statt. Dabei wurden unterschiedliche Endkonzentrationen verwendet.

Der DNS-Interkalator Mithramycin (Fa. Sigma Aldrich, Cat. No. M6891), gelöst in DMSO, wurde als Hemmstoff der Sp1-Bindung an die GC-Boxen des 5-LO-Promotors eingesetzt.

3.3 Viren

3.3.1 Humane Cytomegalovirus-Stamm AD169

Der humane Cytomegalovirus-Stamm AD169 wurde initial über ATCC bezogen (VR-538) und freundlicherweise vom Arbeitskreises Prof. Dr. Jindrich Cinatl jr. (Institut für Med. Mikrobiologie, Virologie & Infektionsepidemiologie des Universitätsklinikums Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt.

3.3.2 Humane Cytomegalovirus-Stamm Towne und CR208

Die humanen Cytomegaloviren-Stämme Towne und CR208 wurden netterweise von Prof. Dr. Michael Nevels (Institut für Infektionskrankheiten, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt.

3.4 Viruskultivierung

Anzucht und Kultivierung des HCMV-Stamms AD169 erfolgte in HFF. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% mit dem Virus (MOI 1) infiziert. Das Virus wurde über 14 Tage kultiviert und in regelmäßigen Abständen der zytopathische Effekt kontrolliert. Gewonnen wurde das Virus aus dem Zellüberstand durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 Minuten und anschließender Ultrazentrifugation bei 19000 rpm für 2 ½ Stunden. Das Pellet wurde in 1/10 der ursprünglichen Medienmenge resuspendiert und titriert.

Die Virusstämme Towne und CR208 wurden als vortitrierte Virusaliquots von der Universität Regensburg Arbeitskreis Prof. Dr. Michael Nevels erhalten.

3.5 Virustitration und Aminoethylcarbazol-Färbung

Zur Titration des Virus wurden HFF mit unterschiedlichen Verdünnungen des Virusstocks infiziert, für 24 Stunden wachsen gelassen und anschließend die Virusproteinkonzentration mittels AEC (3-Amino-5-Ethylcarbazol)-Färbung bestimmt. Dazu wurden die infizierten Zellen mit vorgekühltem Aceton/Methanol (40/60, v/v) für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach folgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C mit Blocking Solution (20 mM Tris-HCl pH 7,45, 200 mM NaCl, 0,01% Thiomersal, 0,2% Tween 20, 2% BSA, 5% Goat Serum) um unspezifische Bindungen abzudecken. Anschließend erfolgte die Zugabe der primären Antikörper gegen das Immediate Early Protein 1 (Cytomegalovirus (CMV), 76 kDa immediate early antigen, Fa. Biotrend, Cat. No. BT-24-7056-04; Verdünnung 1:7000 mit Waschpuffer) bzw. das Late Protein Glycoprotein B (gB) (CMV gB, Fa. Gene Tex Inc, Cat. No. GTX40783; Verdünnung 1:100 mit Waschpuffer) und eine Inkubation für weitere 30 Minuten bei 37°C. Die Antikörperlösung wurde im Folgenden abgenommen und die Zellen dreimal mit Waschpuffer (20mM Tris-HCl pH 7,45, 200mM NaCl, 1g/l BSA, 0,01% Thiomersal, 0,2% Tween 20) gewaschen, bevor 30 Minuten bei 37°C mit dem sekundären Antikörper (Biotin-SP-conjugated Affini Pure F(ab')₂ Fragment Goat anti-mouse IgG (H+L), 115-066-062, Fa. Jackson Immuno Research; Verdünnung 1:1000 mit Waschpuffer) inkubiert wurde. Die Antikörperlösung wurde verworfen und erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Beendigung der Antikörperinkubationen wurden die Zellen für 60 Minuten bei

37°C mit Streptavidin-Peroxidase (Streptavidin-Peroxidase-Conjugat, Fa. Calbiochem, Cat. No. 189733, Verdünnung 1:3000 mit Waschpuffer) versetzt und erneut dreimal gewaschen. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von AEC-Substanzlösung (5mM 3-Amino-5-Ethylcarbazol, 30% N-N-Dimethylformamid in Acetat-Puffer pH 5) und Wasserstoffperoxid initiiert. Die Färbelösung wurde nach kurzer Einwirkzeit abgeschüttelt und die gefärbten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

3.6 Plasmide

3.6.1 5-LO-Reporterkonstrukte

Die für den Reporterkonstrukte beinhalten Fragmente des 5-LO-Promotors. Das Konstrukt pN10 umfasst -844bp bis -12bp, pN11 -295bp bis -12bp, pN12 -205bp bis -12bp und pN13 -142bp bis -12bp bezogen auf ATG. Des Weiteren wurden verschiedene GC-Box-Mutanten getestet, basierend auf pN10 und pN13. Mittels *site-directed* Mutagenese der Region -133bp bis -188bp wird die GC4-Box-Mutante und -78bp bis -83bp die GC5-Box-Mutation erzeugt [9].

3.6.2 Expressionsplasmide

Die Expressionsplasmide einzelner Cytomegalovirus-Proteine basieren auf pCGN und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Nevels (Institut für Infektionskrankheiten, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Sie codieren für die Proteine IE86 (Gene ID: 3077563), UL69 (Gene ID: 3077513), pp65 (Gene ID: 3077513), pp71 (Gene ID: 3077530) [562], pp150 (Gene ID: 3077422), UL48 (Gene ID: 3077504) und IE72 (Gene ID: 3077513) [435].

3.6.3 Kontrollplasmide

Als Kontrollplasmide für den Reporterassay wurden pGL3basic (Fa. Promega Cat. No. E1751) und pRL-SV40 (Fa. Promega Cat. No. E2231) verwendet.

3.7 Plasmidpreparationen

Für die Transfektion benötigte Mengen Plasmid-DNS wurden in SURE[®] competent cells (Fa. Stratagene, Cat.No.200238) exprimiert und als Mini- bzw. Maxi-Preparation aufgereinigt (GenE-lute[™] Plasmid Miniprep Kit, Fa. Sigma Aldrich, PLN350-1KT; NucleoBond xtra Maxi, Fa. Macherey-Nagel, Cat. No. 740414.10).

3.8 Klonierung von Immediate Early Deletionsplasmiden

3.8.1 Deletionsmutanten der viralen Proteine IE1 und IE2

Um den durch Immediate Early 1 (IE1)-vermittelten Effekt auf den 5-LO-Promotor näher zu charakterisieren, wurden unterschiedliche Deletionsmutanten für die Überexpression in humanen Zellen erzeugt. Die Generierung der Mutanten erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wobei pCGN-IE1 als Template fungierte. Die verwendeten Primer sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3: Klonierungsprimer der pCGN-basierten Deletionsmutanten

Plasmid	Deletion	<i>Forward</i> Primer (5'-3')	<i>Reverse</i> Primer (5'-3')
pCGN-IE1 Δ ATP	509-605 bp	ACGAATTCGGATCCATGGAGTCCTC TGCCAAGAG (Part1) CGAATTCGATGAACTTAGG (Part2)	CGAATTCCTCCTTAATACA (Part1) ACGAATTCGGATCCATCCTGATTAGTG GGATCCATAACAGTAAC (Part2)
pCGN-IE1 Δ Exon2-3	1-258 bp	ACGAATTCGGATCCATGCTCGTCAA ACAGATT	ACGAATTCGGATCCATCCTGATTAGTG GGATCCATAACAGTAAC
pCGN-IE1 Δ Exon4	259-1477 bp	ACGAATTCGGATCCATGGAGTCCTC TGCCAAGAG	ACGAATTCGGATCCTGATATTCTGCC AGGACATC

Das Insert für pCGN-IE1 Δ ATP besteht aus zwei PCR-Fragmenten, die zunächst mit EcoRI verdaut und anschließend ligiert wurden. Das so erhaltene Insert sowie die weiteren PCR-Produkte der anderen Deletionsmutanten wurden nach Verdau mit BamHI in die entsprechende Schnittstelle des Zielvektors pCGN inkloniert.

3.8.2 Bakterielle Expressionsplasmide der viralen Deletionsmutanten

Für die Proteinexpression der viralen Proteine Immediate Early 1 (IE1), Immediate Early 2 (IE2) und Immediate Early 1 Exon 2-3 (IE1 Δ Exon4) wurden die jeweiligen Sequenzen in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-5X-1 (Product Code 28-9545-53, Fa. GE Healthcare Life Science) kloniert. Dazu wurde analog zu den pCGN-Konstrukten eine PCR mit pCGN-IE1 bzw. pCGN-IE2 als Template durchgeführt. Es wurden für die Generierung der Inserts die in Tabelle 4 aufgeführten Primer verwendet.

Tabelle 4: Klonierungsprimer der pGEX-basierten Expressionsplasmide

Plasmid	Deletion	<i>Forward Primer (5'-3')</i>	<i>Reverse Primer (5'-3')</i>
pGEX-IE1		ACGAATTCGGATCCTCGAGTCCTC TGCCAAGAG	ACGAATTCTCGAGTTACTGGTCAGCCTTGC TTCTAGTACCAT
pGEX-IE2		ACGAATTCGGATCCTCGAGTCCTC TGCCAAGAG	ACGAATTGCGGCCGCTTACTGAGATTTGTT CCTCAGGTCCTGGA
pGEX-IE1 Δ Exon4	259-1477 bp	ACGAATTCGGATCCTCGAGTCCTC TGCCAAGAG	ACGAATTCCTCGAGTGATTATTCTGCCAGG ACATC

Die so erhaltenen PCR-Fragmente werden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (BamHI / XhoI für IE1 und IE1 Δ Exon4, BamHI / NotI für IE2) und in den zuvor geschnittenen pGEX Vektor einligiert.

3.9 Transfektionen

3.9.1 Lipofektamin-Transfektion von humanen Vorhaut-Fibroblasten

24 Stunden vor Transfektion wurden HFF ausgesät, sodass die Konfluenz am Transfektionstag 70-80% betrug. Die genaue Zellzahl richtete sich nach der Wachstumsfläche (Tab. 5). Die Aussaat erfolgte in Indikator- und Antibiotika-freiem DMEM HAM'S F12 (s. 3.1). Zur Transfektion wurde Lipofektamin™ LTX with PLUS™ Reagent (Fa. Invitrogen, Cat. No. A12621) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet, die transfizierte DNS-Menge ist ebenfalls in Tabelle 5 aufgeführt. 16 Stunden nach Transfektion fand ein Medienwechsel zu Vollnährmedium statt.

Tabelle 5: DNS und Zellmengen für Lipofektamintransfektion von humanen Vorhaut-Fibroblasten

Transfektionsansatz	Wachstumsfläche	Ausgesäte Zellzahl	Transfizierte DNS-Menge
24-well Platte	1,9cm ² pro well	6x10 ⁴ pro well	1,5 µg Reporterplasmid 0,05 µg Kontrollplasmid 0,1875 µg Expressionsplasmid
Zellkulturflasche	175cm ²	5,5x10 ⁶	220µg

3.9.2 Calciumphosphat-Transfektion von HEK293T-Zellen

24 Stunden vor Transfektion wurden 4x10⁴ Zellen pro well in einer 24-well-Platte ausgesät. Für die Transfektion wurde ein DNS-Mix der jeweiligen Plasmide entsprechend der Gesamt DNS-Menge von 20 µg pro well pipettiert. Es erfolgte die Zugabe von 2,5 M sterilfiltrierter CaCl₂-Lösung, bevor unter konstanter Luftzufuhr die langsame Zugabe zu 2xHeBS Puffer (28 M NaCl, 5 M HEPES, 120 mM Na₂HPO₄; pH 7,05) erfolgte. Anschließend wurde das entstandene Präzipitat auf die Zellen verteilt und weitere 16 Stunden bei 37°C 5% CO₂ inkubiert. Danach erfolgte ein Medienwechsel zu Vollnährmedium.

3.10 Reportergenassay

Zur Messung des Reportergenassays wurde das Dual-Glo[®] Luciferase Assay System der Firma Promega (Cat. No. E2920) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Messung der Lumineszenz von Firefly und Renilla Luciferase fand, falls nicht anders vermerkt, 84 Stunden nach Transfektion unter Zuhilfenahme des Tecan infinite[®] M200 (Fa. Tecan Group Ltd.) statt. Als Berechnungsgrundlage dienten relative Lumineszenzeinheiten (RLUs) berechnet aus Firefly Lumineszenz geteilt durch Renilla Lumineszenz als interner Standard.

3.11 Infektionsversuche mit HCMV AD169 und CR208

Für die Infektionsversuche mit HCMV AD169 bzw. CR208 wurden unterschiedliche Viruskonzentrationen eingesetzt. Die Endkonzentration wird in *multiplicity of infection* (MOI) angegeben. Eine MOI von 2 entspricht einem 1:2 Verhältnis zwischen Zellen und infektiösen Viruspartikeln. Die Infektion erfolgte durch Zugabe der Viruslösung zum Zellmedium.

3.12 UV-Inaktivierung des Virus bzw. Filtration des Virusüberstandes

Um den viralen Einfluss auf die Induktion der 5-LO näher zu charakterisieren, wurde das Virus durch UV-Bestrahlung inaktiviert, sodass er nicht mehr replikationsfähig ist. Hierzu wurde der Virusstock für 20 Minuten mit UV-A-Licht bestrahlt (Fa. LTF, Cat. No. VL-315 G). Zum anderen sollte der Effekt der löslichen Faktoren im Virusüberstand bestimmt werden. Eine Viruspartikel-freie Lösung erhielt man durch Filtration des Virusstocks durch einen 0,1µm Filter der Firma Millipore (Millex[®]-VV 0,1µm, Cat. No. SLVV033RS).

3.13 SDS PAGE und Coomassie-Färbung

Bei den Proben der SDS PAGE handelt es sich, wenn nicht anders erwähnt, um Ganzzell-extrakte, bei denen die pelletierten Zellen 3x10 Sekunden mit Ultraschall behandelt und anschließend

für 15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde mit 2xSDS PAGE-Loading Puffer (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 5 mM EDTA; 50% Glycerol; 10% SDS; 0,05% Bromphenolblau und 10% β -Mercaptoethanol) versetzt und bei 95°C 5 Minuten gekocht. 20 μ l der fertigen Probe wurde elektrophoretisch in einem 8-12% SDS-Gel nach Lämmli [563] aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde für 45 Minuten bei konstant 200 V durchgeführt. Im Anschluss erfolgte entweder eine Coomassie-Färbung oder die Detektion mittels Western Blot. Für die Coomassie-Färbung wurde SimplyBlue™ der Fa. Invitrogen (Cat. No. LC6060) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

3.14 Western Blot

Alternativ zur Coomassie-Färbung wurde die Immunodetektion mittels Western Blot durchgeführt. Hierzu wurden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Fa. GE Healthcare, Hybond-C Extra, Cat. No. RPN 203E) transferiert. Die verwendeten Einstellungen waren 95 V, 230 mA für 80 Minuten. Anschließend wurden die unspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen durch Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur in Odyssey Blocking buffer® (Fa. Li-Cor® Bioscience, Cat-No.927-40000) geblockt. Danach wurde die Membran mit der Erstantikörper-Lösung über Nacht bei 4°C geschüttelt, wobei diese gemäß Tabelle 6 in Odyssey Blocking buffer® mit 0,1% Tween-20 verdünnt wurden. Die Membran wurde 3x5 Minuten mit PBS + 0,1% Tween-20 gewaschen bevor die Inkubation mit dem Zweitantikörper (verdünnt in Odyssey Blocking buffer® +0,1% Tween-20 und 0,02% SDS, siehe Tabelle 7) für 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen erfolgte. Es wurde erneut 3x5 Minuten mit PBS + 0,1% Tween-20 gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgt mit dem LiCor Odyssey® Infrared Imaging System (Fa. LiCor®).

Tabelle 6: Verdünnungen der Erstantikörper

Antigen	Bezeichnung	Verdünnung
5-LO	Fa. BD Transduction Laboratories™, mouse IgG ₁ , 5LO (33), Cat. No. 610695	1:400
Sp1	Fa. Santa Cruz, rabbit polyclonal IgG, Sp1 (H-225), sc14027	1:500
Phospho-Sp1	Fa. Abcam, rabbit polyclonal IgG, Sp1 (phospho T453), ab59257	1:500
HDAC1	Fa. Santa Cruz, rabbit polyclonal IgG, HDAC1 (H-51), sc7872	1:500
HDAC2	Fa. Santa Cruz, rabbit polyclonal IgG, HDAC2 (H-54), sc7899	1:500
HDAC3	Fa. Santa Cruz, rabbit polyclonal IgG, HDAC3 (H-99), sc11417	1:500
DNA-PK	Fa. Antibodies-online.com, rabbit polyclonal IgG, anti-Protein Kinase, DNA activated, catalytic polypeptide (PRKDC) (pT2609), ABIN129603	1:500
FLAP	Fa. Abcam, goat polyclonal IgG, ab-39535	1:200
cPLA ₂	Fa. Santa Cruz, goat polyclonal IgG, cPLA ₂ (C-20), sc-1724	1:200
β-Actin	Fa. Santa Cruz, goat IgG, Actin (I-19), sc-1616	1:1000

Tabelle 7: Verdünnungen der Zweitantikörper

Antigen	Firma	Verdünnung
Donkey anti-rabbit	Fa. LiCor®, IRDye 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H + L), Cat. No. 926-32213	1:10000
Donkey anti-mouse	Fa. LiCor®, IRDye 800CW Donkey anti-Mouse IgG (H + L), Cat. No. 926-32212	1:10000
Donkey anti-goat	Fa. LiCor®, IRDye 680LT Donkey anti-Mouse IgG (H + L), Cat. No. 926-68024	1:10000

3.15 Aufreinigung von Phospho-Proteinen

Für die Analyse des phospho-Sp1-Status in HFF fand die Aufreinigung der Western Blot Proben mit dem Pierce Phosphoprotein Enrichment Kit[®] (Fa. Thermo Scientific Life Science, Product No. 90003) gemäß dem Protokoll des Herstellers statt. Die anschließende Immunodetektion erfolgte analog zu dem oben genannten Western Blot Verfahren.

3.16 Immunozytochemie

Als alternative Nachweismethode von 5-LO auf Proteinebene fand eine immunozytochemische Färbung statt. 6×10^4 HFF wurden direkt in die Kammern des Chamber Slide[™] Systems (Fa. Thermo Scientific, Lab-Tek[™] Chamber Slide[™], No.177380) ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gemäß Standardprotokoll mit Lipofectamin[™] LTX transfiziert (2,5 µg pCGN-IE1 pro Kammer) bzw. mit HCMV AD169 infiziert. 16 Stunden später erfolgte ein Medienwechsel, bevor 48 Stunden nach Transfektion bzw. Infektion die Zellen mit 4°C kaltem Aceton/Methanol 40/60 (V/V) bei Raumtemperatur für 20 Minuten fixiert wurden. Unspezifische Bindungen wurden durch anschließende Inkubation mit 3% Goat Serum (Fa. Sigma Aldrich, Cat. No. G9023) in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Für die proteinspezifische Färbung wurden die fixierten Zellen mit einer Mischung der Primärantikörper für 5-LO (Fa. Cayman, rabbit polyclonal, Cat. No. 160402, Verdünnung 1:100 mit 0,3% Goat Serum + 0,1% Tween-20 in PBS) und IE1 Protein des HCMV (Fa. Acris Antibodies GmbH, monoclonal antibody to cytomegalovirus 76 kD Immediate Early Antigen, mouse IgG1, Cat.No.BM1063, Verdünnung 1:100 mit 0,3%Goat Serum + 0,1% Tween-20 in PBS) versetzt. Die Antikörperlösung verblieb über Nacht bei 4°C auf den Zellen bevor 3x5 Minuten mit PBS + 0,1% Tween-20 gewaschen wurde. Die anschließende Inkubation mit den entsprechenden Zweitantikörpern (Fa. Dianova, Goat anti-rabbit IgG (H+L) conj. Texas red, Cat. No. 111-075-003, Verdünnung 1:100 mit 0,3 % Goat Serum +0,1% Tween 20 in PBS; Fa. Dianova, Goat anti-mouse IgG (H+L) conj. FITC, Cat. No. 115-095-003, Verdünnung 1:100 mit 0,3 % Goat Serum +0,1% Tween-20 in PBS) erfolgte 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS + 0,1% Tween 20 wurde Vectorshield[®] Hard-Set[™] Mounting Medium with DAPI (Fa. Vector Laboratories, Inc., Cat. No. H-1500) zur Fixierung zugegeben bevor die Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurde.

3.17 5-Lipoxygenase-Aktivitätsassay

Für den 5-LO-Aktivitätsassay wurden HFF mit HCMV AD169 in einer MOI 1 infiziert bzw. mit IE1 transfiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 Stunden nach Behandlung durch Pelletierung und anschließender Homogenisierung durch Scherung. Dazu wurde das Pellet fünfmal durch eine Kanüle (Sterican[®] Gr. 1 0,90x40mm, Fa. Braun Best.Nr. 4657519) gezogen. Die Bildung der 5-LO-Produkte wurde durch die Zugabe von 1 mM Calciumchlorid, 2,5 µM Ionophor (Fa. Sigma Aldrich, Cat. No. A23187) und 20 µM AA (Fa. Sigma Aldrich, Cat.No. 233846) eingeleitet. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 4°C Methanol abgestoppt und eine Zentrifugation bei 1000xg, 4°C für 10 Minuten folgte. Die Analyse der 5-LO-Produkte LTB₄, 5-HETE, 12-HETE und 15-HETE fand mittels LC-MS/MS statt. Die Durchführung erfolgte an einem API 4000 triple quadrupole Massenspektrometer (Fa. Applied Biosystems). Als Massenübergänge wurden m/z 335.1 → 195.0 (LTB₄), m/z 319.2 → 115.0 (5-HETE), m/z 319.2 → 178.9 (12-HETE) und 319.2 → 219.1 (15-HETE) verwendet. Zur internen Standardisierung wurden die folgenden Massenübergänge verwendet: m/z 339.2 → 196.9 (²H₄ LTB₄), m/z 327.2 → 116.1 (²H₈ 5-HETE), m/z 327.2 → 184.1 (²H₈ 12-HETE) und 327.2 → 225.9 (²H₈ 15-HETE).

3.18 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Im EMSA wurden unbehandelte HFF-Ganzzellextrakte mit IE1-überexprimierten HFF-Extrakten verglichen. Die Überexpression erfolgte durch Lipofektamin-Transfektion von pCGN-IE1 in 175 cm² Flaschen gemäß oben beschriebenen Transfektionsschema (3.9.1). Die verwendeten Proben sind Kernextrakte, die mit dem Nuclear Extract Kit der Firma Active Motif[®] (Ca. No. 40010) gemäß den Angaben des Herstellers erzeugt worden. Verwendet wurde eine Fluorophor (DY682)-markierte Sonde, die die Sequenz um die GC4-Box des 5-LO-Promotors repräsentiert. Die Sequenz für die *forward*-Sonde ist: DY682-GGCAGCCGGGAGCCT GGAGCCAGACCGGG CCGGGCCGGGAC (5'-3') und entsprechend für die *reverse*-Sonde: DY682-GTCCCGCCCC GCCCGGTCTGGCTCCAGGCTCCCGGCTGCC (5'-3') (Fa. Eurofins MWG Operon). Die Sonden wurden 5 Minuten auf 100°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Anschließend wurde die nun doppelsträngige Sonde zusammen mit den Kernextrakten, 10xBinding Puffer (100 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 7,5), 2,5% Tween-20 und MilliQ Wasser

für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert bevor 10x Orange loading dye (Fa. LiCor, Cat. No. 927-10100) zugegeben wurde. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine auf einem 4%igen nativen Polyacrylamidgel (50 mM Tris pH 7,5, 0,38 M Glycin, 2 mM EDTA) bei 100 V für 45 Minuten in 1xTGE Puffer (25 mM Tris, 124 mM Glycin, 1 mM EDTA pH 8,0). Bevor die Lauf-front das Gel verlassen hat, wurde dieses mit dem LiCor Odyssey[®] Infrared Imaging System (Fa. LiCor[®]) detektiert.

3.19 Chromatin Immunoprecipitation assay (ChIP)

Der ChIP wurde mit unbehandelten, IE1- beziehungsweise pCGN-überexprimierten und HCMV AD169 infizierten Extrakten aus HFF durchgeführt. Dazu wurden die bereits erwähnten Transfektions- bzw. Infektionsmethoden verwendet (3.9.1 bzw. 3.11). Die Herstellung der Kernextrakte erfolgte mittels Nuclear Extract Kit der Firma Active Motif[®] (Ca. No. 40010) gemäß den Angaben des Herstellers. Für die Durchführung des ChIP auf Sp1 wurden das ChIP Assay Kit der Fa. Upstate/Millipore (Cat. No. 17-295) und der entsprechende Sp1-Antikörper (Fa. Upstate/Millipore, Cat. No. 17-601) verwendet. Zusätzlich wurden eine *no antibody*- und eine IgG-Kontrolle (Fa. Upstate/Millipore; Cat. No. 17-601) durchgeführt. Für die anschließende PCR wurden 5-LO-Primer verwendet, die in der proximalen GC-Box-reichen Promotorregion (-286 bis +78bp) binden. Die Sequenzen waren für den *Forward*-Primer AGGAACAGACACCTCGCT GAGGAG (5'-3') und für den *Reverse*-Primer GAGGCTGAGGTAGATGTAGTCGTCAGTG (5'-3'). Das Protokoll umfasste 32 Zyklen bei einer Annealing Temperatur von 55°C. Die PCR-Fragmente wurden über ein 1% Agarosegel mit 0,05% Ethidiumbromid aufgetrennt und unter UV-Bestrahlung detektiert.

3.20 RNS-Extraktion und cDNS-Synthese

2 µg RNS wurden aus unterschiedlich behandelten HFF unter Verwendung des Omega Total RNA Kit II (Fa. Omega, Cat. No. R6934-02) extrahiert. Im Anschluss erfolgte ein DNase-Verdau durch Inkubation mit Fermentas DNase I (Fa. Fermentas, Cat. No. #EN0525) für 30 Minuten bei 37°C. Zugabe von 2,5 mM EDTA für 10 Minuten bei 72°C stoppte die Reaktion. Im Folgenden

wurde die RNS revers-transkribiert; dazu wurde das iScript cDNA Synthesis kit (Fa. Biorad, Cat. No. 170-8897) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

3.21 Quantitative real time PCR (qPCR)

Für die quantitative real time PCR-Analysen wurden der MyiQ Cyclor (Fa. Biorad) und das StepOne™ Real time PCR System der Firma Applied Biosystems verwendet. Bei beiden Systemen basieren die Messungen auf der Verwendung von SYBR-Green als Fluorophor. Die PCR-Mixe die in Kombination mit den MyiQ eingesetzt wurden, enthalten neben Primer und Probe Pfu-Polymerase (Fa. Fermentas, Cat.No.EP0571) und SYBR-Green (Fa. Invitrogen, Cat. No. S7563), während die Mixe des StepOne Systems mit Power Sybr® Green MasterMix (Fa. Applied Biosystems; Cat. No. 4368577) gemäß Angaben des Herstellers durchgeführt wurden. In Tabelle 8 sind die Primersequenzen der entsprechenden Targets aufgeführt.

Tabelle 8: qPCR Primer

Target	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing Temperatur	Zyklen
β-Actin	CGGGACCTGACTGACT ACCTC	CTTCTCCTTAATGTCACG CACG	60°C	40
5-Lipoxygenase	GTTCTGAATGGCTGC AAC	CGCAATGGGGACAATCT TG	60°C	40
Immediate early 1	TGCATGATGTGAGCAA GGGC	ATCAGGGGAGCACTGAG GCA	60°C	40
Sp1	GCTTCAGGCTGTTCCA AACTCT	CTGCCAACTGACCTGTC CATT	60°C	40
c-Jun	TATGACGATGCCCTCA ACGC	CTGGATTATCAGGCGCT CCA	62°C	42

Target	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing Temperatur	Zyklen
NFκB	TTTGGGAAGGCCTGAA CAAATG	GAGGCACCAGGTAGTCC ACCA	62°C	42
NFAT-C1	GCGGAGGAAGAACAC TATGGC	TGGCCGGAGGAGAGGA AGTA	62°C	42

Die erhaltenen ct-Werte wurden mittels $\Delta\Delta ct$ Methode gemäß Livak et. al. [564] gegen β -Actin relativ, beziehungsweise absolut unter Verwendung einer Standardreihe quantifiziert.

3.22 Bradford-Messung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Bio Rad Protein Assay Dye Reagenz (Fa. BioRad, Cat. No. 500-0006) gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung der Absorptionwerte erfolgte am Tecan infinite® M200 (Fa. Tecan Group Ltd.).

3.23 Proteinexpression

Die Expression der viralen Proteine IE1, IE1 Δ Exon4 und IE2 erfolgt im *E. coli* Stamm BL21DE3pLysS (Genotyp: *mpT*, *hsdS_B*(*r_B-r_B-*), *dcm*, *gal*) (eine freundliche Gabe des Arbeitskreis Prof. Dr. Volker Dötsch, Institut für biophysikalische Chemie, Goethe Universität, Frankfurt am Main). Kompetente *E. coli* BL21DE3pLysS wurden mit den jeweiligen pGEX-Plasmiden transformiert und über Nacht im 10ml LB-Medium (Fa. Invitrogen, Cat. No. 22700-025) mit 20 μ l Ampicillinzusatz (50 mg/ml) bei 37°C kultiviert. Nach 16 Stunden wurde die Kultur in 500ml LB-Medium überführt und nach weiteren zwei Stunden bei 37°C mit 0,1 mM IPTG (Fa. Applichem, Cat. No. A4773,0050) induziert. Die anschließende Proteinexpression fand bei 37°C für zwei Stunden statt. Das Pellet der Kultur wurde in 4°C kaltem Lysepuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 60 μ g/ml STI, 2 mM DTT; 0,4 mM PMSF, 1 mg/ml Lysozym) resuspendiert, 15 Minu-

ten auf Eis inkubiert und im Anschluss 6x10 Sekunden geschallt (Wheton cell disruptor, Fa. Migge). Darauf folgte eine Zentrifugation bei 10000xg für 15 Minuten. Der verbleibende Überstand wird eine Stunde bei 100000xg und 4°C ultrazentrifugiert. Nach den Zentrifugationsschritten wurde der Überstand auf eine GSH-Sepharose Säule (Fa. GE Healthcare, Ø 1cm) mit einem Säulenbett von 1cm aufgetragen. Es folgte ein Waschschrift mit 10ml PBS pH 7,4 bevor mit 10ml Factor Xa Cleavage Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) equilibriert wurde. Die Spaltung wurde durch die Zugabe von 40 Units Factor Xa (Fa. Quiagen, Cat. No. 33223) verdünnt mit Factor Xa Cleavage Puffer, der auf die Säule gegeben wurde, eingeleitet. Die verschlossene Säule wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend mit Factor Xa Cleavage Puffer das Protein ohne GST-tag eluiert.

Alternativ zu der oben beschriebenen Methode konnten die exprimierten GST-getaggtten Proteine auch ohne Factor Xa-Spaltung von der Säule eluiert werden. Das komplette Fusionsprotein wurde durch Zugabe des Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM GSH) anstatt des Factor Xa Cleavage Puffers erhalten. Das Eluat wurde über eine Gelfiltration aufgereinigt um das überflüssige GSH zu abzutrennen. Die Bedingungen des Gelfiltrationslaufs waren: 5x5ml High trap Desorting im ÄKTA Purifier 100, Flussrate 4 ml/Minute. Das gewünschte virale Fusionsprotein befand sich zumeist in Fraktion B3 und konnte im Anschluss über Bradford Messung quantifiziert werden. Zur Überprüfung der Proteinexpression erfolgte stets die Kontrolle der Proteingröße über ein Coomassie Gel.

3.24 *Pull-down-Versuche*

Für die *Pull-down*-Versuche zur Untersuchung von Interaktionspartnern der viralen Proteine IE1, IE2 und Proteinen des Ganzzellextraktes wurde zunächst eine Proteinaufreinigung der GST-getaggtten Fusionsproteine gemäß Methode 3.23 durchgeführt. Für die Generierung des Ganzzellextraktes wurden konfluent gewachsene HFF trypsiniert, mit 4°C PBS gewaschen und in PBS mit Protease-Inhibitoren (Complete mini, Fa. Roche Applied Science, Cat. No. 11836153001) resuspendiert. Die Lyse erfolgt durch Ultraschallbehandlung für 3x15 Sekunden. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 13000xg für 10 Minuten abgetrennt und der verbleibende Überstand für *Pull-down*-Versuche eingesetzt. Verwendet wurden hierfür Pierce Glutathione

Magnetic *Beads* (Fa. Thermo Scientific, Cat. No. 88822), die zunächst nach Herstellerangaben mit Waschpuffer (125 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl) equilibriert wurden. Im Anschluss wurden die Fusionsproteine sowie eine GST-Negativkontrolle über Nacht bei 4°C unter Rotation an die *Beads* gebunden. Der Ganzzellextrakt wurde parallel mit den *Beads* vorinkubiert um unspezifischen Bindungen zu senken. Die mit den Fusionsproteinen beladenen *Beads* wurden vom Überstand getrennt, zweimal mit Waschpuffer gewaschen und mit den Überständen der Ganzzellextrakte für vier Stunden bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Elution der gebundenen Proteinkomplexe durch Aufkochen mit 2xSDS-PAGE-Loading Puffer (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 5 mM EDTA; 50% Glycerol; 10% SDS; 0,05% Bromphenolblau und 10% β -Mercaptoethanol). Die erhaltenen Proteinproben wurden über SDS-PAGE nach Lämmli elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot immunodetektiert.

3.25 *In vitro*-Kinaseassay

1,2 μ g aufgereinigtes IE1 wurde mit 1 μ g rekombinantem Sp1 (Fa. Promega, Cat. No. #E6391, Fa. Active Motif Cat. No. 31136) bzw. rekombinanter DNS-abhängiger Proteinkinase (DNS-PK) (Fa. Promega, Cat.#V5811) in unterschiedlichen Inkubationspuffern (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂ oder 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 20% Glycerol, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0,2 mM EDTA) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor radioaktives ATP (Fa. Perkin Elmer, NEG502Z, Spez. Aktivität 6000 Curie/mmol) zugesetzt wurde. Nach weiteren 15 Minuten erfolgte durch Zugabe von 2x SDS PAGE-Loading Puffer (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 5 mM EDTA, 50% Glycerol, 10% SDS, 0,05% Bromphenolblau und 10% β -Mercaptoethanol) und 5 Minuten bei 95°C die Beendigung der Reaktion. In alternativen Ansätzen wurde zusätzlich mit HFF-Ganzzellextrakt, Oligonukleotiden der Sequenz 5'-GATCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGAGCC *forward*, 5'-CTAGACCCGCCCTGACCCCTCACCGCTCGG *revers* und/oder 100 μ M Wortmannin inkubiert. Die Analyse der SDS-Gels erfolgte am Phosphoimager (Fa. Fujifilm, FLA-3000).

3.26 Circular dichroismus Spektrum

Für die Faltungsanalyse der in *E. coli* exprimierten viralen Proteine IE1 und 2 wurden diese in entgastem und schwebstofffreiem 10mM PB Puffer pH 7,5 zu einer Konzentration von 10 μ M aufgenommen und anschließend das Far-UV-Spektrum an einem UV-Spektrometer (Jasco J-810) im Bereich von 190-260 nm gemessen.

3.27 ATP-Bindungsanalyse

Für die Überprüfung der ATP-Bindungsstelle im exprimiertem IE1 wurde das aufgereinigte Protein (s. Methode 3.23) in PB-EDTA auf eine ATP-Agarose Säule (ATP-Agarose, Fa. Sigma-Aldrich, Cat.No. A2767) mit einem Säulenbett von 1cm gegeben. Nach zwei Waschschrinen mit je 10ml PBS / 150 mM EDTA und einem Waschschrin mit 10ml 0,5 M NaCl, wurde das Protein mit 10ml 1mM EDTA/110 mg ATP/15 μ l 10 M NaOH eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden über ein Coomassie-Gel auf die stattfindende Bindung analysiert.

3.28 Co-Immunopräzipitation

HFF-Zellen wurden mit pCGN-Expressionsplasmiden für IE1 und IE2 mittels Lipofektamin-Methode transfiziert. 24 Stunden später erfolgte die Zellernte durch Pelletieren und anschließende Lyse (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1% Triton-X, 0,4 mM EDTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 10 mM Natriumfluorid, 1 mM PMSF) für 1 Stunde bei 4°C auf einem Rotator. Durch Zentrifugation bei 14000 rpm, 30 Minuten 4°C wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wurde mit Protein Agarose A *Beads* (Fa. Millipore, Cat. No. 16-157) versetzt und für 30 Minuten bei 4°C unter Rotation inkubiert um unspezifische Bindungen abzutrennen. Nach Separierung der *Beads* vom Überstand, wurde diesem der entsprechende Antikörper (siehe Tabelle 9) oder IgG als Negativkontrolle zugesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gebunden, bevor erneut Protein Agarose A *Beads* hinzugegeben wurden. Die Bindung erfolgte über Nacht unter Rotation bei 4°C. Die gekoppelten *Beads* wurden anschließend fünfmal mit PBS gewaschen

bevor die Elution der gebundenen Proteine mit 80°C heißem Lämmli-Puffer stattfand. Die immunopräzipitierten Proteine wurden mittels Western Blot analysiert.

Tabelle 9: Antikörper der Immunopräzipitation

Protein	Antikörper
Sp1	Fa. Abnova, mouse monoclonal, Sp1 (M01), H00006667-M01
CMV	Fa. Santa Cruz, mouse monoclonal IgG ₁ , CMV pp72/86 (CH160), sc 69748
HDAC1	Fa. Santa Cruz, rabbit polyclonal IgG, HDAC1 (H-51), sc7872
HDAC2	Fa. Santa Cruz, rabbit polyclonal IgG, HDAC2 (H-54), sc7899
HDAC3	Fa. Santa Cruz, rabbit polyclonal IgG, HDAC3 (H-99), sc11417
IgG	Fa. Santa Cruz, normal rabbit IgG, sc2027

3.29 Histondeacetylase-Aktivitätsassay

Für die Messung der Histondeacetylase-Aktivität wurden Kernextrakte transfizierter HFF verwendet, die mittels dem Nuclear Extract Kit der Firma Active Motif[®] (Ca. No. 40010) gemäß den Angaben des Herstellers erzeugt wurden. Der Assay erfolgte durch Inkubation der Kernextrakte mit dem fluoreszierenden Histondeacetylase-Substrat ZMAL [565] im Inkubationspuffer (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂) für 10 Minuten auf Eis. Im Anschluss wurde eine NAD⁺-Lösung zugegeben und die Reaktion erfolgte für 4 Stunden bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Stop-Solution (50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 6 mM Nicotinamid, 6 mg/ml Trypsin) mit folgender Inkubation für 20 Minuten bei 37°C beendet. Abschließend wurde die Platte im Microplate Reader Polarstar Galaxy (BMG Labtechnologies, Germany) mit einem Extinktionsfilter von 355 oder 390nm und einem Emissionsfilter von 460nm vermessen [566]. Quantifiziert wurden die Ergebnisse gegen die mit Leerplasmid transfizierte Kontrolle. Alternativ zu ZMAL, dem Substrat, dass die allgemeine HDAC-Aktivität repräsentiert können auch HDAC-selektive Substrate verwendet werden, wie B61 für HDAC1 und B12 für HDAC6 [567].

3.30 Lentiviraler *Knock-down*

Für den lentiviralen *Knock-down* wurden HEK293T-Zellen nach oben genannter Calciumphosphat-Methode (3.9.1) mit einem DNS-Mix aus den Verpackungsplasmiden M334 [568], VSVG (Didier Trono, Tronolab, Lausanne) (eine freundliche Gabe vom Arbeitskreis Dr. Manuel Grez, Georg Speyer Haus, Frankfurt am Main) und dem shRNS-Plasmid für Sp1 (Fa. Sigma Aldrich, MISSION® shRNA, Cat. No. SHCLND-MN 138473, TRCN 0000020444) transfiziert. Der Medienwechsel erfolgte nach 4 Stunden, anschließend wurde für 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um die im Überstand befindlichen Viruspartikel abzutrennen, filtrierte man den Überstand durch einen 0,22 µm Filter (Fa. Millipore, Millex GP, Cat. No. SLGP033RB), wodurch es zur Abtrennung von Zelltrümmern der Produktionszelllinie HEK293T kommt. Die so erhaltene Viruslösung wurde zur Transduktion von HFF eingesetzt. 24 Stunden vor der Transduktion wurden 6x10⁴ HFF pro well in eine 24-well Platte ausgesät, am Transduktionstag mit 4 µg/ml Protaminsulfatlösung (Fa. Sigma Aldrich, Cat. No. 33223) versetzt und mit unterschiedlichen Volumina der Viruslösung behandelt. Um die Effektivität der Transduktion zu steigern erfolgte eine *Spin Transduktion*. Dazu wurde nach Zugabe der Viruslösung für 90 Minuten bei 32°C und 2500 rpm auf die Zellen zentrifugiert. Im Anschluss wurde für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor das Medium gewechselt wurde. Die Selektion der stabil transduzierten Zellen erfolgte durch Puromycinzugabe (0,75 µg/ml; Fa. Sigma Aldrich, Cat.No. P7255) über mehrere Wochen. Der *Knock-down* wurde über qPCR für die RNS-Regulation beziehungsweise mittels Western Blot Analyse auf Proteinebene nachgewiesen.

3.31 Signifikanzberechnungen

Die Signifikanz wurde mittels einer ANOVA Analyse ermittelt; *p>0,05; **p>0,01; ***p>0,001

4 ERGEBNISSE

4.1 Induktion von 5-LO-mRNS und -Protein durch IE1

4.1.1 Induktion der 5-LO nach Infektion mit HCMV AD169 auf mRNS-Ebene

Bezug nehmend auf die Veröffentlichung von Qiu et. al. [248] wurde zunächst untersucht, ob es durch die Infektion von humanen Vorhaut-Fibroblasten mit HCMV AD169 zu einer Induktion der 5-Lipoxygenase auf mRNS-Ebene kommt. Diese Zelllinie ist im nativen Kontext 5-LO negativ. In Abhängigkeit von eingesetzter Virusmenge (MOI) und Infektionsdauer (hpi) kam es zu einer Hochregulation der 5-LO-mRNS. Als Viruskonzentration wurden ein MOI 1 und 2 verwendet. Die Messzeitpunkte von 6, 24 und 72 Stunden entsprachen dem Expressionsmuster der humanen Cytomegalovirus-Proteine und spiegeln jeweils die maximalen Level der Immediate Early, Early und Late Proteine wieder [256].

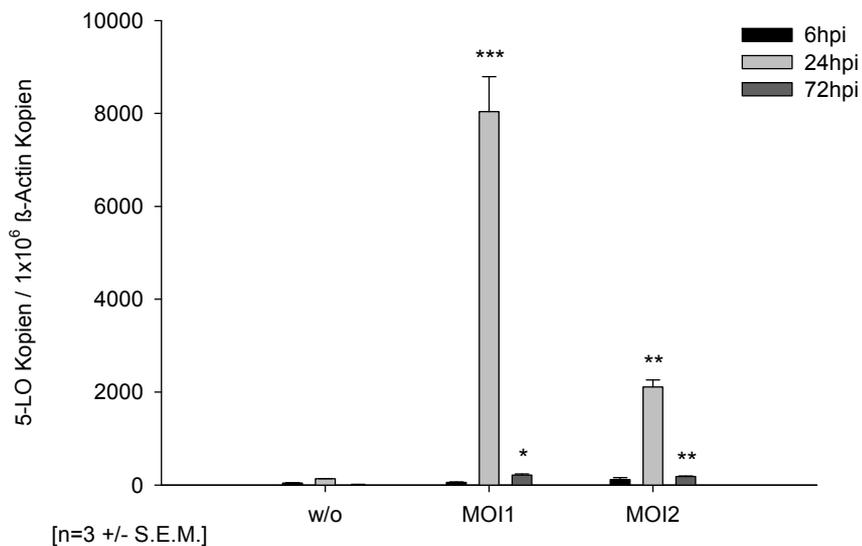


Abbildung 14: Induktion der 5-LO-mRNS-Expression in HFF nach Infektion mit HCMV AD169; Die Zellen wurden mit HCMV AD169 MOI 1 und MOI 2 infiziert und die RNS nach 6h, 24h und 72h extrahiert. Mittels qPCR wurde die 5-LO-mRNS-Expression untersucht. Die Quantifizierung der ct-Werte erfolgt absolut und wurde gegen β -Actin-Kopien normalisiert. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, dass es nach Infektion der Zellen mit HCMV AD169 zu einer signifikanten konzentrations- und zeitabhängigen Induktion der 5-LO-mRNS im Vergleich zu unbehandelten Zellen kommt. Das Maximum wurde nach 24 Stunden bei einer MOI von 1 erreicht. Der induktive Effekt steigerte sich von 55 5-LO-Kopien pro 1×10^6 β -Actin-Kopien nach 6 Stunden auf 8035 Kopien nach 24 Stunden und fällt nach 72 Stunden wieder auf 216 Kopien ab. Die Tendenz, dass der höchste 5-LO-mRNS-Spiegel nach 24 Stunden erreicht wurde, bestätigte sich ebenso bei MOI 2. Hier steigerte sich der Effekt zunächst von 117 5-LO-Kopien pro 1×10^6 β -Actin-Kopien nach 6 Stunden auf 2111 Kopien nach 24 Stunden, um dann ebenfalls wieder abzufallen auf 184 Kopien (Abb. 14).

4.1.2 Abhängigkeit der Induktion vom viralen Replikationszyklus

Um ferner zu überprüfen, ob die Induktion der 5-Lipoxygenase durch ein Immediate Early, Early oder Late Protein des humanen Cytomegalovirus ausgelöst wird, wurden die Zellen bei der Infektion zusätzlich mit 5 mM Foscarnet behandelt. Foscarnet bindet an der Pyrophosphat-Bindungsstelle der viralen DNS-Polymerase, inhibiert diese und verhindert die Replikation des viralen Genoms [569]. Da die Late Proteine erst nach der Replikation synthetisiert werden, kann man durch Verwendung des Inhibitors ihre Expression unterdrücken. Überprüft wurde die Abwesenheit von Late Proteinen im Expressionsmaximum 72h nach der über eine AEC-Färbung des gB Proteins. Durch die Behandlung waren nahezu keine Late Proteine mehr vorhanden (Abb. 15).

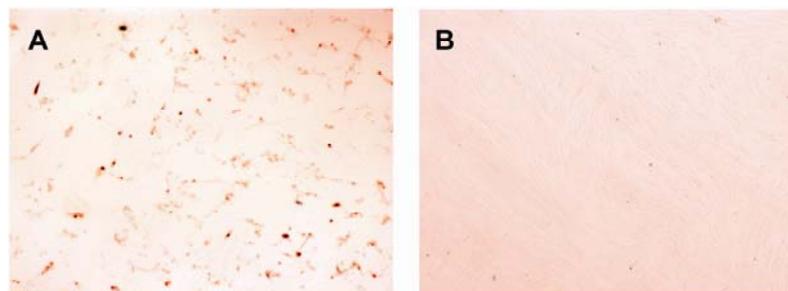


Abbildung 15: AEC-Färbung von HCMV AD169 MOI 1 infizierten humanen Vorhaut-Fibroblasten; (A) Infizierte HFF MOI 1 nach 72hpi; (B) Infizierte (MOI 1) und Foscarnet-behandelte (5mM) HFF nach 72hpi; Die Zellen wurden fixiert und auf die Expression von Late Proteinen mittels AEC-Färbung von gB untersucht.

In den folgenden qPCR-Experimenten von behandelten und unbehandelten humanen Vorhaut-Fibroblasten war festzustellen, dass die Induktion der 5-LO-mRNS unabhängig von der Foscavir Zugabe induziert wurde. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der behandelten Probe und der unbehandelten Probe, was darauf schließen lässt, dass der induktive Effekt unabhängig von der Expression der Late Proteine abläuft (Abb. 16).

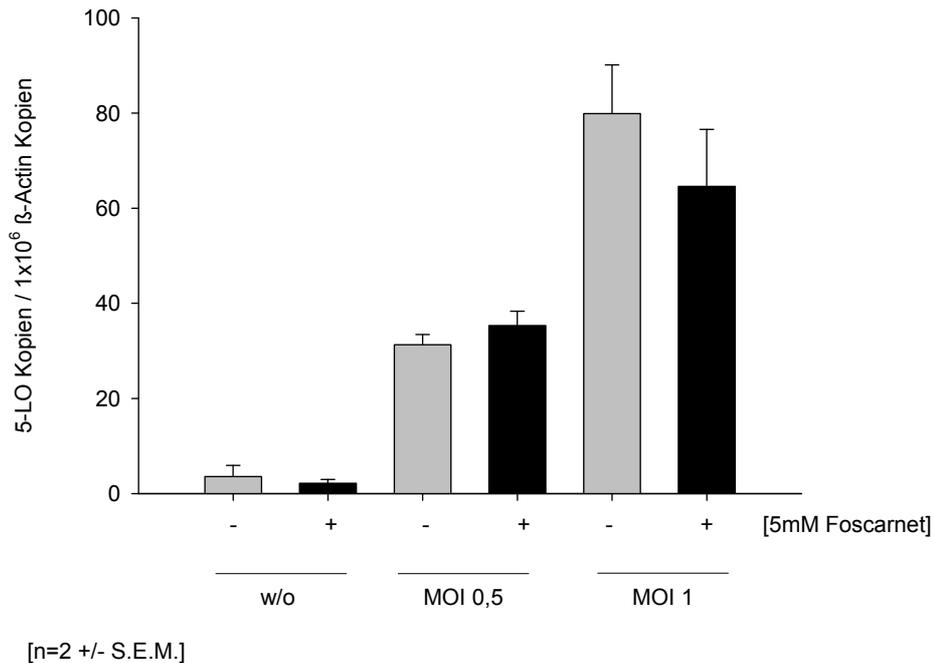


Abbildung 16: Induktion der 5-LO-mRNS-Expression in HFF nach Infektion mit HCMV AD169; Die Zellen wurden mit HCMV AD169 MOI 0,5 bzw. MOI 1 infiziert und mit (+) oder ohne (-) 5 mM Foscarnet behandelt. Nach 72h wurde RNS extrahiert und über quantitative real time PCR auf 5-LO-mRNS-Expression untersucht. Die Quantifizierung der ct-Werte erfolgt absolut und wurde gegen β-Actin-Kopien normalisiert. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M aus zwei unabhängigen Experimenten.

Neben den Immediate Early oder Early Proteinen könnten auch Strukturproteine der Hüllmembran bzw. lösliche Faktoren der Virussuspension für die 5-LO Induktion verantwortlich sein [570, 571]. Um diese Aspekte zu überprüfen, wurde das Virus mittels UV-Bestrahlung inaktiviert, sodass nur noch strukturelle Komponenten der Hüllmembran einen Effekt auslösen können, beziehungsweise durch einen Sterilfilter der Porengröße 0,1µm filtriert um eine Viruspartikel-freie Lösung des Überstandes zu erhalten. Nach Infektion von HFF mit HCMV AD169, Virusüberstand oder inaktiviertem Virus zeigte sich, dass nur der Vollvirus in der Lage ist nach 24 Stunden die 5-

LO-mRNS zu induzieren. Die 5-LO-Kopienanzahl bei UV-inaktiviertem Virus oder filtriertem Virusüberstand entsprach annähernd einer uninfizierten Kontrolle und lag bei etwa 120 Kopien im Vergleich zu über 8000 Kopien bei Infektion mit HCMV AD169 MOI 1. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass weder strukturelle Bestandteile der Hüllmembran, noch lösliche Faktoren des Virusüberstandes für den induktiven Effekt verantwortlich sind, sondern dieser durch Immediate Early oder Early Proteine vermittelt wird (Abb. 17).

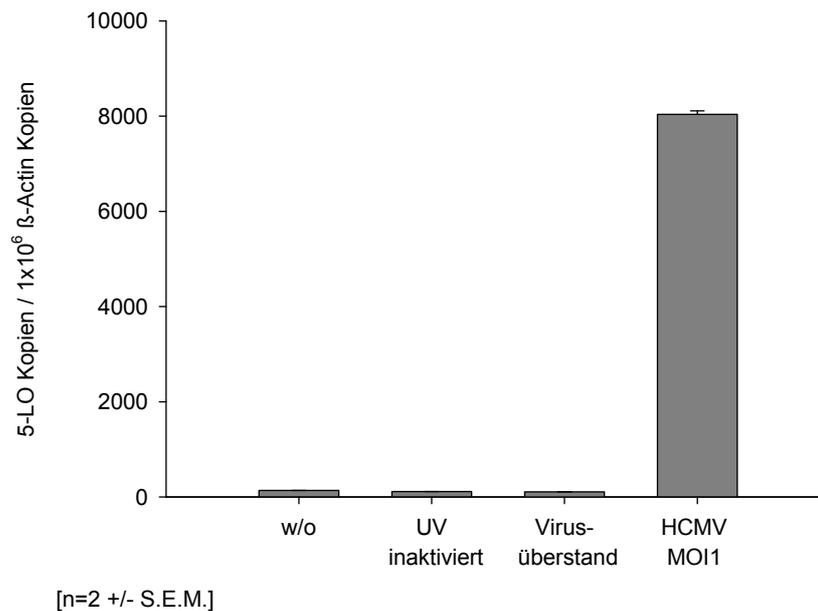


Abbildung 17: 5-LO-mRNS-Expression in HFF nach Infektion mit HCMV AD169, UV inaktiviertem Virus sowie filtriertem (virusfreiem) Virusüberstand; Die Zellen wurden mit den unterschiedlichen Lösungen behandelt und nach 24h RNS extrahiert und über quantitative real time PCR auf 5-LO-mRNS-Expression untersucht. Die Quantifizierung der ct-Werte erfolgt absolut und wurde gegen β -Actin-Kopien normalisiert. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.1.3 Transaktivierende Eigenschaften viraler Proteine auf den 5-LO-Promotor

Für die nähere Charakterisierung, welches Protein des HCMV am induktiven Effekt auf die 5-LO-mRNS beteiligt ist, wurde ein Reporterassay mit dem 5-LO-Promotorkonstrukt pN10 in Kombination mit unterschiedlichen Expressionsplasmiden einzelner viraler Proteine in HFF durchgeführt. pN10 beinhaltet den 5-LO-Promotorbereich zwischen -844bp und -12bp relativ zum

Transkriptionsstart. Getestet wurden unterschiedliche Klassen an Virusproteinen: die Transaktivatoren IE1 und 2, das regulative Tegument Protein UL69, welches am nukleären RNS-Export beteiligt ist [524, 572, 573], UL48 ein Capsid assoziiertes Tegument Protein [574], pp71 der Aktivator des Major Immediate Early Promotors sowie die Phosphoproteine pp65 und pp150. pp150 ist ebenfalls ein Tegument Protein des Virus, das in den viralen Reifungsprozess involviert ist [575], während pp65 ein stark exprimiertes Strukturprotein der Late Phase darstellt [302].

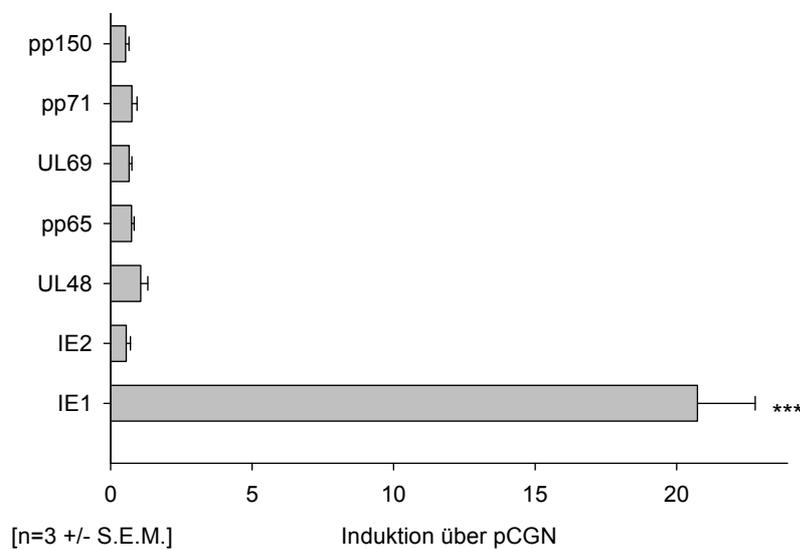


Abbildung 18: Induktion des 5-LO-Promotorfragments pN10 in humanen Vorhaut-Fibroblasten nach Überexpression diverser HCMV Proteine; Die Zellen wurden mit dem 5-LO-Promotorkonstrukt pN10 als Reporterplasmid und unterschiedlichen Expressionsplasmiden humaner Cytomegalovirus Proteine cotransfiziert. Die Luciferaseaktivität wurde 60h nach Transfektion bestimmt und gegen den Leervektor pCGN normalisiert. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, dass bei der Cotransfektion von IE1 die stärkste Promotoraktivierung auftrat. Verglichen mit den anderen Expressionsplasmiden, die nur schwache 1-2fache Induktionen hervorriefen, liegt sie bei einer über 20fachen Induktion bezogen auf das Leerplasmid pCGN (Abb. 18).

4.1.4 Promotoraktivierung durch die IE1-defiziente Virusmutante CR208

Der humane Cytomegalovirus Stamm CR208 ist eine IE1-Mangelmutante, welcher das Exon 4 des Major Immediate Early Gens fehlt, sodass nur IE2, nicht aber IE1 exprimiert werden kann. Aufgrund dieses Defektes ist das Virus in seiner Wachstumsrate nicht vergleichbar mit dem Vollvirus AD169 [439]. Um entsprechende Infektionsbilder zu erreichen, wurden zunächst HFF mit unterschiedlichen MOIs infiziert und nach 72 Stunden eine AEC-Färbung auf das Late Protein gB durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine MOI 10 für CR208 mit MOI 1 für AD169 vergleichbare Infektionen liefert (Abb. 19).

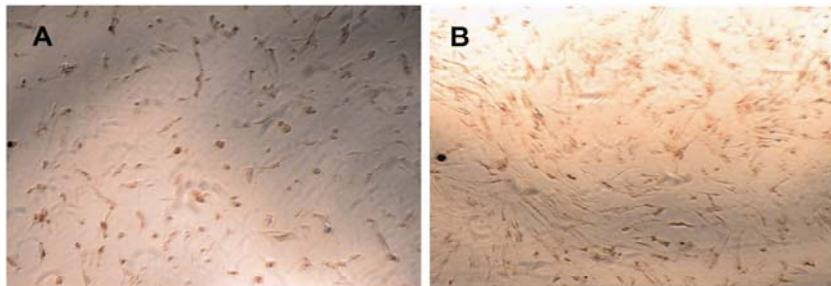


Abbildung 19: AEC-Färbung von humanen Vorhaut-Fibroblasten infiziert mit unterschiedlichen Virusstämmen; A) AD169 MOI 1 infizierte HFF; B) CR208 MOI 10 infizierte HFF; Die Zellen wurden 72h nach der Infektion fixiert und auf die Expression des Late Proteins gB mittels AEC-Färbung untersucht.

Um zu bestätigen, dass IE1 einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität des 5-LO-Promotors ausübt, erfolgte die Transfektion von HFF mit pN10 und anschließend eine Infektion mit dem Vollvirus AD169 MOI 1 oder CR208 MOI 10 sowie eine uninifizierte Negativkontrolle. 48 Stunden später wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Die relativen Lumineszenzeinheiten der CR208 infizierten Fibroblasten zeigten keinen Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle, wohingegen die AD169 infizierten Zellen eine signifikante Erhöhung der Promotoraktivität von 537 relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) aufwiesen. In diesem Experiment bestätigte sich die Annahme, dass IE1 das entscheidende Virusprotein für die Induktion des 5-LO-Promotors zu sein scheint (Abb. 20).

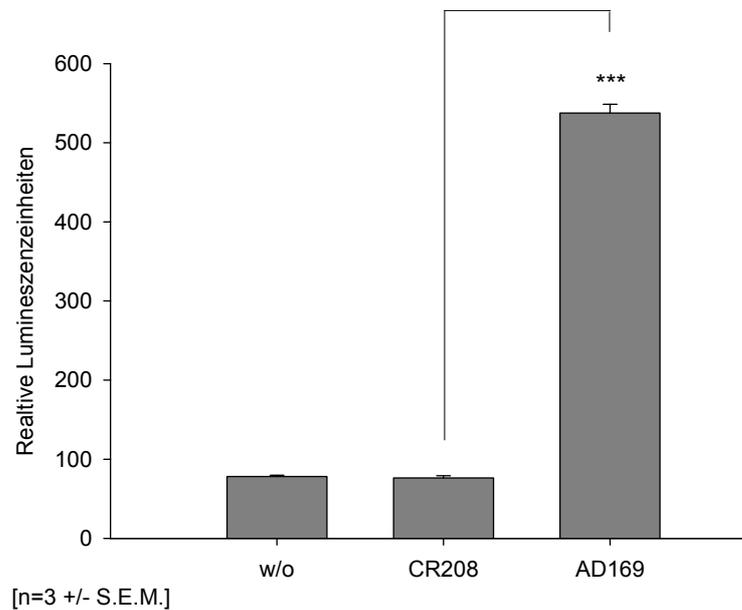


Abbildung 20: Induktion von pN10 in infizierten HFF; Transfektion der Zellen mit pN10 und anschließende Infektion mit CR208 MOI 10, AD169 MOI 1 bzw. eine uninfizierte Negativkontrolle (w/o). Die Messung der Lumineszenzeinheiten erfolgt nach 48h. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M aus drei unabhängigen Versuchen.

4.1.5 Regulation der 5-LO-mRNS-Expression durch CR208

Das HCMV-Protein IE1 hat essentiellen Einfluss auf die Aktivität des 5-LO-Promotorfragments pN10 (Abb. 18 und 20). Um die zentrale Rolle dieses Proteins in der Induktion der 5-LO zu bestätigen, wurde die Regulation des 5-LO-mRNS-Levels nach Infektion mit dem Vollvirus AD169 mit der Regulation nach Infektion der IE1-Mangelmutante CR208 verglichen. Zunächst erfolgte die Überprüfung der IE1-Defizienz mittels qPCR auf Immediate Early 1-mRNS. Es zeigte sich deutlich, dass in den AD169 infizierten HFF ein hohes IE1-Level von über 1000 Kopien pro 1×10^6 β -Actin-Kopien vorhanden ist, während in den CR208 infizierten Zellen kein IE1 exprimiert wird (Abb. 21).

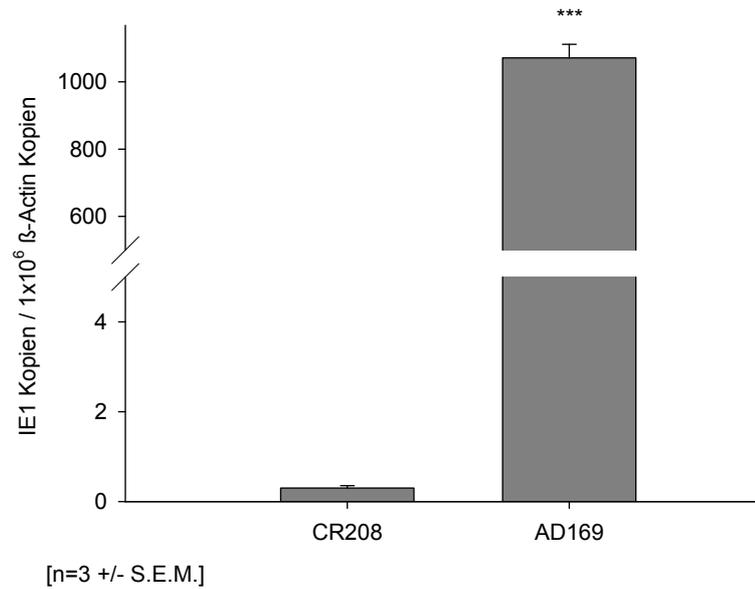


Abbildung 21: Quantifizierung der Immediate Early 1-mRNS in CR208 infizierten HFF; Die Zellen wurden mit CR208 MOI 10 oder AD169 MOI 1 infiziert und nach 24h RNS extrahiert und über quantitative real time PCR auf IE1-mRNS-Expression untersucht. Die Quantifizierung der ct-Werte erfolgt absolut und wurde gegen β -Actin-Kopien normalisiert. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten.

Nachdem die Defizienz von CR208 bestätigt wurde, erfolgte der Vergleich der 5-LO-mRNS-Level nach Infektion von HFF mit den unterschiedlichen Virusstämmen. Verwendet wurden MOI 1 für AD169 und MOI 10 für CR208, um der unterschiedlichen Wachstumsrate gerecht zu werden. Während in den CR208 infizierten Zellen lediglich 6 Kopien 5-LO pro 1×10^6 β -Actin-Kopien zu detektieren waren, stieg die 5-LO-mRNS-Zahl bei Infektion mit dem Vollvirus AD169 auf 108 Kopien pro 1×10^6 β -Actin-Kopien an. Es erweist sich auch hier nur der IE1-exprimierende Virus als in der Lage, 5-LO-mRNS zu induzieren (Abb. 22).

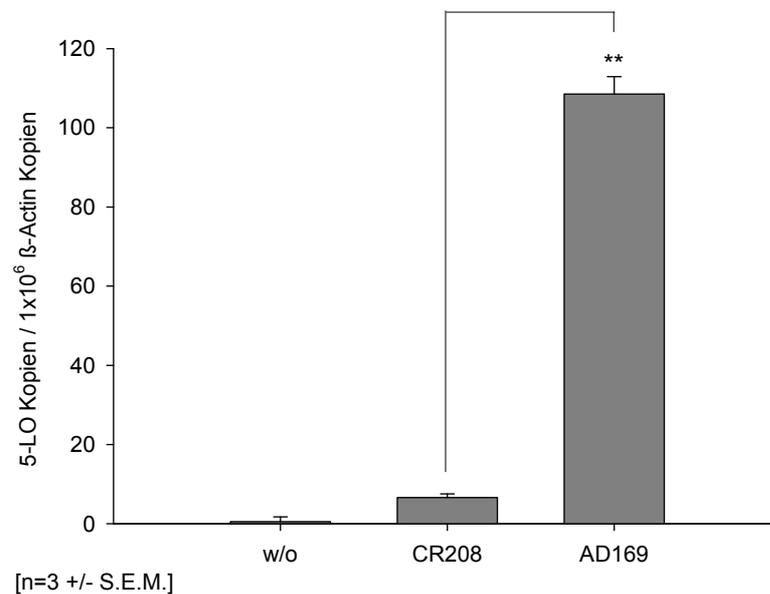


Abbildung 22: Quantifizierung des 5-LO-mRNS-Spiegels in infizierten HFF; Aus HCMV AD169 (MOI 1) oder CR208 (MOI 10) infizierten HFF wurde nach 24h RNS extrahiert und revers in cDNS transkribiert. Die Quantifizierung der ct-Werte erfolgt absolut und wurde gegen β -Actin Kopien normalisiert. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten

4.1.6 Regulation der 5-LO-Proteinexpression durch Immediate Early 1

Nachdem zunächst eine Induktion auf mRNS-Ebene bzw. eine Aktivierung des 5-LO-Promotors aufgezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob es nachfolgend auch zu einer verstärkten Expression des 5-LO-Proteins kommt. Um dies zu zeigen, wurden HFF mit HCMV AD169 MOI 1 infiziert bzw. mit pCGN-IE1 transfiziert und mittels Immunocytochemie 5-LO und Immediate Early 1 detektiert. In der unbehandelten Kontrolle war weder 5-LO noch IE1 zu detektieren (Abb. 23A), wohingegen nach Überexpression von IE1 5-LO deutlich gefärbt werden konnte (Abb. 23B). Allerdings war die Kontrollfärbung auf IE1 nur sehr schwach ausgeprägt. Die infizierten Zellen hingegen zeigten eine deutlich positive Färbung von sowohl IE1 als auch 5-LO (Abb. 23C).

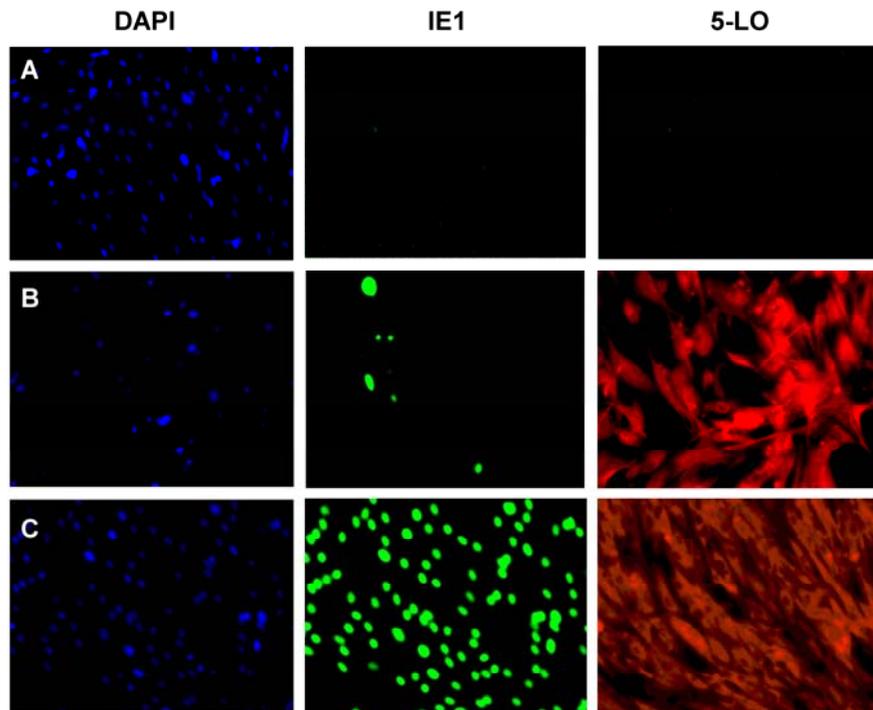


Abbildung 23: Immunocytochemische Färbung von 5-LO und IE1 in infizierten bzw. IE1 überexprimierten HFF; (A) unbehandelte Kontrolle, (B) pCGN-IE1 transfizierte HFF, (C) HCMV AD169 MOI 1 infizierte HFF; Die Zellen wurden 24h nach Aussaat behandelt und nach weiteren 48h mit Aceton/Methanol fixiert. Die Detektion erfolgte mit 5-LO und IE1 spezifischen Erstantikörpern und Fluorophor-gelabelten Zweitantikörpern am Fluoreszenzmikroskop.

Zur Bestätigung der verstärkten 5-LO-Proteinexpression nach Transfektion und Infektion wurde zusätzlich ein Western Blot durchgeführt. Als Positivkontrolle diente rekombinante 5-LO aus *E. coli*. Sowohl in pCGN-IE1 überexprimierten als auch in HCMV AD169 infizierten Zellen konnte 5-LO detektiert werden, während die unbehandelte Kontrolle 5-LO negativ ist (Abb. 24).

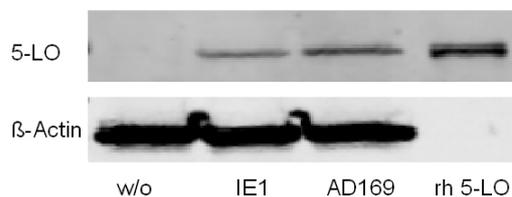


Abbildung 24: Western Blot als Expressionskontrolle des 5-LO-Proteins in uninfizierten, IE1 überexprimierten oder AD169 infizierten HFF; Die Zellen wurden transfiziert bzw. infiziert und nach 48h Protein extrahiert und auf 5-LO und β -Actin geblottet. Als Positivkontrolle diente rekombinante 5-LO (rh 5-LO) aus *E. coli*.

4.1.7 5-LO-Aktivitätsassay nach Infektion beziehungsweise IE1-Überexpression

Aktive 5-LO katalysiert die Konversion von Arachidonsäure zu 5-HPETE durch Einführung von molekularem Sauerstoff an der Position C5. Nachfolgend kommt es zur Bildung von 5-HETE, sowie dem instabilen Epoxid Leukotrien A₄. Um nachzuweisen, dass die durch HCMV verstärkt exprimierte 5-LO auch aktiv ist, wurden HFF mit HCMV AD169 MOI 1 infiziert bzw. mit pCGN-IE1 transfiziert und nach 48 Stunden ein Aktivitätsassay durchgeführt. Die Homogenate wurden mit 1mM Calciumchlorid, 2,5µM Ionophor und 20µM Arachidonsäure stimuliert und die Produktbildung mittels LC-MS/MS-Messung bestimmt.

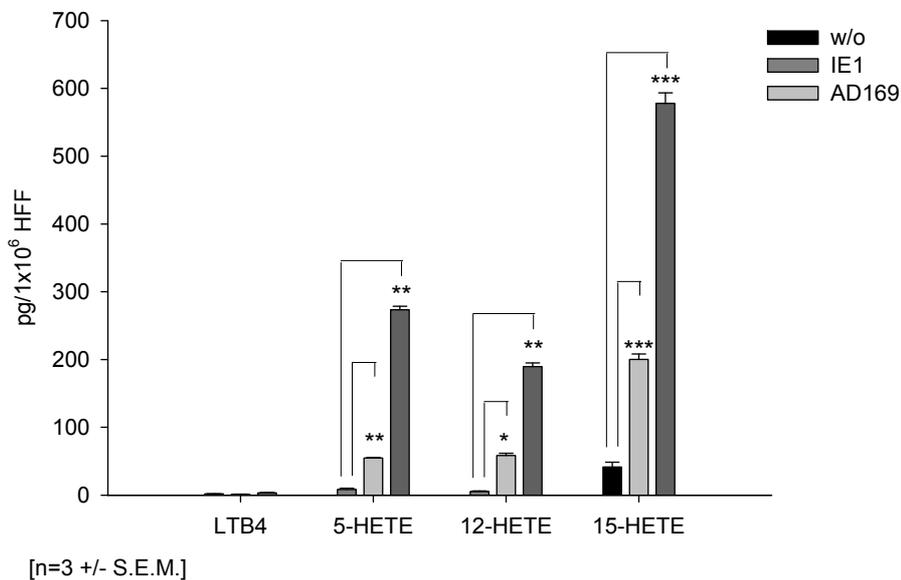


Abbildung 25: Bestimmung der 5-LO-Produktbildung nach HCMV-Infektion und IE1-Überexpression; Homogenate aus infizierten oder transfizierten HFF wurden mit 1 mM Calciumchlorid, 2,5 µM Ionophor und 20 µM Arachidonsäure stimuliert und anschließend die Bildung von Leukotrien B₄, 5-HETE, 12-HETE und 15-HETE bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, dass durch Infektion oder IE1-Transfektion die Menge an 5-LO-Produkten verstärkt wird. Der Gehalt an Leukotrien B₄ stieg in den infizierten Zellen um den Faktor zwei an. Die IE1-überexprimierenden Zellen zeigten keinen Anstieg der LTB₄-Menge im Vergleich zu der uninfizierten Probe. Deutlicher sind die Induktionen bei 5-HETE, hier kam es zu einer signifikanten Erhöhung von 8,5pg (w/o) auf 54,5pg (IE1) und 273,3pg (AD169) pro 1x10⁶ Zellen. Auch die Produkte der 12-LO und 15-LO, 12-HETE und 15-HETE wurden signifikant erhöht (Abb. 25).

4.1.8 Expression von Enzymen des 5-LO-Signalweges in diversen Zelllinien

Trotz der deutlichen Induktion der 5-LO auf Proteinebene kommt es nur zu einer relativ niedrigen Bildung der 5-LO-Produkte LTB₄ und 5-HETE. Um zu Bestimmen, ob es sich um ein Aktivitätsproblem der 5-LO handelt, oder die zellulären Voraussetzungen für eine Synthese der Produkte nicht gegeben sind, wurden Lysate unbehandelter HFF, IE1-überexprimierender HFF, MM6, HT-29 und PMNL auf die Expression von cPLA₂ und FLAP überprüft (Abb. 26).

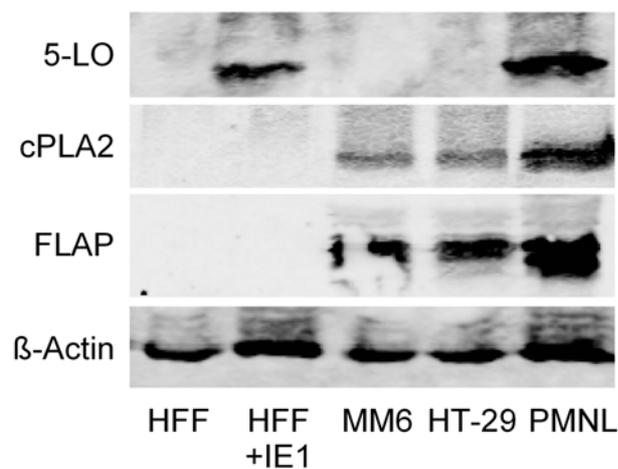


Abbildung 26: Expressionskontrolle von 5-LO, FLAP und cPLA₂ im Western Blot; HFF, HFF+IE1, MM6, HT-29 und PMNL Zellen wurden lysiert und ihr endogenes Level an 5-LO, FLAP bzw. cPLA₂ auf Proteinebene bestimmt.

Die Western Blots zeigten deutlich, dass in humanen Vorhaut-Fibroblasten im Unterschied zu Mono Mac 6, HT-29 und PMNL nahezu keine detektierbaren Proteinlevel an FLAP und cPLA₂ vorhanden sind, was die 5-LO-katalysierte Leukotrienbiosynthese beeinflussen könnte. 5-LO-Protein findet sich im PMNL-Lysat aber auch in IE1-überexprimierenden HFF.

4.2 Mechanistische Untersuchungen zur IE1-vermittelten Induktion des 5-LO-Promotors über Sp1

4.2.1 Einfluss von IE1 auf die Transkriptionsfaktorregulation

Im 5-LO-Promotor sind Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren charakterisiert [5]. Vor allem der aktivierende Einfluss von Sp1 durch Bindung an GC-Boxen konnte gezeigt werden [8, 9, 171], aber auch NFAT, c-Jun oder NF κ B könnten als Regulatoren des 5-LO-Promotors einen Einfluss auf dessen Aktivität ausüben. Da die Immediate Early Proteine des humanen Cytomegalovirus als potente Transaktivatoren für sowohl virale als auch zelluläre Promotoren [387] beschrieben sind, die sowohl selbst als Transkriptionsfaktoren agieren oder eben diese induzieren [486] können, wurde die Regulation der mRNA-Level der 5-LO-assoziierten Transkriptionsfaktoren NF κ B, c-Jun, NFAT1, Sp1 nach Überexpression von IE1 in HFF in Abhängigkeit der Zeit mit der Leerplasmid Kontrolle verglichen (Abb. 27).

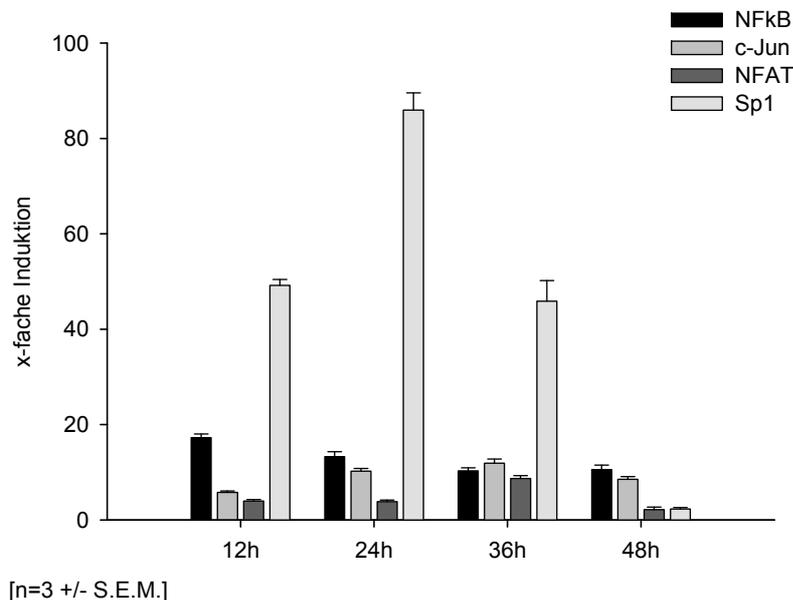


Abbildung 27: Induktion 5-LO relevanter Transkriptionsfaktoren nach IE1-Überexpression in HFF; Aus IE1-überexprimierten HFF wurde nach 12h, 24h, 36h und 48h RNS extrahiert. Die Quantifizierung der ct-Werte erfolgte relativ gegen die Leerplasmidkontrolle mittels $\Delta\Delta$ ct Methode. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten

Es bestätigte sich zunächst, dass die Überexpression von IE1 ausreicht, um den 5-LO-mRNS-Status stark zu induzieren. Das Maximum war nach 24 Stunden erreicht, zu diesem Zeitpunkt war der 5-LO-Spiegel 235fach erhöht gegenüber der Kontrolle. Bei näherer Betrachtung der Regulation der Transkriptionsfaktoren, zeigte sich für NFAT ein sehr geringer Einfluss der IE1-Überexpression, es tritt eine maximal 8fache Induktion nach 36 Stunden ein. Für c-Jun und NFκB waren die Effekte etwas stärker ausgeprägt, c-Jun wurde bis zu 12fach nach 36 Stunden und NFκB bis zu 17fach nach 12 Stunden induziert. Die deutlichste Regulation zeigte sich jedoch für den Transkriptionsfaktor Sp1. Dessen mRNS-Status korrelierte mit der Induktion der 5-LO-mRNS und erreicht ebenfalls nach 24 Stunden das Maximum in einer 85fachen Induktion.

Eine zusätzliche Überprüfung der Sp1-mRNS-Regulation durch IE1 erfolgte in AD169 (MOI 1) und CR208 (MOI 10) infizierten HFF (Abb. 28). 24 Stunden nach Infektion wurden die mRNS-Level von Sp1 verglichen.

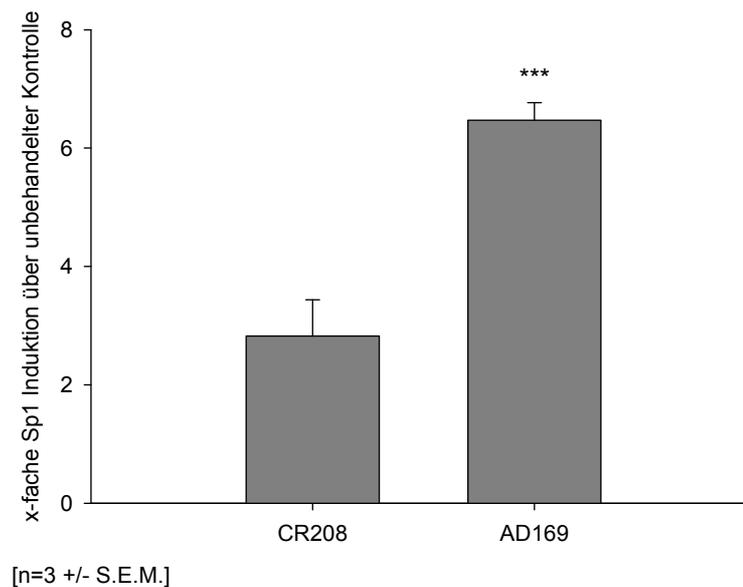


Abbildung 28: Quantifizierung der Sp1-mRNS-Induktion nach Infektion von HFF mit unterschiedlichen HCMV-Stämmen; HFF wurden mit HCMV AD169 MOI 1 und CR208 MOI 10 infiziert, nach 24h RNS extrahiert. Die cDNA wurde mit quantitativer qPCR analysiert und gegen die uninfizierte Kontrolle relativ über die $\Delta\Delta\text{ct}$ Methode quantifiziert. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten.

AD169 infizierte HFF zeigten signifikant höhere Sp1-Induktionen als die mit der IE1-Deletionsmutante CR208-infizierten Zellen. Dies bestätigt den Einfluss von IE1 auf das Sp1-Level. Es zeigt sich jedoch, dass noch andere virale Proteine in der Lage sind, Sp1-mRNS zu induzieren [410].

4.2.2 Untersuchung der Induktion von 5-LO-Promotordeletionskonstrukten durch IE1

Der Transkriptionsfaktor Sp1 bindet an GC-reich Promotorregionen, die sogenannten GC-Boxen. Typischerweise sind diese in Promotoren von Housekeeping Genen stark vertreten. Der 5-LO-Promotor beinhaltet acht GC-Boxen, von denen fünf als Tandemsequenz vorliegen (-176 bis -147bp bezogen auf ATG). Zwei weitere GC-Boxen befinden sich der Tandem-GC-Box vorgeordnet (-239 bis -233bp GC1 und -223 bis -216bp GC2) und eine weitere nachgeordnet (-120 bis -114bp GC4). Darüber hinaus gibt es noch eine nicht-klassische Sp1-Bindungssequenz im proximalen Promotor, die als GC5-Box bezeichnet wird. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass Mutationen in der GC4-Box oder der Tandem-GC-Box zu Repressionen führen, wohingegen Mutationen der GC5-Box Aktivierung hervorrufen [9] (Abb. 29) (s.1.1.2.2).

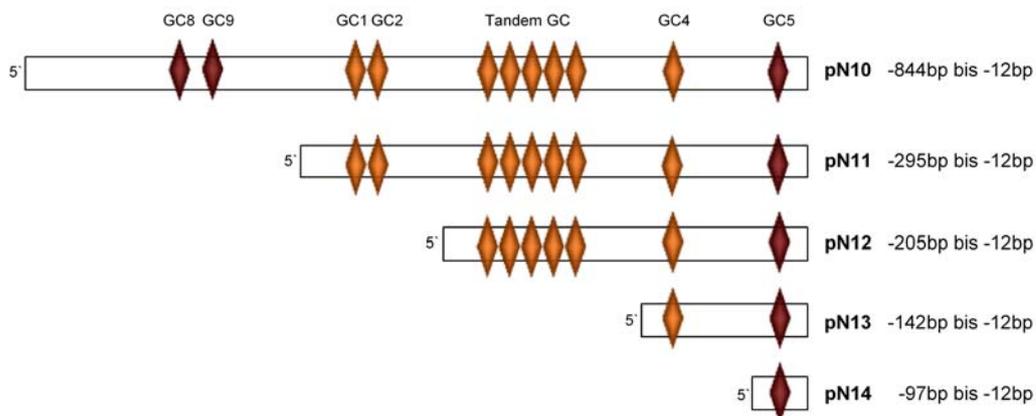


Abbildung 29: Schematische Darstellung der 5-LO-Promotorkonstrukte pN10-pN14; pN10 bis pN14 sind Deletionsmutanten des 5-LO-Promotors, die kontinuierlich verkürzt wurden. Markiert sind die GC-Boxen, an denen der Transkriptionsfaktor Sp1 binden kann.

Der induktive Einfluss von IE1 auf den 5-LO-Promotor, der im Reporterassay auf pN10 gezeigt werden konnte (Abb. 18), sollte daraufhin im Hinblick auf den möglichen Einfluss von Sp1 an unterschiedlichen Promotordelensionskonstrukten getestet werden (Abb. 30).

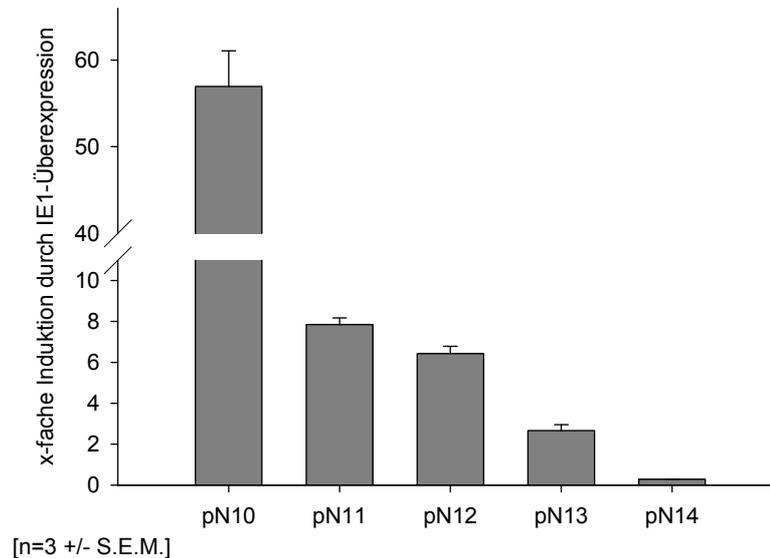


Abbildung 30: Induktion unterschiedlicher 5-LO-Promotorkonstrukte durch IE1-Überexpression in HFF; Die Zellen wurden mit den Deletionsmutanten pN10-pN14 (1,5µg pro well) sowie 187,5ng Expressionsplasmid für IE1 transfiziert und die Luciferaseaktivität 72h nach Transfektion bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten.

Die sukzessive Verkürzung der Promotorsequenz führte zu einer zunehmenden Verminderung des induktiven Effektes durch IE1. Das Konstrukt pN10 wurde durch IE1 am stärksten induziert. Eine 57fach stärkere Promotoraktivierung als durch das Leerplasmid pCGN war festzustellen. Die Deletion zu pN11 umfasst einen recht großen Bereich in dem u.a. zwei GC-Boxen (GC6 und GC7) liegen, was sich auch in einer deutlichen Reduktion der Promotoraktivität auf 7,8fach widerspiegelt. Im Übergang zu pN12 gehen die GC-Boxen GC1 und GC2 verloren, was sich allerdings kaum auf den durch IE1 vermittelten Promotoreffekt ausübte (6,4fache Induktion). Der nächsten Deletionsmutante pN13 fehlt die Tandem-GC-Box, die Induktion verringert sich auf 2,6fach. pN14 enthält nur noch einen sehr kleinen Promotorbereich mit einer GC-Box (GC5). Die Deletion der GC4-Box führte zum endgültigen Verlust der promotoraktivierenden Wirkung von IE1 (0,28fach).

Um nähere Aussagen über die Abhängigkeit des induktiven IE1-Effektes von Sp1 und damit der Bindung an die jeweiligen GC-Boxen zu treffen, wurden weitere Deletionskonstrukte im Reporter-genassay getestet. Die verwendeten Plasmide weisen selektive Mutationen einzelner GC-Boxen auf. In dem Konstrukt pN10GC4 beispielsweise wurde gezielt die GC4-Box in der pN10 Promotorsequenz mutiert, sodass die Sp1-Bindung an diese GC-Box nicht mehr erfolgen kann. Interessanterweise zeigte sich, dass durch die Mutation der GC4-Box (-120 bis -114bp) der induktive IE1-Effekt nahezu komplett verloren ging, wohingegen die Mutation der nicht klassi-schen GC5-Box kaum einen Einfluss auf die Aktivität ausübte (Reduktion von 56facher auf 46fache Induktion). Dieser Effekt bestätigte sich auch in dem verkürzten Promotorfragment pN13. Der induktive Effekt wurde durch Mutation der GC4-Box von 2,6fach auf 0,24fach redu-ziert. Die Mutation der GC5-Box führte nur zu einer geringeren Repression auf 2,1fach (Abb. 31).

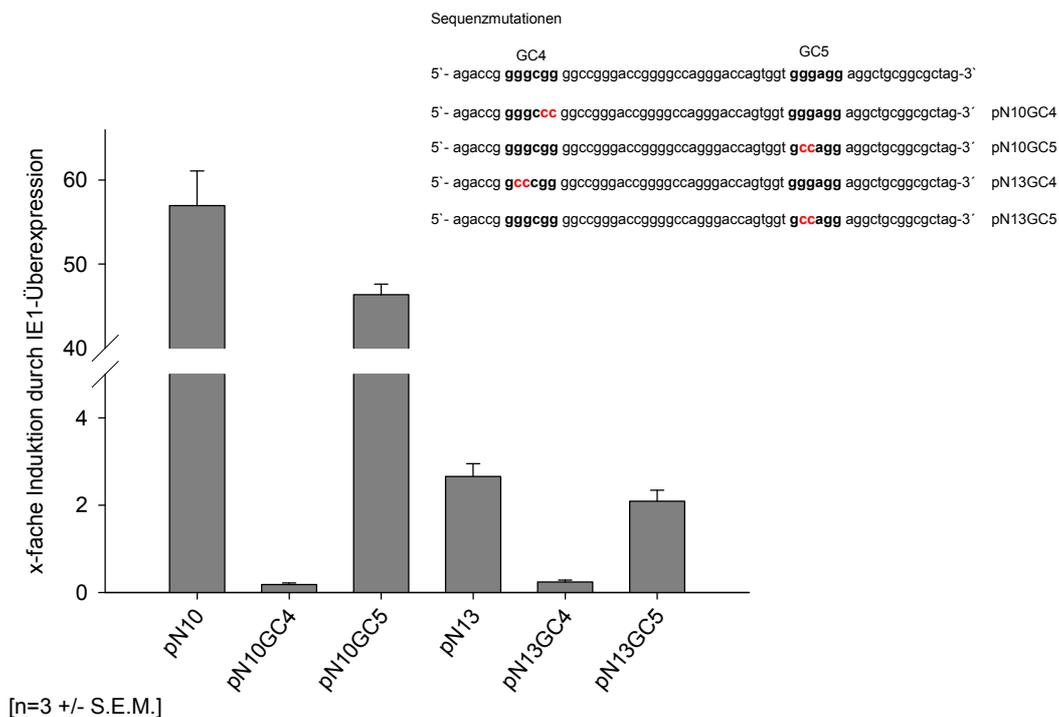


Abbildung 31: Induktion von 5-LO GC-Boxmutanten nach Überexpression von IE1 in HFF; Die Zellen wurden mit Deletionsmutanten unterschiedlicher GC-Boxen des 5-LO-Promotors sowie dem Expressionsplasmid für IE1 transfiziert. Die Luciferaseaktivität wurde 72h nach Transfektion bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten. Ausschnitte der 5-LO-Promotorsequenzen erläutern die vorge-nommenen Mutationen.

4.2.3 Einfluss von Mithramycin auf die Induktion des 5-LO-Promotors durch IE1

Mithramycin ist ein Polyketid, das von dem Bakterium *Streptomyces argillaceus* [576] produziert wird (Abb. 32). Es fungiert als DNS-Interkalator und inhibiert die Sp1-DNS-Interaktion durch Bindung an GC-reiche Chromatinregionen [576, 577].

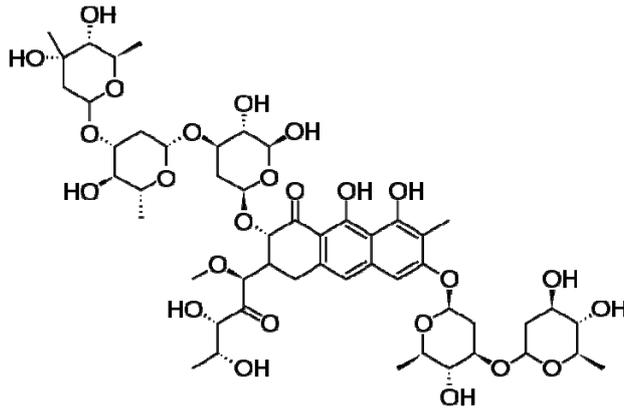


Abbildung 32: Strukturformel von Mithramycin

Im Reporterassay wurde getestet, ob der Zusatz von Mithramycin Einfluss auf den durch IE1 vermittelten induktiven Effekt auf den 5-LO-Promotor zeigt, und dieser damit Sp1-abhängig ist. HFF wurden mit pN10 und IE1 cotransfiziert und gleichzeitig mit unterschiedlichen Mithramycin-konzentrationen (25 nM, 30 nM, 35 nM) inkubiert. Das Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt und erneut Mithramycin zugesetzt. Die Luciferaseaktivitätsmessung erfolgte nach 60 Stunden.

Es zeigte sich, dass es durch Zusatz von Mithramycin zu einer signifikanten Verringerung des induktiven Effektes kam. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, die mit pN10 und IE1 cotransfiziert, nicht aber mit Mithramycin behandelt wurde, sank die Induktion nach Inkubation mit 25 nM Mithramycin auf 60% ab. Bei 30 nM zeigte sich eine Reduktion auf 58%, die bei 35 nM wieder leicht anstieg auf 70% (Abb. 33).

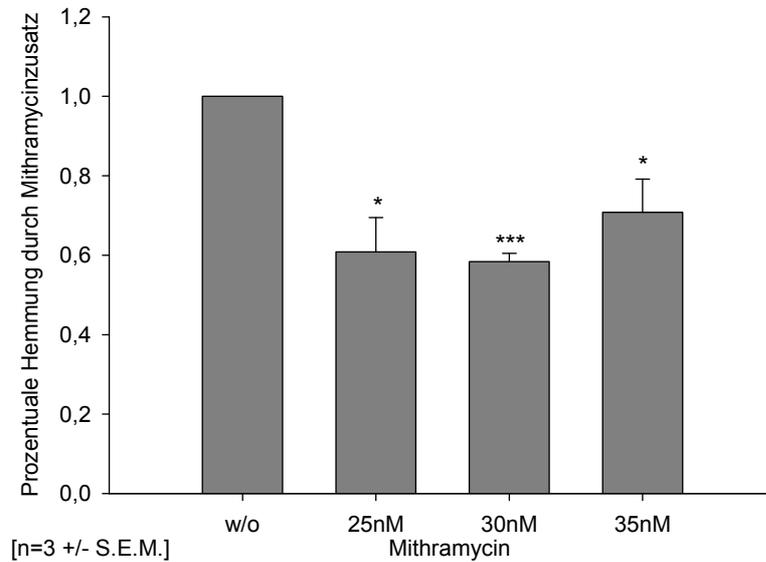


Abbildung 33: Hemmung des IE1-vermittelten induktiven Effekts auf pN10 durch Mithramycinzusatz; Die Zellen wurden mit pN10 und IE1 bzw. dem entsprechenden Leerplasmid pCGN cotransfiziert und mit Mithramycin behandelt. Alle 24h erfolgte ein Medienwechsel mit erneuter Zugabe von Mithramycin. Die Luciferaseaktivität wurde nach 60h gemessen. Die Darstellung zeigt die Induktion von pN10 durch IE1 bezogen auf das Leerplasmid und normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle als Mittelwert \pm S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten.

4.2.4 5-LO-Promotoraktivität in Abhängigkeit von Sp1-Überexpression

Um den Einfluss von Sp1 weiter zu untersuchen, wurde ein Reporterassay durchgeführt, bei dem zusätzlich zu IE1 Sp1 überexprimiert wurde. Die transfizierte Gesamt-DNS-Menge wurde stets konstant gehalten und gegebenenfalls mit dem Leerplasmid pSG5 aufgefüllt. Steigende Mengen an Sp1-Expressionsplasmid (125 ng, 178,5 ng und 375 ng) sorgten dafür, dass die Promotoraktivität unter IE1-Cotransfektion zunahm. Der reine Effekt von IE1, eine 21fache Induktion erhöhte sich signifikant auf 26fach (125 ng), 43fach (178,5 ng) und schließlich 51fach (375 ng). Diese Regulation war allerdings nur unter Cotransfektion des viralen Proteins erkennbar, in Kombination mit dem entsprechenden Leerplasmid pCGN fand keine Induktion von pN10 statt, was darauf schließen lässt, dass IE1 zusätzliche regulative Funktionen besitzt, die für die Promotoraktivierung essentiell sind (Abb. 34).

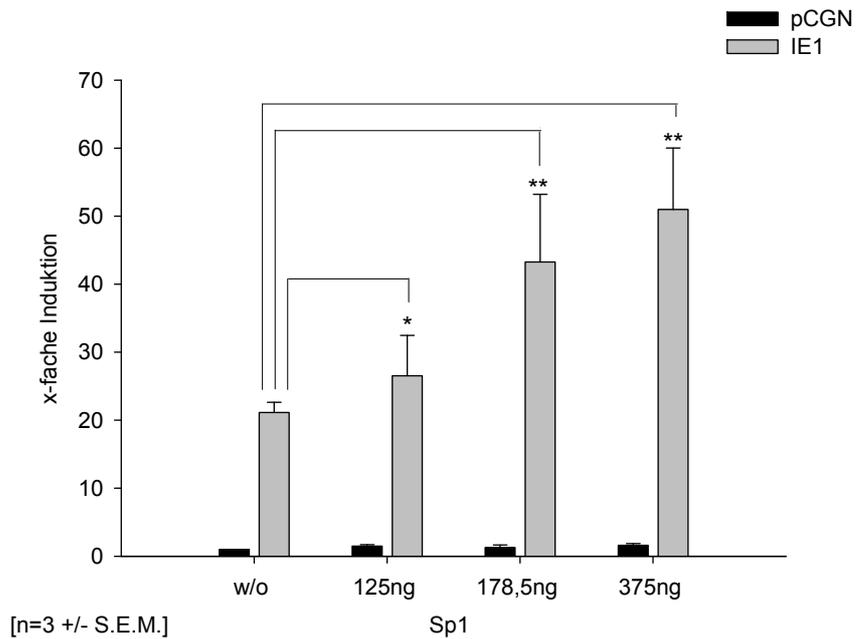


Abbildung 34: Induktion von pN10 nach Überexpression von IE1 und steigenden Mengen Sp1 in HFF; Die Zellen wurden transfiziert und nach 60h die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Abbildung zeigt die Induktion über pSG5, dem Leerplasmid des Sp1-Expressionsplasmides, wobei stets die Gesamt-DNS-Menge konstant gehalten wurde. Dargestellt sind Mittelwerte +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten.

Zur Kontrolle der vorhandenen Sp1-Menge erfolgte ein Western Blot, der das zelluläre Sp1-Level nach Überexpression widerspiegelt. Das Sp1-Proteinlevel nahm mit steigender Sp1-Plasmidkonzentration zu (Abb. 35).

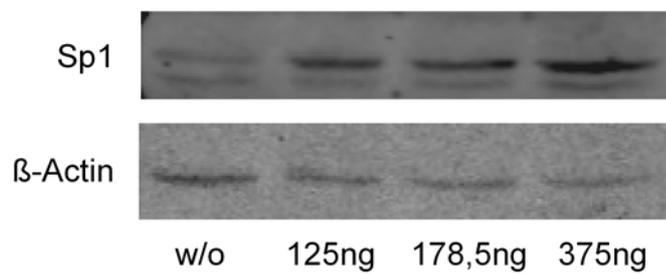


Abbildung 35: Western Blot der Sp1-Proteinlevel nach Überexpression in HFF; Zellen wurden mit variierenden Mengen an Sp1-Expressionsplasmid (125 ng, 178,5 ng, 375 ng pro well) transfiziert, nach 48h lysiert und auf Sp1 geblottet.

4.2.5 Transaktivierende Eigenschaften der Immediate Early Deletionsmutanten

Immediate Early 1 und Immediate Early 2 sind die beiden am stärksten exprimierten viralen Immediate Early Proteine des humanen Cytomegalovirus. Strukturell handelt es sich um Spleißvarianten der gleichen Transkriptions-Initiations-Site [256], die als gemeinsame Sequenz Exon 2 und Exon 3 teilen. Das Exon 1 wird weder in IE1 noch in IE2 translatiert. Der Unterschied besteht im darauf folgenden Exon 4 bzw. 5. Funktionell ist für das, in Immediate Early 1 vorhandene Exon 4, eine ATP-Bindungsstelle charakterisiert [384], die sich in Exon 5 nicht findet. Um zu testen, ob dieses Strukturelement ausschlaggebend für den induktiven Effekt ist, wurden Deletionsmutanten erzeugt und im Reportergenassay auf die Fähigkeit überprüft, pN10 zu induzieren (Abb. 36).

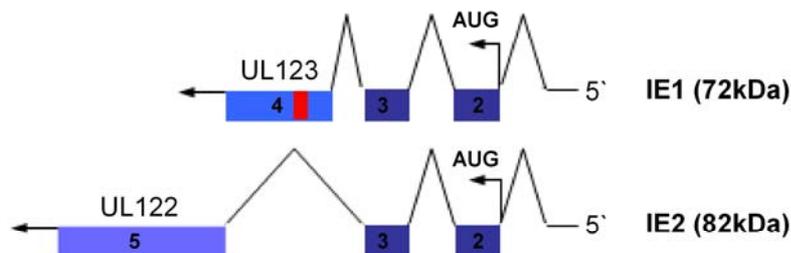


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Spleißvarianten IE1 und IE2; IE1 setzt sich aus den Exons 2,3 und 4 zusammen, wobei im Letzteren die ATP-Bindungsstelle lokalisiert ist (rot), IE2 dagegen beinhaltet Exon 2,3 und 5.

Sowohl die Deletion der Exons 2 und 3 (IE1 Δ 2-3) als auch die Deletion des Exon 4 (IE1 Δ 4) riefen eine Reduktion des induktiven Effekts hervor. Der Verlust der Exons 2 und 3 minderte signifikant die Promotoraktivität auf 10% des ursprünglichen IE1-vermittelten Effektes, die Deletion des Exon 4 auf 15%. Interessanterweise zeigte die Mutante IE1 Δ ATP, bei der gezielt die ATP-Bindungsstelle mutiert wurde nur noch 50% Restaktivität, was dafür spricht, dass diese funktionelle Domäne einen entscheidenden Einfluss auf die 5-LO-Promotoraktivierung hat. Allerdings scheint die Regulation nicht gänzlich von der ATP-Bindungsstelle bzw. dem Exon 4 gesteuert zu sein. Die IE2-homologen Sequenzen des Exon 2 und 3 sind ebenfalls essentiell für die Induktion,

es kann also davon ausgegangen werden, dass die Effektvermittlung auf den 5-LO-Promotor nicht nur durch eine ATP-vermittelte Aktivierung zustande kommt (Abb. 37).

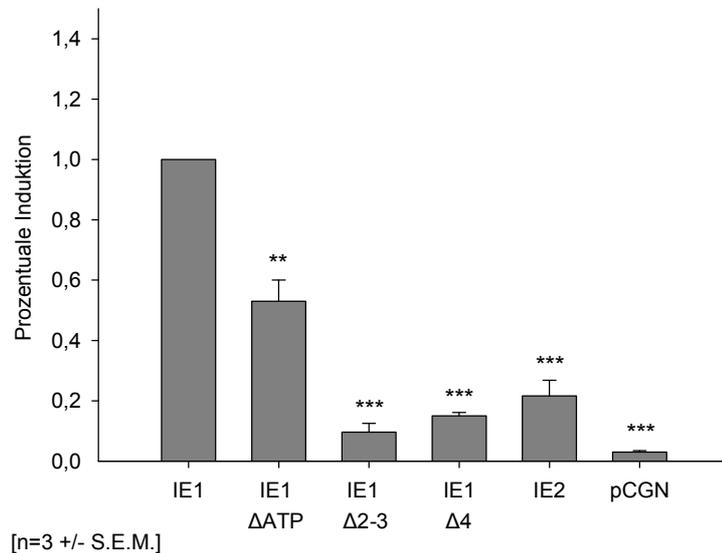


Abbildung 37: Induktion des 5-LO-Promotorfragments pN10 durch Überexpression von IE1, IE2 bzw. deren Deletionsmutanten in HFF; Die Zellen wurden mit pN10 und unterschiedlichen Expressionsplasmiden für IE1, IE2 bzw. deren Deletionsmutanten transfiziert. Nach 60h erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. Die Messwerte zeigen die Induktion des 5-LO-Promotorfragments pN10 normiert auf den durch Immediate Early 1 hervorgerufenen Effekt. Dargestellt sind Mittelwerte +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten.

4.2.6 Interaktion von Sp1 mit Immediate Early Proteinen

Es ist bekannt, dass Immediate Early Proteine des HCMV mit Transkriptionsfaktoren funktionell interagieren können [387]. Um zu Testen, ob es zu Protein-Protein-Interaktionen zwischen Sp1 und den unterschiedlichen Immediate Early Varianten kommt, wurde eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) zwischen Sp1 und IEP in überexprimierten HFF durchgeführt (Abb.38). Die Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Sp1 und den jeweiligen viralen Proteinen bzw. den entsprechenden Leerplasmiden als Kontrolle cotransfiziert und mit Antikörpergelabelten *Beads* immunopräzipitiert. Die Eluate der Sp1-*Beads* wurden auf Immediate early-Proteine geblottet und umgekehrt um eine Interaktion nachzuweisen.

Die Co-IP zeigte, dass sowohl zwischen IE1 und Sp1 als auch zwischen IE2 und Sp1 zu einer Interaktion kommt. Es zeigte sich jedoch auch, dass die Deletionsmutante IE1 Δ ATP ebenfalls in der Lage ist, Sp1 in geringem Maß zu binden.

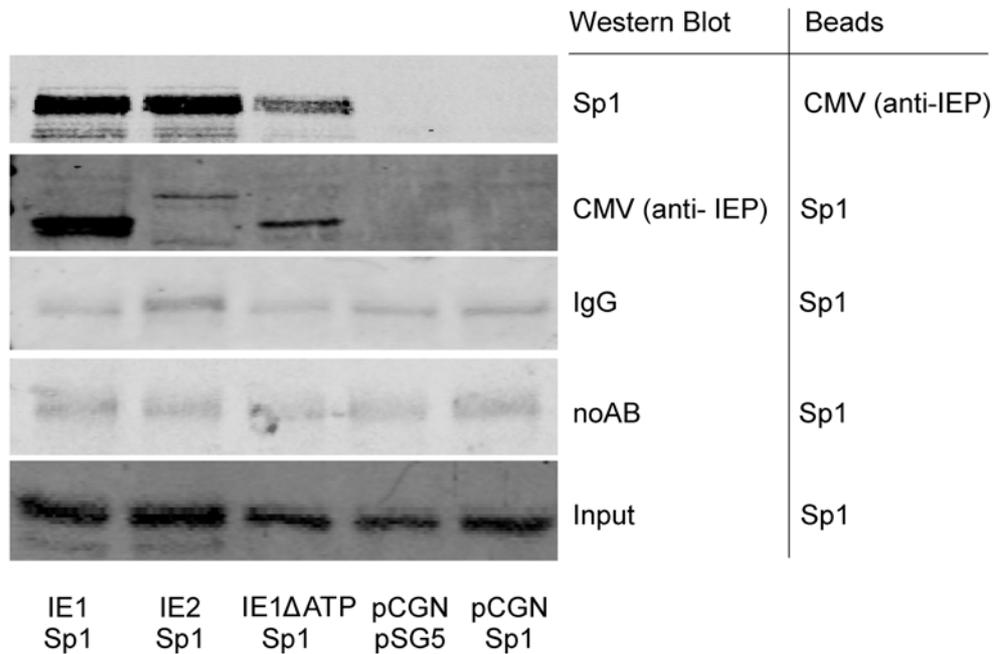


Abbildung 38: Interaktion zwischen IEP und Sp1 in überexprimierten HFF; Die Zellen wurden mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transfiziert und nach 24h geerntet. Die zellulären Extrakte wurden mit gelabelten *Beads* (Sp1, CMV, IgG, *noAB*) inkubiert, präzipitiert und anschließend auf den jeweiligen Interaktionspartner geblottet. Zusätzlich erfolgt eine Input Kontrolle mit dem zellulären Extrakt.

4.2.7 Zelluläres phospho-Sp1-Level nach Expression von IEP

Immediate Early 1, nicht aber Immediate Early 2, ist in der Lage den 5-LO-Promotor zu aktivieren und damit 5-LO zu induzieren (Abb. 18). Da beide viralen Proteine mit Sp1 interagieren (Abb. 38), liegt die Vermutung nahe, dass der Unterschied in der induktiven Fähigkeit durch funktionelle Eigenschaften von Immediate Early 1 reguliert wird. Zur Überprüfung, ob der Phosphorylierungsstatus von Sp1 durch die Immediate Early Proteine unterschiedlich beeinflusst wird, erfolgte ein Western Blot auf phospho-Sp1 (Abb. 39)

Im Western Blot zeigte sich, dass nach Immediate Early 1-Überexpression das phospho-Sp1-Level im Vergleich zur Leerplasmidkontrolle pCGN zellulär anstieg. Immediate Early 2 hingegen beeinflusste den Phosphorylierungsstatus von Sp1 nicht. Darin könnte der Unterschied der 5-LO-Regulation von IE1 und IE2 liegen. Auch die Deletionsmutanten waren nicht in der Lage, Sp1 in dem Ausmaß wie Immediate Early 1 zu phosphorylieren.

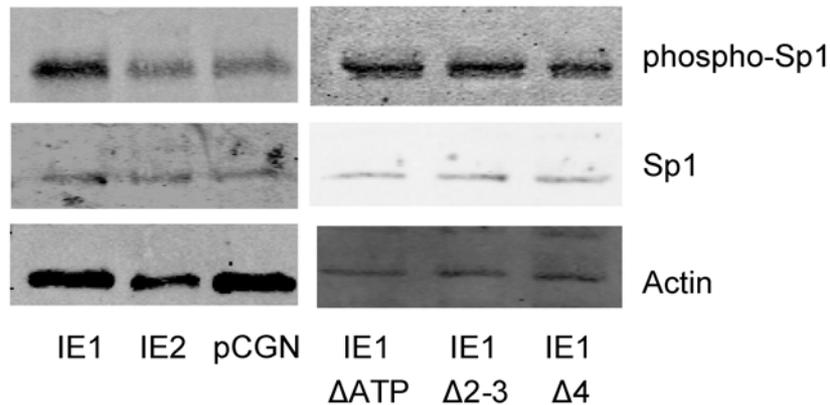


Abbildung 39: Western Blot in humanen Vorhaut-Fibroblasten auf das phospho-Sp1-Level nach Immediate Early Protein-Überexpression; Überexprimierte HFF wurden nach 48h mittels Pierce Phospho-Protein Enrichment Kit aufgereinigt und auf Sp1, phospho-Sp1 und β -Actin geblottet.

4.2.8 Untersuchung der direkten Phosphorylierung von Sp1 durch IE1

Ob eine direkte Phosphorylierung von Sp1 durch IE1 erfolgt, sollte in einem *in vitro* Kinase Assay abgeklärt werden. Der Versuchsaufbau orientierte sich an der Veröffentlichung von Pajovic et al., die mittels dieses Assays eine Autophosphorylierung von IE1 nachweisen konnte [384]. Der Assay wurde freundlicherweise von Dr. Michael Ermisch (AK Prof. Steinhilber) durchgeführt. Bei Inkubation der bakteriell-exprimierten Proteine IE1 bzw. IE2 (s. Anhang) mit rekombinantem Sp1 aus humanen Zellen (Abb. 40A) zeigte sich in der Kombination IE1 und Sp1 eine radioaktive Bande auf Höhe von phosphoryliertem Sp1 (85 kDa), allerdings keine Bande der erwarteten Autophosphorylierung von IE1 bei 72 kDa. In Wiederholungsexperimenten war teilweise die IE1-Autophosphorylierung sichtbar (Abb. 40B), allerdings dann keine Sp1-Phosphorylierung, sodass man zu dem Schluss kommen muss, dass das Ergebnis des *in vitro* Kinase Assays außerhalb

des zellulären Kontexts keine reproduzierbaren Daten liefert und eine direkte Phosphorylierung eher unwahrscheinlich ist.

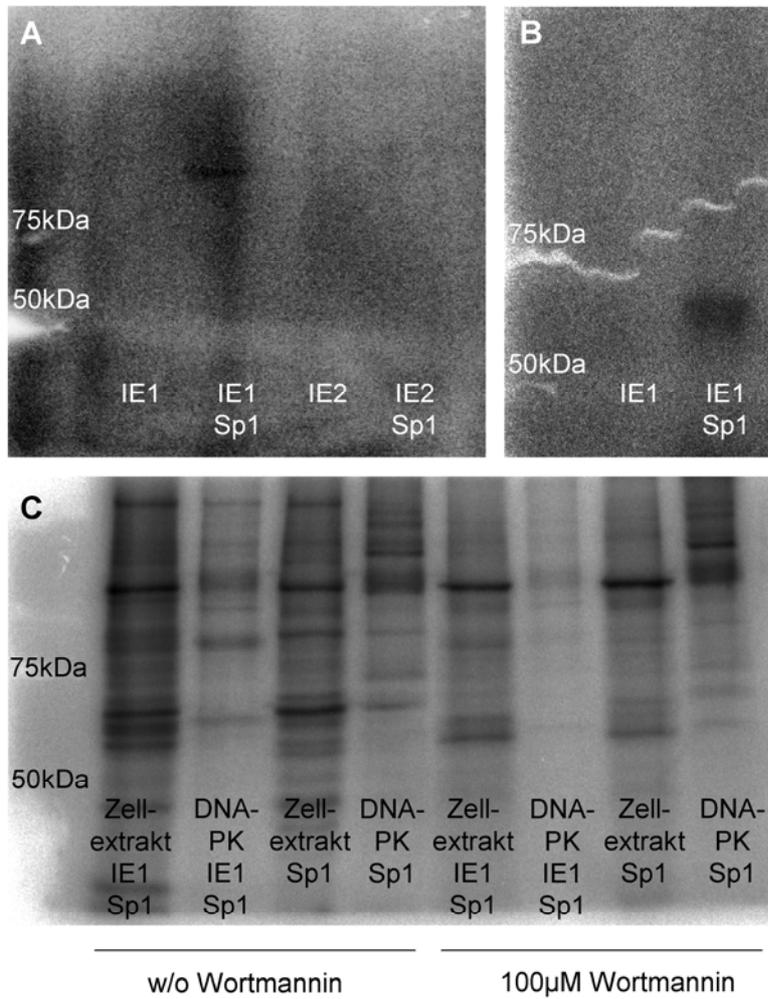


Abbildung 40: *In vitro* Kinase Assay; Inkubation von bakteriell-aufgereinigtem IE1 und rekombinatem Sp1 mit radioaktivem ATP (A und B) bzw. zusätzlicher Zusatz von Ganzzellextrakt aus HFF oder rekombinanter DNS-abhängige Proteinkinase ohne und mit 100 µM Wortmannin (C).

Um eine Aussage über die Phosphorylierung im zellulären Kontext oder deren Abhängigkeit von der DNS-abhängigen Proteinkinase zu treffen, wurde zusätzlich zu den aufgereinigten Proteinen Ganzzellextrakt aus humanen Vorhaut-Fibroblasten beziehungsweise rekombinante DNS-abhängige Proteinkinase zugesetzt (Abb. 40C). Chun et. al konnten zeigen, dass das Tat-1 Protein des humanen Immunodefizienz-Virus-1 eine Sp1-Phosphorylierung über DNS-PK hervorrufen kann [578]. HIV Tat-1 und HCMV IE1 sind beides virale Proteine die unmittelbar nach Viruseintritt in die Zelle exprimiert werden. DNS-PK stellt damit eine potentielle Kinase dar, die in den Regulationsmechanismus involviert sein könnte. Es zeigte sich, dass auch hier kein interpretierbares Ergebnis im *in vitro* Kinase Assay erzielt werden konnte, da es durch Kombination mit dem Ganzzellextrakt zu einer Vielzahl von Phosphorylierungen kam und eine Zuordnung der Banden nicht möglich ist. Auch die Inkubation der drei Reinproteine Sp1, IE1 und DNS-PK lieferte ein starkes Bandenmuster, das nicht mit den Molekulargewichten der Einzelproteine übereinstimmt. Ein Zusatz von 100 μ M Wortmannin (Abb. 40C Spur 5-8), einem Inhibitor der PI3-Kinasen sowie DNS-abhängige Proteinkinase [579] schwächte das Bandenmuster zwar ab, allerdings kam es nicht zur Verhinderung der Phosphorylierung einer definierten Bande. Der Assay ist nicht geeignet, um eine Aussage über den Phosphorylierungsmechanismus von Sp1 durch Immediate Early 1 zu treffen, da dieser wahrscheinlich über zelluläre Kinasen vermittelt wird.

4.2.9 Abhängigkeit des induktiven IE1-Effektes von Wortmannin

Wortmannin wird vom Pilz *Penicillium funiculosum* synthetisiert und inhibiert irreversibel Phosphoinositid-3-Kinasen [579-581] durch kovalente Bindung an der ATP-Bindungsstelle der Kinase (Abb. 41). Die Familie der PI3K kann in drei Klassen unterteilt werden: I, II und III. Die PI3-Kinasen phosphorylieren die 3'-Inositol-Position unterschiedlichster membranassoziierter Phosphatidylinosole und sorgen so für die Generierung spezifischer *Lipid second Messenger* [582].

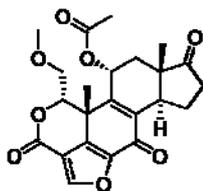


Abbildung 41: Strukturformel von Wortmannin

Eine Aktivierung von PI3-Kinasen führt nachgeordnet unter anderem zur Aktivierung der Seronin-Threonin-Kinase Akt und es kann weiterhin zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Sp1 kommen [583]. Die DNS-abhängige Proteinkinase wird ebenfalls von Wortmannin gehemmt, obwohl sie klassischer Weise nicht zu den PI3Ks gehört sondern lediglich durch eine signifikante Sequenzhomologie in der katalytischen Domäne mit PI3K-verwandt ist [584]. Es ist bekannt, dass die DNS-abhängige Proteinkinase eine Sp1-Kinase darstellt, die außerdem weitere Transkriptionsfaktoren und auch die carboxyterminale Domäne der RNS-Polymerase II phosphorylieren kann [585]. Vorhergehende Veröffentlichungen haben des Weiteren gezeigt, dass das virale Protein Tat-1 des HI-Virus (HIV-1) Sp1 phosphoryliert über die Rekrutierung eben dieser Kinase [578]. Da eine direkte Inkubation von rekombinanter DNS-abhängiger Proteinkinase mit Sp1 und IE1 im *in vitro* Kinase Assay keine reproduzierbaren Ergebnisse geliefert hatte (Abb. 40C), wurde der Zusatz des DNA-PK-Inhibitors Wortmannin im zellulären Kontext getestet. Humane Vorhaut-Fibroblasten wurden mit dem 5-LO-Promotorfragment pN10 und IE1 cotransfiziert und Wortmannin (1-20 μ M) zugesetzt. Die verwendeten Konzentrationen orientierten sich an der Veröffentlichung von Chun et. al. [578].

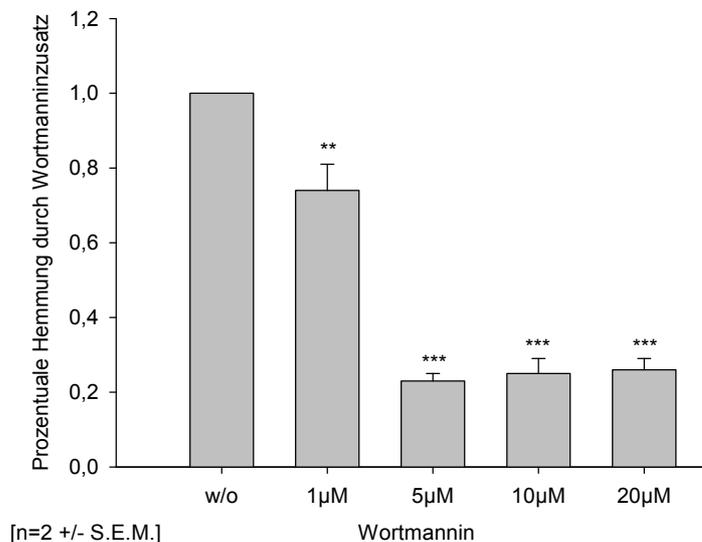


Abbildung 42: Induktion von pN10 nach IE1-Überexpression in HFF unter Wortmanninzusatz; Die Zellen wurden mit pN10 und IE1 bzw. pCGN transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen Wortmannin behandelt. Nach 60h erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. Die Messwerte zeigen die Abhängigkeit der Induktion des 5-LO-Promotorfragments pN10 von Wortmanninzugabe normiert auf den durch Immediate Early 1 hervorgerufenen Effekt über dem Leerplasmid pCGN. Dargestellt sind Mittelwerte +/- S.E.M aus zwei unabhängigen Experimenten.

Wortmannin hemmte signifikant und konzentrationsabhängig die IE1-vermittelte Induktion des 5-LO-Promotors. 5 μ M Wortmannin verringerten die Promotoraktivierung um 80%. Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich um eine indirekte Sp1-Phosphorylierung durch Immediate Early 1 zu handeln scheint, die durch einen Inhibitor der PI3-Kinasen hemmbar ist (Abb. 42).

4.2.10 Untersuchung der Interaktion von DNS-PK und IE1

Die postulierte Interaktion zwischen HIV-1 Tat-1 und der DNS-abhängigen Proteinkinase sieht unter anderem eine direkte Protein-Protein Bindung vor (Abb. 43). Da die Interaktion zwischen Sp1 und IE1 bereits in den Immunoprecipitationsversuchen gezeigt werden konnte (Abb. 38), wurde mittels *GST-Pull-down* eine mögliche Interaktion zwischen der DNS-abhängigen Proteinkinase und IE1 untersucht.

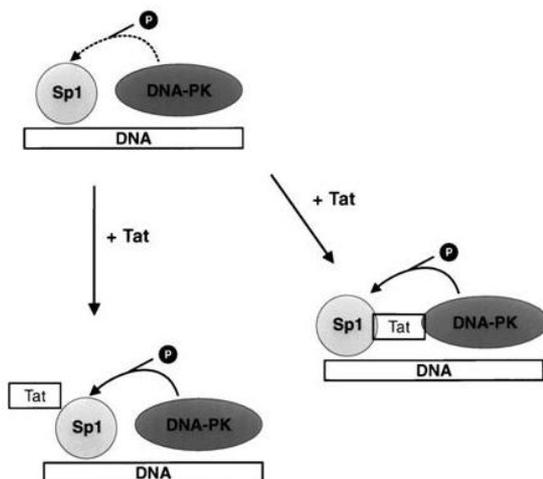


Abbildung 43: Postulierte Interaktion zwischen HIV-1 Tat-1 und Sp1/DNS-PK nach Chun et. al. [578]

Das bakteriell-exprimierte Immediate Early 1 Protein wurde mit Ganzzellextrakt aus HEK293T bzw. HFF inkubiert und mittels des fusionierten GST-tags ein *Pull-down* durchgeführt. Der anschließende Western Blot auf das potentielle Bindungsprotein DNS-abhängige Proteinkinase lieferte allerdings keinen Nachweis der Bindung (Abb. 44A). Als Input- und Methodenkontrolle des Western Blots wurden die Ausgangslysate auf die Anwesenheit der DNS-PK geblottet (Abb.

44B). Es zeigte sich, dass der endogene Spiegel in HEK293T sehr niedrig ist und der Protein-nachweis lediglich in HFF gelingt. Eine direkte Interaktion zwischen Immediate Early 1 und DNS-PK war im *Pull-down*-Experiment nicht nachweisbar.

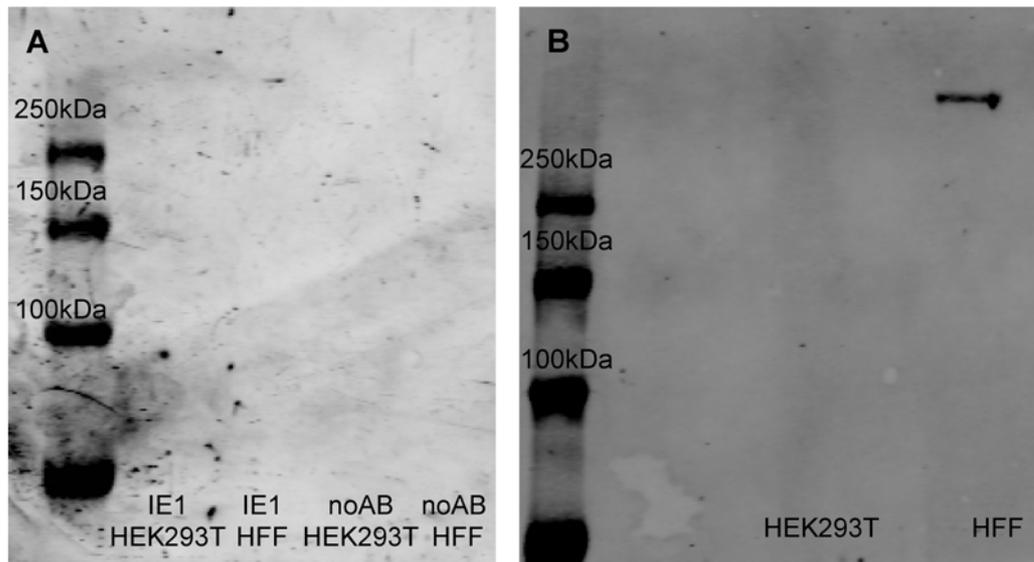


Abbildung 44: Western Blot zur Kontrolle der Interaktion zwischen IE1 und DNS-PK; (A) Western Blot der *Pull-down* Proben auf DNS-abhängige Proteinkinase (460 kDa); (B) Western Blot auf DNS-abhängige Proteinkinase der Gesamtzelllysate

4.2.11 Untersuchung der Kinase-vermittelten Phosphorylierung von Sp1 durch IE1

Die durch Immediate Early 1 verstärkte Sp1-Phosphorylierung scheint durch zelluläre Kinasen vermittelt zu werden. Einen Einfluss haben dabei unter anderem die PI3-Kinasen (PI3K), da der Effekt auf den 5-LO-Promotor durch Zugabe des Inhibitors Wortmannin hemmbar ist (Abb. 42). Um ferner zu testen, ob und wenn ja welche weiteren Kinasen an der Aktivierung des 5-LO-Promotors durch IE1 beteiligt sind, wurde ein Proteinkinase-Inhibitor-Screening im Reporterassay auf pN10 durchgeführt.

Die ausgewählten Inhibitoren verschiedenster Kinase-Signalwege:

Tabelle 10: Proteinkinase-Inhibitoren

Substanz	Signalweg	IC ₅₀	Quellen
Triciribine	Akt (Proteinkinase B)-Inhibitor	20 nM	[586, 587]
SL327	MEK1 / MEK2-Inhibitor	180 nM / 220 nM	[588-590]
Apigenin	MAPK / ERK-Inhibitor	30 µM	[240, 591-595]
PD169316	p38 MAPK-Inhibitor	89 nM	[596]
Chelerythrine	PKC-Inhibitor	0,66 µM	[597-602]
H-8	PKA / PKG-Inhibitor	1200 nM / 500 nM	[603, 604]
SU4312	VEGFR / PDGFR-Inhibitor	0,8 µM / 19,4 µM	[70, 605]
Roscovitin	CDK1 / CDK2 / CDK5 / CDK4+6-Inhibitor	0,65 µM / 0,7 µM / 0,2 µM / >100 µM	[606-609]
SP600125	JNK-Inhibitor	40-90 nM	[610-613]
LiCl	GSK3β-Inhibitor	20 mM	[614, 615]

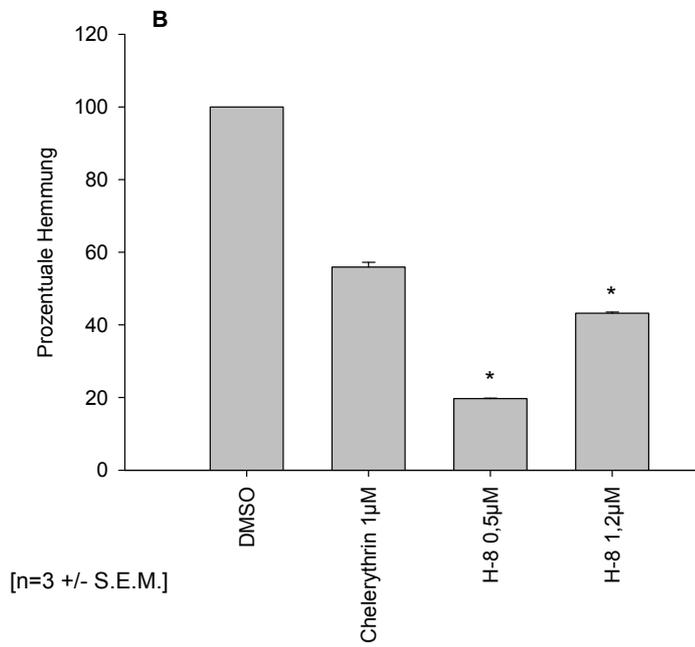
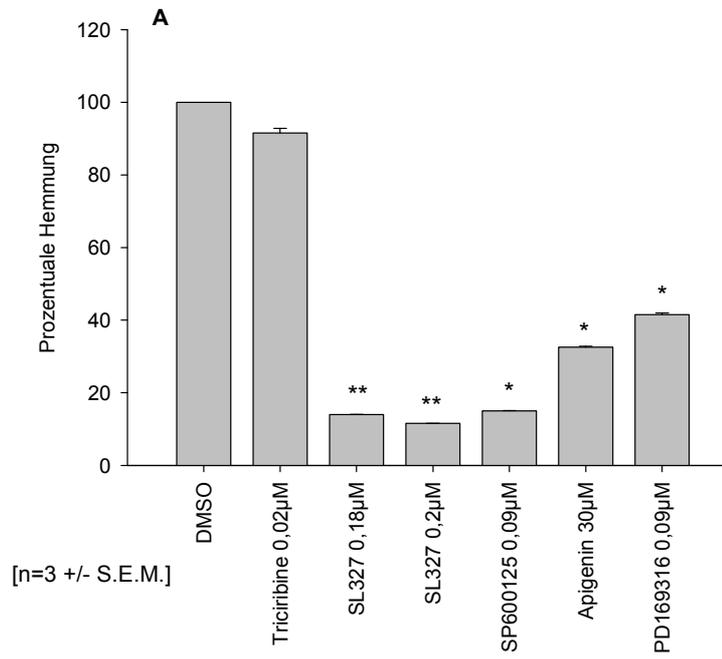
Es zeigte sich, dass einige Inhibitoren in der Lage waren, die Aktivierung des 5-LO-Promotors signifikant zu hemmen. Die erste Gruppe getesteter Substanzen umfasst Triciribine, einen Akt-, der anders als Wortmannin später in die Phosphorylierungskaskade der PI3-Kinasen eingreift, und Stoffe die den MAP-Kinaseweg inhibieren. Dieser Signalweg reguliert vielfältige Funktionen in der Zelle wie die Transkriptionsaktivierung, Proteinsynthese, Zellzyklus, Differenzierung [616] und kann durch unterschiedlichste Stimuli unter anderem auch virale Infektionen [491, 492, 617] induziert werden. Die MAP-Kinasen sind Seronin-Threonin-Kinasen und können in drei Klassen

unterschieden werden: ERK, p38, MAPK und JNK. Die hier verwendeten Stoffe sind der MEK1/2-Inhibitor SL327, Apigenin als MAPK/ERK-Inhibitor, JNK-Inhibitor SP600125 und der p38-Inhibitor PD169319. In Abbildung 45A sieht man, dass alle vier getesteten MAPK-Inhibitoren in der Lage waren, die Aktivität zu hemmen, während Triciribine-Zusatz nicht inhibierend wirkte.

Eine weitere getestete Klassen sind die Inhibitoren der Proteinkinasen PKC, PKA und PKG. Die hier verwendeten Stoffe sind Chelerythrine und H-8 (Abb. 45B). Chelerythrine ist ein PKC-Inhibitor, die Proteinkinase C kann unter anderem die sogenannten MARCKS-Proteine (myristil-liertes Alanin-reiches C- Kinase Substrat) modifizieren. Diese Proteine sind in der Zellmembran verankert und steuern physiologische Vorgänge wie Zellbewegung, Sekretion und Membran-transport [618]. Die Hemmung der PKC hat keinen signifikanten Einfluss auf den induktiven Effekt von Immediate Early 1 auf den 5-LO-Promotor. H-8 wirkt konzentrationsabhängig auf die PKG und PKA. Die Proteinkinase G phosphoryliert nach Bindung von cGMP und reguliert die zytosolische Calcium-Konzentration der Zelle [619]. PKA wird durch cAMP aktiviert und greift vorrangig in die Regulation der Energiestoffwechsels ein. Hemmung der PKA und PKG durch H-8 führen zur verminderten 5-LO-Promotoraktivierung (Abb. 45B).

SU4312 ist ein Inhibitor von VEGFR und PDGFR. VEGF und PDGF sind involviert in die Regulation von physiologischen Vorgängen wie Vaskulogenese und Angiogenese [534, 537, 544, 545, 605]. Über die Bindung an den PDGFR wird nachgeordnet der PI3-Kinasewegs aktiviert [620]. Im Reporterassay zeigte sich, dass die Zugabe des Inhibitors zu einer signifikanten Reduktion des Effektes auf den 5-LO-Promotor führte (Abb. 45C).

Die letzte getestete Klasse umfasst die Stoffe Roscovitin und Lithiumchlorid. Targets dieser Inhibitoren sind unterschiedlichste Signalwege. Roscovitin inhibiert konzentrationsabhängig die CDK-Aktivität. Es handelt sich hierbei um Seronin-Threonin-Kinasen, die essentiell an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind [621]. Lithiumchlorid als Inhibitor der GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) greift in Regulationsmechanismen wie den Glycogen-Stoffwechsel, Proliferation und Apoptose ein [622]. Die IE1-induzierte 5-LO-Promotoraktivierung konnte durch Roscovitin, nicht aber durch Lithiumchlorid reduziert werden (Abb. 45D).



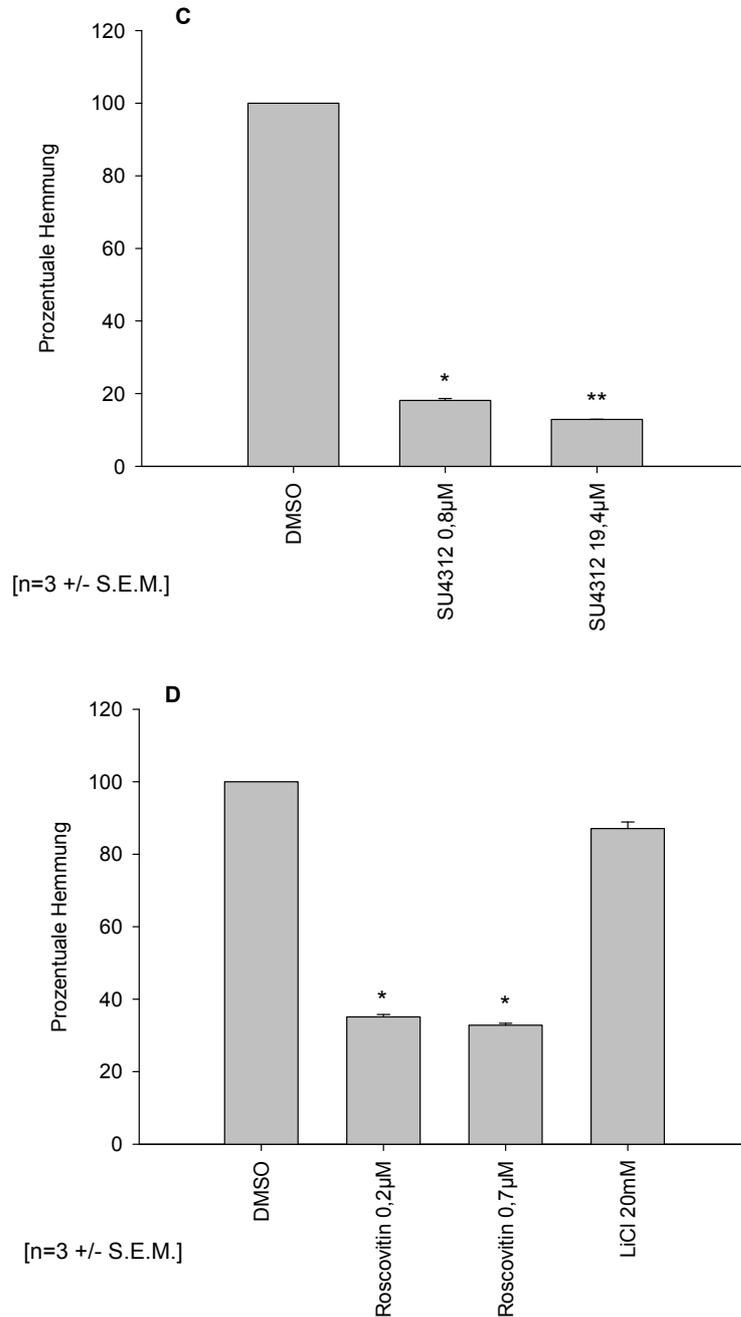


Abbildung 45: Induktion von pN10 nach IE1-Überexpression unter Proteinkinase-Inhibitorzusatz in HFF; Die Zellen wurden mit pN10 und IE1 bzw. pCGN transfiziert und mit unterschiedlichen Proteinkinase-Inhibitoren behandelt. Nach 60h erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. Die Messwerte zeigen die Abhängigkeit der Induktion des 5-LO-Promotorfragments pN10 von der Inhibitorzugabe normiert auf den durch Immediate Early 1 hervorgerufenen Effekt über dem Leerplasmid pCGN. Dargestellt sind Mittelwerte +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Proteinkinase-Inhibitor-Screening gezeigt hat, dass die Regulation des IE1-vermittelten Effekts nicht auf einen Kinaseweg beschränkt werden kann. Wie in der Einleitung beschrieben, sind vielfältige Interaktionsmöglichkeiten zwischen HCMV und der zellulären Regulation über Kinasen bekannt, die in die Effektvermittlung involviert sein könnten. Prominente Effekte zeigen sich bei Inhibition der MAP-Kinasen, PI3-Kinasen sowie PKA und den Thyrosinkinase-Inhibitoren. Allerdings scheint auch Roscovitin als CDK-Inhibitor über die Zellzyklusregulation einen Einfluss zu haben.

4.2.12 Induktiver IE1-Effekt auf 5-LO in HFF Δ Sp1 Zellen

Nachdem über das Proteinkinase-Inhibitor-Screening gezeigt werden konnte, dass eine Vielzahl von zellulären Kinasen an der virale Regulation des 5-LO-Promotors beteiligt sind, sollte durch einen lentiviralen Sp1-*Knock-down* die essentielle Funktion von Sp1 bestätigt werden. Humane Vorhaut-Fibroblasten wurden mit VSVG-basierten Lentiviren transduziert und mittels shRNS die Sp1-Expression herunterreguliert. Die Kontrolle des *Knock-downs* erfolgte über qPCR und Western Blot (Abb. 46A und B). In den transduzierten Zellen zeigte sich sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine deutlich verminderte Expression von Sp1.

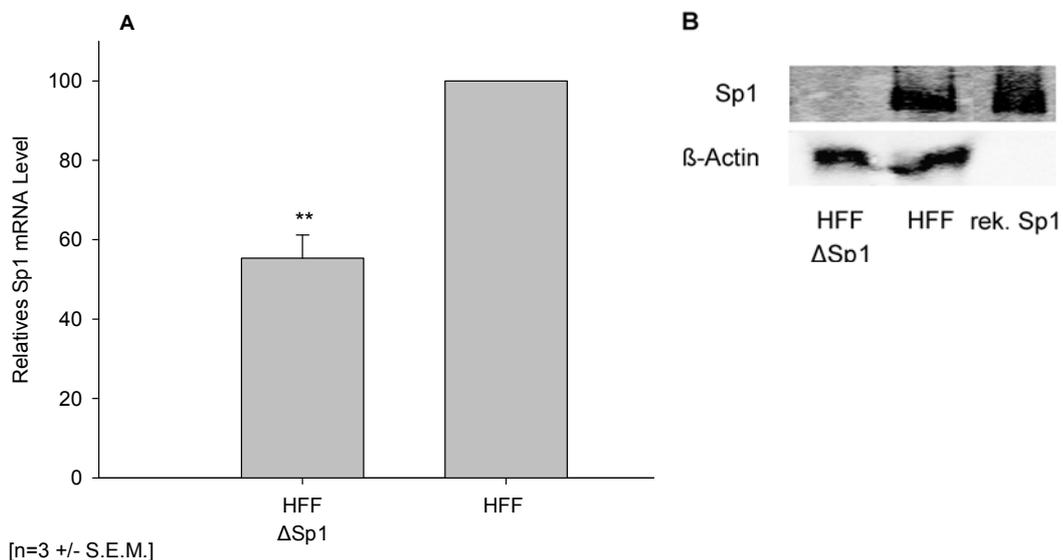


Abbildung 46: Nachweis der Sp1-Defizienz in HFF Δ Sp1 auf mRNA- und Proteinebene; (A) qPCR mit cDNS aus unbehandelten Wildtyp HFF und *Knock down* HFF Δ Sp1. Dargestellt sind Mittelwerte +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten; (B) Western Blot zum Nachweis des reduzierten Proteinlevels.

Mit der so modifizierten Zelllinie HFF Δ Sp1 wurden im Anschluss Reporterassays durchgeführt, bei denen neben pN10 auch IE1 cotransfiziert wurde. Es zeigte sich, dass im Unterschied zu der nativen Zelllinie HFF der induktive Effekt durch IE1 deutlich schwächer vorhanden ist, was die Involvierung von Sp1 bestätigte (Abb. 46). In der Sp1-defizienten Zelllinie konnte der 5-LO-Promotor durch IE1 nur noch 3,7fach aktiviert werden im Vergleich zu 20fach (Abb. 47) in nativen HFF. Dies entspricht einer Reduktion um 82%.

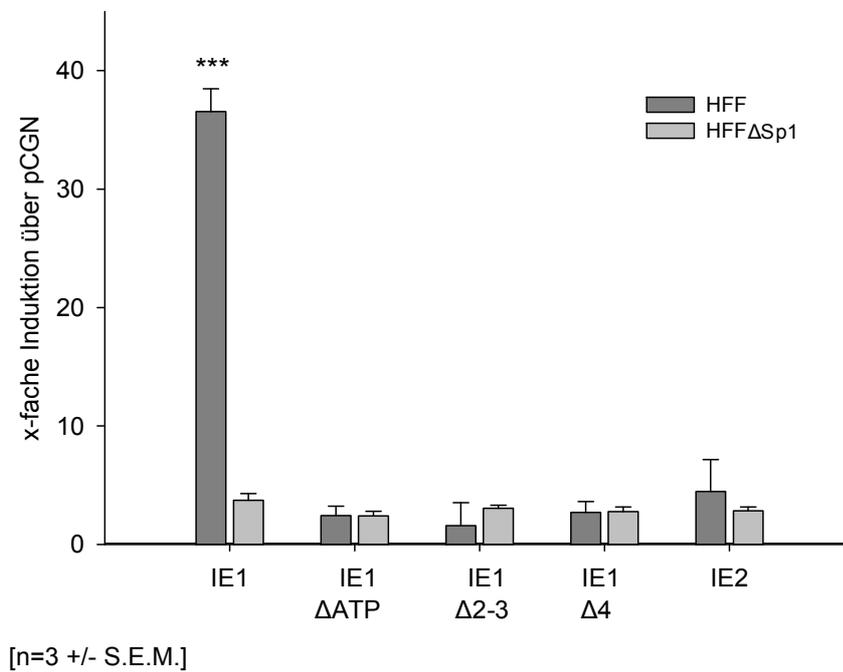


Abbildung 47: Vergleich des IE1-Effektes auf pN10 im Reporterassay zwischen HFF Wildtyp und HFF Δ Sp1; Die unterschiedlichen Zellen wurden mit pN10 und IE1 bzw. pCGN transfiziert, nach 60h erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. Die Messwerte zeigen die Induktion des 5-LO-Promotorfragments pN10 durch IE1 in Abhängigkeit von zellulären Sp1-Status, normiert auf das Leerplasmid pCGN. Dargestellt sind Mittelwerte +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten.

Neben der Promotoraktivität wurde zusätzlich die Regulation der 5-LO-mRNA nach IE1-Überexpression in Abhängigkeit der Zeit bestimmt. Während in HFF die 5-LO durch die Transfektion des viralen Proteins stark ansteigt und das Maximum bei 24h erreicht, ist keine Regulation der 5-LO-mRNA in den Sp1-defizienten Zellen zu sehen. Dies bestätigt den Einfluss des Transkriptionsfaktors in die Regulation der 5-LO.

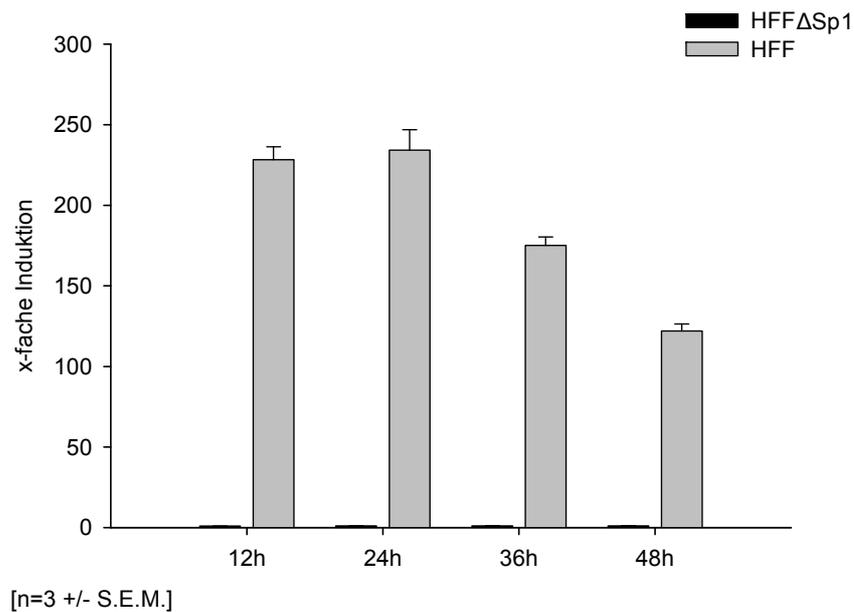


Abbildung 48: Induktion der 5-LO nach IE1-Überexpression in HFF; Aus IE1-überexprimierten HFF bzw. der *Knock down*-Zelllinie HFF Δ Sp1 wurde nach 12h, 24h, 36h und 48h RNS extrahiert und eine qPCR durchgeführt. Die Quantifizierung der ct-Werte erfolgte relativ gegen die Leerplasmidkontrolle mittels $\Delta\Delta$ ct Methode. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten

4.2.13 Charakterisierung der Komplexbildung im GC4-Promotorbereich

Die vorhergegangenen Experimente zeigten deutlich den Einfluss von Sp1 auf die Induktion der 5-LO durch IE1. Im Reporterassay (Abb. 30+31) mit verschiedensten 5-LO-Promotordelationen war zu erkennen, dass die Bindung an die GC4-Box für den beschriebenen

Effekt essentiell zu sein scheint. Um dies in einem alternativen Experiment zu bestätigen, wurde ein EMSA durchgeführt. Als Sonde wurde eine Region um die GC4-Box des 5-LO-Promotors gewählt und diese mit unbehandeltem sowie IE1-überexprimierten HFF-Ganzzelextrakt inkubiert. In den Immediate Early 1-überexprimierten Zellextrakten nahm die Intensität der geschifteten Bande deutlich zu, es kam *in vitro* zu einer verstärkten Komplexbindung an die GC4-Box Region des 5-LO-Promotors (Abb. 49).

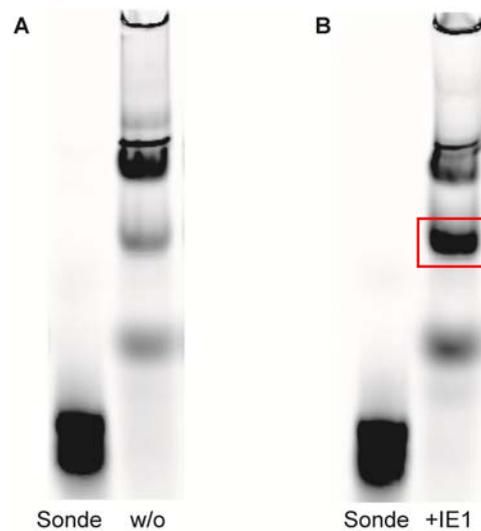


Abbildung 49: Proteinbindung an die GC4-Box Region des 5-LO-Promotors nach Überexpression in HFF; (A) Inkubation der Sonde mit unbehandeltem HFF Ganzzelextrakt, (B) Inkubation der Sonde mit IE1 überexprimiertem HFF-Ganzzelextrakt

4.2.14 Bindung von Sp1 im GC4-Promotorbereich nach Infektion und IE1-Überexpression

Nachdem der EMSA *in vitro* die verstärkte Komplexbindung an die GC4-Box des 5-LO-Promotor nach IE1-Überexpression bestätigt hat, wurde weitergehend mittels ChIP eine Bindung von Sp1 an die entsprechende Region *in vivo* nachgewiesen. Verglichen wurden hierbei die unbehandelten HFF (w/o) mit infizierten Zellen (HCMV AD169 MOI 1) und IEP-überexprimierenden Zellen. Transfiziert wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden für Immediate Early 1 und Immediate Early 2 sowie dem entsprechenden Leerplasmid pCGN um einen regulativen Einfluss durch die Transfektion auszuschließen. Es zeigte sich, dass es sowohl nach Infektion der Zellen mit dem

humanen Cytomegalovirus als auch nach Transfektion mit Immediate Early1 zu einer verstärkten Bindung von Sp1 an den Promotor kam. Als PCR Primer dienten Sequenzen, die die proximale Region -286 bis +78bp des 5-LO-Promotors abdecken. Darin enthalten ist ebenfalls die im EMSA verwendete Region der GC4-Box. In den Negativkontrollen ohne Antikörper (*noAB*) bzw. einem unspezifischen IgG Antikörper waren keine Bindungen erkennbar, was für die Spezifität des Sp1-Nachweises spricht. Die Inputkontrolle der gescherten Chromatinprobe war in der *w/o* Kontrolle etwas stärker ausgeprägt, allerdings zeigte sich trotzdem keine Sp1-Bindung an den Promotor. Das Ergebnis des ChIPs bestätigt *in vivo* die *in vitro* Aussage des EMSAs: Durch Immediate Early 1, nicht aber Immediate Early 2, wird die Sp1-Bindung an den proximalen Bereich des 5-LO-Promotors verstärkt. Sp1 hat demnach einen unmittelbaren Einfluss auf die virale Regulation der 5-Lipoxygenase (Abb. 50).

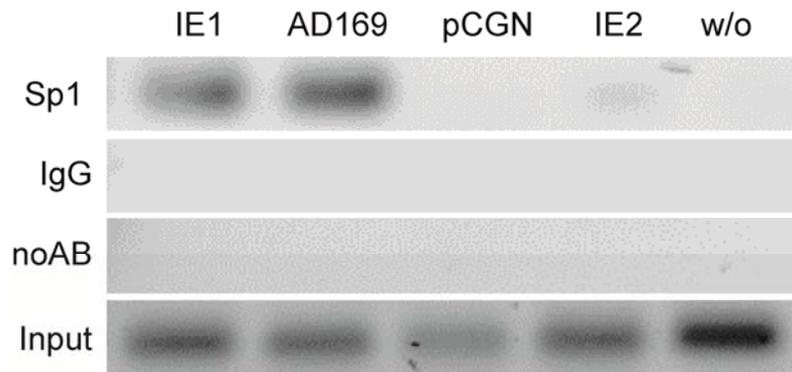


Abbildung 50: *In vivo* Nachweis der Sp1-Bindung an den proximalen Sp1-Promotor in HFF nach Infektion und Transfektion; Als Negativkontrollen wurden sowohl rabbit IgG Antikörper verwendet um die Spezifität des Sp1-Antikörpers zu zeigen, als auch eine no Antibody (*noAB*) Kontrolle um unspezifische Bindungen an die verwendeten Agarose *Beads* auszuschließen. Die Input Kontrolle, das gescherte Chromatin, dient als Positivkontrolle der PCR Reaktion; Für den Nachweis wurden 32 Zyklen und eine Annealing Temperatur von 55°C verwendet.

4.3 HDAC-inhibitorische Effekte durch Immediate Early 1

Neben dem bereits ausführlich charakterisierten Einfluss von Sp1 in die IE1-vermittelte Induktion des 5-LO-Promotors, scheint es noch weitere essentielle Aspekte in diesem Regulationsmechanismus zu geben. Versuche wie die Überexpression von Sp1 (Abb. 34) im Reporterassay haben gezeigt, dass Sp1 alleine nicht ausreichend für die Promotoraktivierung ist.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist bekannt, dass der 5-LO-Promotor über epigenetische Regulationsmechanismen wie HDAC-Inhibition beeinflusst werden kann, und die Immediate Early Proteine des humanen Cytomegalovirus ebenfalls in der Lage sind, in die Histonmodifikation einzugreifen. Im Folgenden wurden Versuche zur Untersuchung der Interaktion zwischen den Immediate Early Proteinen und Histondeacetylasen durchgeführt und der daraus resultierende Effekt auf die 5-LO-Promotoraktivierung charakterisiert.

4.3.1 Untersuchung der Interaktion zwischen HDACs und IE1 / IE2

Zunächst wurde mittels *Pull-down*-Experimenten eine direkte Interaktion zwischen den Immediate Early Proteinen und den für die Regulation des 5-LO-Promotors essentiellen Histondeacetylasen überprüft. Die bakteriell-exprimierten GST-getaggten Proteine IE1 und IE2 wurden dafür mit Ganzzellextrakten aus HFF inkubiert und die Komplexe über den GST-tag aufgereinigt.

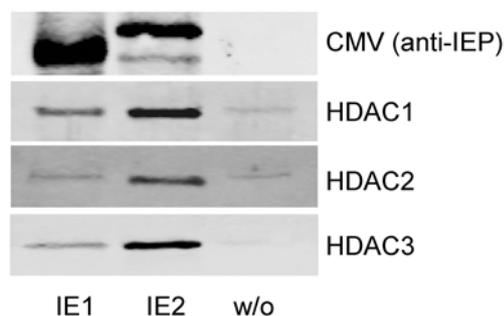


Abbildung 51: Protein-Protein-Interaktion zwischen IE1 / IE2 und HDAC1-3; Die bakteriell-exprimierten Fusionsproteine IE1 und IE2 wurden mit HFF-Ganzzellextrakt inkubiert und über den GST-tag aufgereinigt; Western Blots auf HDAC1-3 sowie die Immediate Early Proteine zeigen die Komplexbildung, als Negativkontrolle dienten die ungelabelten *Beads* um unspezifische Bindungen auszuschließen.

Es zeigte sich, dass IE1 und IE2 mit allen getesteten HDACs direkt interagieren. IE2 zeigte hierbei die stärker ausgeprägte Bindung, vor allem für HDAC1 und HDAC3. Diese Daten bestätigten vorhergehende Untersuchungen, bei denen ebenfalls eine Interaktion zwischen Immediate Early Proteinen des HCMV und HDACs gezeigt werden konnte [435, 441] (Abb. 51).

4.3.2 Beeinflussung der HDAC-Aktivität durch IE1-Überexpression

Die direkte Interaktion zwischen den Proteinen gibt an sich noch keinen Aufschluss über die funktionelle Beeinflussung der Histondeacetylasen durch die Immediate Early Proteine. Um zu bestimmen, ob IE1 die HDAC-Aktivität hemmen kann und so in die Regulation des 5-LO-Promotors eingreift, wurde dies in einem HDAC-Aktivitätsassay mit Extrakten aus humanen Vorhaut-Fibroblasten überexprimiert mit IE1 getestet. Die Experimente wurden freundlicherweise in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Manfred Jung/Universität Freiburg von Julia Wagner durchgeführt.

Getestet wurde zum einen die allgemeine HDAC-Inhibition mit dem unselektiven HDAC-Substrat ZMAL, aber auch die selektive Aktivität von HDAC1 mit dem Substrat B61 [567]. Immediate Early 1-Überexpression führte zu einer signifikanten Reduktion der allgemeinen aber auch der HDAC1-spezifischen Aktivität (Abb. 52). Da für diesen Assay kein HDAC2 bzw. 3 spezifisches Substrat verfügbar sind, konnte deren selektive Aktivitäten nicht getestet werden. Es ist demnach nur die allgemeine Aussage möglich, dass durch die virale Überexpression die Aktivität von Histondeacetylasen gehemmt werden kann, was in Folge Auswirkungen auf die Promotorregulation zellulärer Gene haben kann.

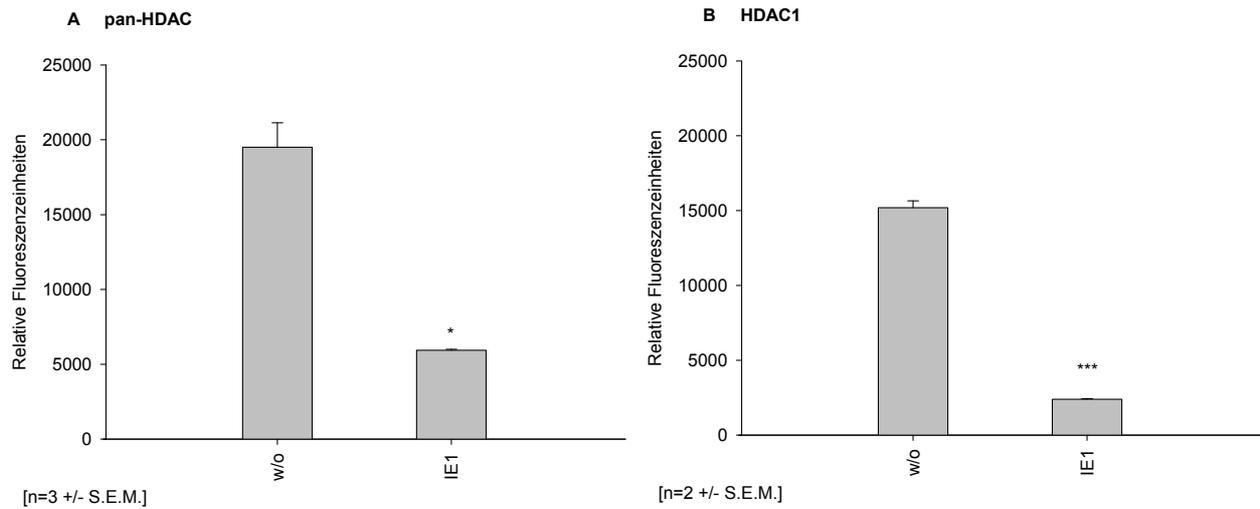
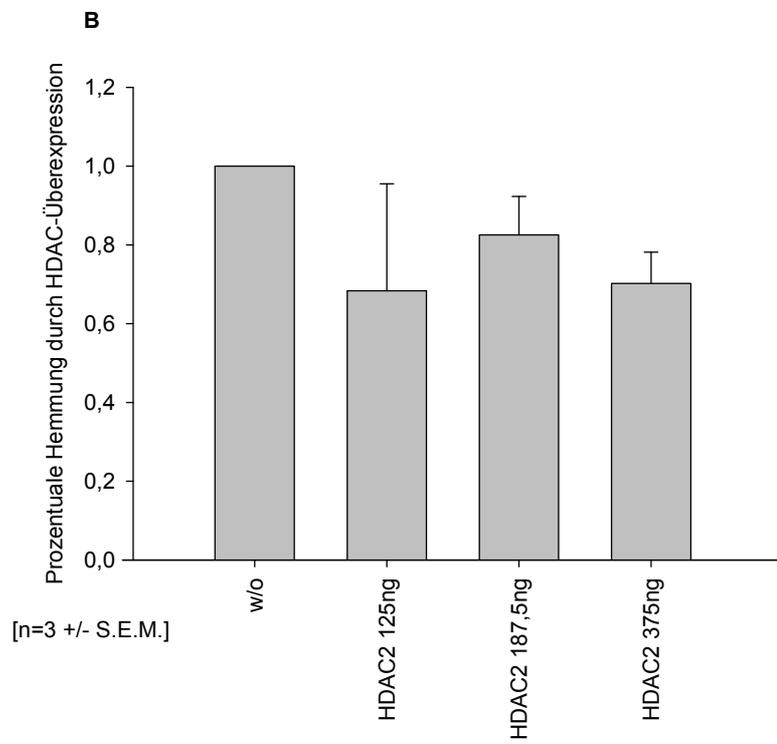
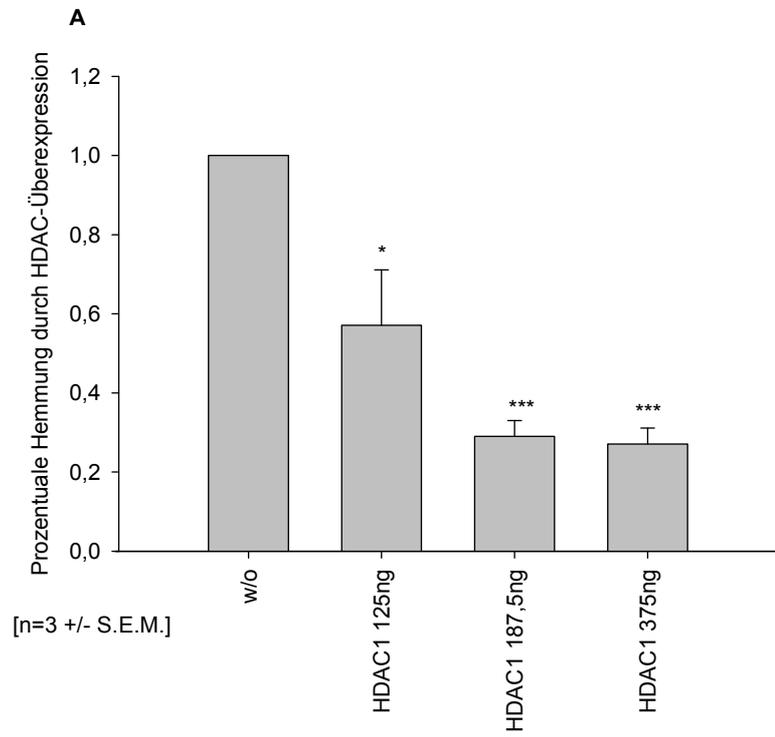


Abbildung 52: Quantifizierung der HDAC-Aktivität in IE1-überexprimierten HFF; (A) Bestimmung der allgemeinen HDAC-Aktivität durch Umsetzung des Substrates ZMAL, (B) Bestimmung der HDAC1-selektiven Aktivität durch B61, Die Daten zeigen die relativen Fluoreszenzeinheiten über dem jeweiligen Leerwert aus drei bzw. zwei unabhängigen Experimenten +/- S.E.M.

4.3.3 Funktionelle Beeinflussung des 5-LO-Promotors nach HDAC-Überexpression

Um festzustellen, ob die nachgewiesene HDAC-inhibitorische Wirkung von IE1 eine Auswirkung auf die Aktivität des 5-LO-Promotors hat, wurde ein Reporterassay mit variierender Menge an HDAC-Expressionsplasmid für HDAC1, 2 und 3 durchgeführt. Man sieht in Abbildung 53, dass die Transfektion der Expressionsplasmide für HDAC1 und HDAC3, nicht aber für HDAC2 den induktiven Effekt von IE1 signifikant hemmen konnten. Durch Erhöhung der HDAC-Konzentration in der Zelle ergab sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der 5-LO-Promotoraktivität. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass der IE1-Effekt direkt mit der HDAC1 und 3 Konzentration korreliert. Die Immediate Early 1-vermittelte HDAC-Inhibition wird durch Überexpression teilweise aufgehoben, sodass IE1 nicht mehr den vollständigen induktiven Effekt auf das Promotorkonstrukt pN10 ausüben kann (Abb. 53).



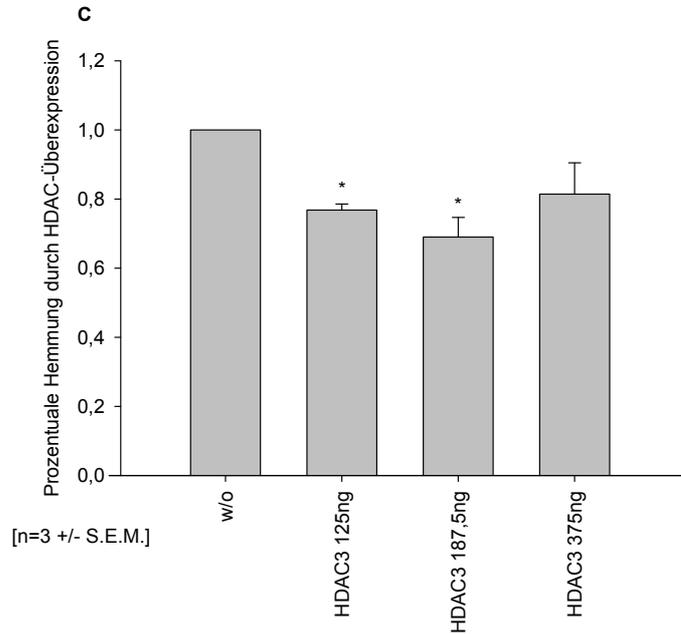


Abbildung 53: Induktion von pN10 nach Überexpression von IE1 und variierenden HDAC-Mengen in HFF; (A) Überexpression von HDAC1, (B) Überexpression von HDAC2, (C) Überexpression von HDAC3; Die Gesamt-DNS-Menge der Transfektion bleibt konstant und wird ggf. mit dem Leerplasmid pSG5 aufgefüllt. Messung der Luciferaseaktivität erfolgt 60h nach Transfektion. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten.

Zur Kontrolle der Überexpression der HDACs wurden Western Blots durchgeführt (Abb. 54) Die Induktion der 5-LO durch IE1 wird also neben der Sp1-Induktion und Phosphorylierung auch durch den HDAC-Aktivitätsstatus reguliert.

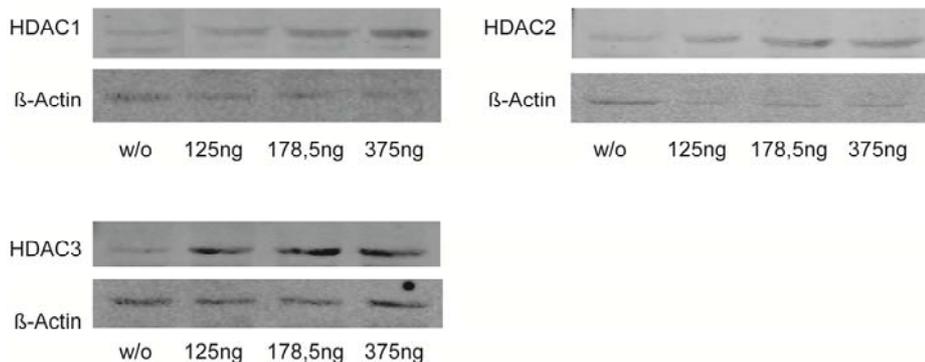


Abbildung 54: Western Blot zur Kontrolle der HDAC-Expression nach Überexpression in HFF; Überexpression von steigenden Mengen HDAC1-3 in HFF, 48h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und geblottet.

5 DISKUSSION

Die 5-Lipoxygenase ist das Schlüsselenzym in der Produktion von Leukotrienen. Diese Mediatoren stehen in Verbindung mit der Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis und Arteriosklerose [6, 189]. Qiu et. al. [248] konnten 2008 zeigen, dass die Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus eine Induktion der 5-LO in HPASMCs hervorruft. Die lytische Infektion mit HCMV im immunsupprimierten Wirt ist geprägt durch starke entzündliche Prozesse und vaskuläre Langzeitschäden [542, 547-549]. Nachdem für den COX-2-Promotor der regulative Mechanismus über eine verstärkte NF κ B Promotorbindung, vermittelt durch virale Immediate Early Proteine, aufgeklärt werden konnte [501], war das Ziel dieser Arbeit, den induktiven Mechanismus auf den 5-LO-Promotor mechanistisch zu untersuchen und so weitere Hinweise auf die viral regulierten entzündlichen Prozesse zu bekommen.

5.1 Charakterisierung des induktiven Effektes von HCMV auf 5-Lipoxygenase

Durch die Veröffentlichung von Qiu et. al. [248], war bekannt, dass das humane Cytomegalovirus in der Lage ist, 5-Lipoxygenase sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in HPASMCs zu induzieren. Für die Untersuchung des genaueren Regulationsmechanismus waren jedoch humane Vorhaut-Fibroblasten das bevorzugte Testsystem, da diese Zelllinie aufgrund ihrer guten Permissivität den Prototyp für Studien des HCMV darstellt [501, 623-626]. Zunächst wurden die Zellen mit dem Vollvirus HCMV AD169 infiziert und die mRNA-Regulation in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bei einer MOI 1 24 Stunden nach Infektion der maximale Effekt erreicht wurde. Dieser fiel nach 72 Stunden wieder leicht ab (Abb.14). In den Untersuchungen in HPASMCs (*human pulmonary arterial smooth muscle cells*) gab es eine konzentrations- und zeitabhängige Steigerung, die ihr Maximum mit einer MOI 10 nach 7 Tagen noch nicht erreicht hatte [248]. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation des 5-LO-Promotors in den beiden Zelllinien durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt wird. Zum einen zeigen die beiden Zelllinien unterschiedliche Permissivitäten für das Virus, sodass bei HFF ein Verhältnis 1:1 zwischen infektiösen Viruspartikeln und Zellen ausreichend ist, wohingegen bei HPASMCs eine zehnfach höhere Virusmenge eingesetzt werden musste, um ein vergleichbares Infektionsbild hervorzurufen. Zum anderen spiegeln die Maxima der 5-LO-mRNA Induktion

unterschiedliche Phasen der sequentiellen Genexpression wieder. 24 Stunden nach Infektion erreichen die Immediate Early Proteine ihr höchstes zelluläres Expressionslevel, 72h nach Infektion die Late Proteine [256]. Im uninfizierten Zustand sind sowohl HFF als auch HPASMCs 5-LO negativ, jedoch gibt es keine näheren Angaben über den Methylierungs- und Acetylierungsstatus des Promotors in HPASMCs, wohingegen für die HFF gezeigt werden konnte, dass dieser weitgehend unmethyliert vorliegt (unveröffentlichte Daten von Katryniok et. al.). Da bekannt ist, dass die 5-LO-Promotoraktivität stark von epigenetischer Regulation beeinflusst wird [561] und Immediate Early Proteine des HCMV mit *Chromatin-remodelling*-Faktoren wechselwirken können [432-434], könnte der Grundzustand des Promotors entscheidend für die Regulation der 5-LO sein. Um ferner einzuschränken und zu bestätigen, welche Gruppe der sequentiell exprimierten viralen Proteine die Induktion in HFF hervorruft oder ob diese durch Strukturproteine der Hüllmembran bzw. lösliche Faktoren der Virussuspension vermittelt wird, wurden Untersuchungen mit Foscavirzusatz, UV-Inaktivierung und filtriertem Virus durchgeführt. Zunächst zeigte sich, dass der Zusatz des DNS-Replikationsinhibitors Foscavir die mRNA-Induktion in HFF nicht beeinflusst, diese demnach nicht durch ein Late Protein des Virus vermittelt wird (Abb. 16). Late Proteine des humanen Cytomegalovirus werden nur nach erfolgter Replikation des Genoms exprimiert [256]. Deren Abwesenheit wurde durch eine AEC-Färbung nachgewiesen (Abb. 15). Dadurch bestätigte sich die Annahme, dass die zelluläre Regulation in HPASMCs unterschiedlich verläuft, da hier Foscavir eine Inhibition der Induktion um 90% hervorrief [248]. UV-inaktivierter Virus und filtrierter viruspartikelfreier Überstand zeigten in beiden Zelllinien keinen Effekt auf die Promotoraktivität (Abb.17). Interessanterweise aktivieren die Glycoproteine G und H der Hüllmembran TLR2 (*toll like receptor*)-Rezeptoren permissiver Zellen [570]. Für humane Monozyten konnte gezeigt werden, dass TLR2-Aktivierung die 5-LO-Produktbildung aufgrund von erhöhter Arachidonsäurefreisetzung steigern kann [627]. Dieser Effekt wird durch MAPK-induzierter Phosphorylierung von cPLA₂α vermittelt. Jedoch wird die 5-LO-Enzymaktivität nicht beeinflusst und die erhöhte Leukotrienbildung nur durch vermehrte Arachidonsäurefreisetzung bedingt. Daraus erklärt sich auch, warum auf mRNA-Ebene nach Infektion mit UV-inaktiviertem Virus keine Regulation feststellbar ist. Dies deutet darauf hin, dass in HFF die Regulation über ein Immediate Early oder Early Protein vermittelt wird, wohingegen in HPASMCs ein Late Protein für die Induktion verantwortlich zu sein scheint. Zur Charakterisierung welches virale Protein die Promotoraktivierung vermittelt, wurden einzelne Proteine überexprimiert und ihre induktive Fähigkeit auf das 5-LO-Promotorkonstrukte pN10 im Reporterassay getestet (Abb.18). Da das

humane Cytomegalovirus das größte Genom der Herpesviren besitzt, welches für etwa 165 Gene codiert, wurden zunächst einige Vertreter getestet, die aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften die 5-LO-Induktion hervorrufen könnten. Darunter die Transaktivatoren IE1 und IE2, der Aktivator des MIEP pp71, die Tegumentproteine UL48 und pp150, sowie das Strukturprotein pp65. Immediate Early 1-Überexpression führte zu einer 20fachen Aktivierung des pN10-Konstruktes, wohingegen die restlichen getesteten Proteine keine oder lediglich eine schwache Induktion zeigten. Immediate Early 1 ist ein transaktivierendes Protein, welches im Unterschied zu Immediate Early 2 TATA-lose Promotoren viraler und zellulärer Gene aktivieren kann [387, 431]. Obwohl es bei der Regulation vieler Promotoren mit IE2 eine synergistische Wirkung zeigt, hat die kombinierte Überexpression keine Steigerung des 5-LO-Effektes gezeigt. Immediate Early Proteine haben ihre maximale Expression 24 Stunden nach Infektion erreicht, demnach bestätigt die mRNA-Regulation der 5-LO die Daten des Reporterassays dahingehend, dass ein Immediate Early Protein für den Effekt verantwortlich ist. Um festzustellen, ob IE1 das essentielle induktive Protein ist, wurde die Promotoraktivität und mRNA-Expression mit einer Virusmutante überprüft. Der Stamm CR208 weist eine Mutation des Leser Rahmens UL122 auf, sodass selektiv IE1 nicht exprimiert werden kann. Es ist beschrieben, dass diese Mutation zu einer verschlechterten Replikation führt [439], da IE1 NF κ B-vermittelt autoinduktiv auf dem MIEP einwirkt. Bei fehlender IE1-Expression wird der MIEP schwächer induziert, was in einer geringeren IE-Protein Konzentration resultiert. Da die IEPs für die Aktivierung nachgeordneter Early und Late Proteine und somit das Fortschreiten des lytischen Zyklus verantwortlich sind, wirkt sich die Defizienz in verschlechterter Replikation aus. Um einen Vergleich zwischen dem Vollvirus und der Mangelmutante heranziehen zu können, musste also zunächst die MOI angepasst werden, sodass beide Viren annähernd gleich replizieren. Nach Infektion mit einer 10fach höheren Virusmenge an CR208 entsprachen sich die Infektionsbilder im Bezug auf die Expression des Late Proteins gB (Abb.19). In Reporterassays beziehungsweise quantitativen real time PCR-Analysen nach Infektion mit den verschiedenen Virusstämmen bestätigte sich, dass Immediate Early 1 essentiell an der Induktion des 5-LO-Promotors beteiligt ist (Abb. 20+22). Während nach Behandlung der HFF mit dem Wildtyp AD169 nach 24 Stunden 108 Kopien 5-LO-mRNA detektiert werden können, liegt der 5-LO-mRNA-Spiegel nach CR208 Infektion auf dem Niveau uninfizierter Zellen. Bezüglich der Promotoraktivität ist auch nur AD169 in der Lage, pN10 zu aktivieren. Sowohl die Überexpression des einzelnen Virusproteins als auch Infektionsversuche mit dem Deletionsvirus weisen auf eine IE1-vermittelte Induktion der 5-LO hin. Um nachgeordnet zu

überprüfen, ob es folgend auch zur Translation der induzierten 5-LO-mRNS kommt, wurden die Proteinlevel in infizierten und IE1-überexprimierten Zellen bestimmt. Veröffentlichungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass insbesondere Herpesviren in der Lage sind über microRNS, etwa 22 Nukleotid große, nicht codierende RNS-Stränge, die mRNS-Stabilität zu beeinflussen und so die zelluläre Genexpression zu inhibieren [628-633]. Virale microRNS wird sowohl während des lytischen Zyklus als auch während des Latenzstadiums gebildet und steigert zum einen die virale Expression, fördert zum anderen aber auch die Umgehung der Immunsystemaktivierung durch reduzierte MHCII (*major histocompatibility complex, class II*)-Expression [634] und die Expression zellulärer Gene. Immunocytochemische Färbungen und Western Blot Analysen in HFF lieferten den Nachweis, dass die erhöhte mRNS-Spiegel der 5-LO auch in einer vermehrten Proteinexpression resultieren und keine virale Gegenregulation eintritt (Abb. 23+24). Verglichen wurden dabei HCMV AD169 infizierte und IE1-überexprimierte HFF. Es zeigte sich in beiden Versuchen eine deutliche Expression von 5-Lipoxygenase nach Behandlung, während in unbehandelten Zellen kein 5-LO-Protein nachweisbar ist. Die Proteinexpression der 5-LO konnte auch in den HPASMCs gezeigt werden [248]. Für die Ausbildung der entzündlichen Symptomatik sind die durch 5-LO gebildeten Leukotriene jedoch von essentieller Bedeutung. Sie vermittelt über die Bindung an ihre CysLT- beziehungsweise BLT1/2-Rezeptoren unter anderem die Aktivierung des Immunsystems durch Chemotaxis [187, 222, 223, 225]. In infizierten und IE1-überexprimierten HFF wurde Konzentration von Leukotrien B4, 5-HETE, 12-HETE und 15-HETE mittels LC-MS/MS-Messung bestimmt. 5-HETE ist ein Zwischenprodukt, was mittels Glutathionperoxidasen oder auch katalysiert durch die Pseudoperoxidaseaktivität von 5-LO aus 5-HPETE anstatt von LTA4 gebildet werden kann (Abb.5). 12-HETE und 15-HETE sind die entsprechenden Produkte der 12- und 15-LO, wohingegen LTB4 den Hauptvertreter der BLT1-vermittelten Reaktionen darstellt. Die Analyse zeigte, dass durch beide Behandlungen die zellulären Konzentrationen von 5-, 12- und 15-HETE signifikant gesteigert werden konnten, wobei die Infektion mit dem Vollvirus den deutlicheren Effekt zeigte (Abb.25). Der 5-HETE Spiegel erhöhte sich von 8,5pg pro 1×10^6 Zellen auf 273pg nach Infektion. Leukotrien B4 wird ebenfalls durch Infektion induziert, allerdings kommt es hier nur zu einer Steigerung um den Faktor zwei. Generell lässt sich zeigen, dass sowohl die Infektion als auch Überexpression von IE1 zu einer signifikant erhöhten 5-LO-Produktbildung führen. Die absoluten Mengen der gebildeten 5-LO-Produkte sind allerdings relativ gering, obwohl in Western Blot eine deutliche Proteinexpression des Enzyms nachgewiesen werden konnte (Abb. 24). Versuche von Qiu et al. [248] haben auch in der Endo-

thelzelllinie HPSMC nur eine mäßige Regulation der Leukotriene gezeigt. Spiegel von etwa 200pg LTB₄ pro 1x10⁶ Zellen konnten hier gemessen werden. Eine mögliche Erklärung für die niedrigen zellulären Konzentrationen an Leukotrienen trotz Vorhandensein von ausreichender 5-LO-Enzymmenge könnte das Fehlen von Faktoren sein, die für die Aktivität der 5-LO essentiell sind, sodass das Substrat, die Arachidonsäure, nicht in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden kann. Die zelluläre Aktivität von 5-LO wird durch unterschiedliche Parameter beeinflusst (siehe 1.1.3.3). Dazu zählen die Freisetzung der Arachidonsäure, der Redoxstatus, die intrazelluläre Calciumkonzentration, inhibierende und aktivierende Phosphorylierungen durch PKA und ERK1/2 sowie die Bindung an die regulatorischen Proteine FLAP und CLP [6]. Um zu überprüfen, ob in HFF die Voraussetzungen für eine effektive Leukotriensynthese gegeben sind, wurden mittels Western Blot die Level von cPLA₂ und FLAP bestimmt. Getestet wurde die Versuchszelllinie HFF. Verglichen wurde das zellulären Proteinlevel dieser Zelllinie mit und ohne IE1-Überexpression mit Mono Mac 6 als monozytäre Zelllinie und HT-29, einer Kolonkarzinomzelllinie sowie PMNL. Für MM6 und HT-29 gibt es bereits Veröffentlichungen, die sich mit der Regulation der 5-LO befassen [8, 9, 139, 171, 196, 216, 635, 636]. Es zeigte sich, dass in HFF die Proteinmengen von FLAP und cPLA₂ unter der Nachweisgrenze des Western Blots liegen (Abb.26) und auch durch IE1-Überexpression nicht induziert werden können. Dies könnte die niedrigen Mengen an gebildeten 5-LO-Produkten erklären, da beide Proteine wesentlich an der Freisetzung und Bindung der Arachidonsäure beteiligt sind. Während cPLA₂ Arachidonsäure aus Membranen freisetzt und somit der 5-LO ihr Substrat zur Verfügung stellt [192, 194, 637, 638], vermittelt FLAP die Bindung zwischen der aktiven membrangebundenen 5-LO und der Arachidonsäure [6, 639]. Die effektive Produktion der Leukotriene nach viraler Infektion bleibt demnach aus. Ob die Bildung von LTB₄ förderlich für die Ausbreitung der viralen Infektion ist, ist nicht abschließend geklärt. So konnten unter anderem Söderberg-Naucler et. al [336] zeigen, dass durch entzündliche Prozesse das Virus aus seiner Latenz reaktivieren kann und der 5-LO-LTB₄-Pathway dabei unterstützend in die Reaktivierung eingreifen könnte. Genis et. al. [640] konnten zeigen, dass bei HCMV-infizierten AIDS-Patienten hohe Level an Leukotrienen detektiert werden konnten, was die entzündliche Symptomatik der HCMV-Infektion zusätzlich fördert. In Gegensatz dazu zeigten Gosselin et. al. [250] und Flamand et. al. [641], dass pharmakologische Dosen an LTB₄ im Mausmodell vor CMV-Infektion schützen können. Dies erfolgt wahrscheinlich über die Generierung von α -Defensin und MIP-1 α (*Chemokine ligand 3*). Es gibt demnach kon-

troverse Veröffentlichungen zum Einfluss der Leukotriensynthese auf den Verlauf der Cytomegalovirus-Infektion.

Für das Zellsystem der humanen Vorhaut-Fibroblasten konnte im ersten Teil der Arbeit gezeigt werden, dass es zu einer Induktion der 5-LO-Promotoraktivität mit nachfolgender mRNA- und Proteinsynthese kommt. Erstmals wurde das virale Protein, das diesen Effekt vermittelt näher charakterisiert. Immediate Early 1 als viraler Transaktivator ist der bedeutende Faktor in der Aktivierung des 5-LO-Signalwegs.

5.2 Mechanistische Untersuchungen des Immediate Early 1-Effekts

Nachdem charakterisiert wurde, dass der induktive Effekt des humanen Cytomegalovirus auf die 5-Lipoxygenase essentiell von Immediate Early 1 abhängig ist (siehe 5.1), sollte darauf folgend der nähere Mechanismus der Promotoraktivierung untersucht werden. Für den 5-LO-Promotor konnte gezeigt werden, dass dieser zum einen über Bindung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren wie Sp1, zum anderen aber auch durch Inhibition von Histondeacetylasen aktiviert werden kann [7-9, 171]. Da die Immediate Early Proteine des HCMV als potente Transaktivatoren bekannt sind und darüber hinaus über HDAC-Hemmung den Übergang von Latenz in den lytischen Zyklus regulieren können (siehe 1.2.5.2 und 1.2.5.3), stellen diese Mechanismen mögliche Regulationswege der IE1-vermittelten 5-LO-Promotoraktivierung dar.

5.2.1 Sp1-vermittelte Induktion des 5-Lipoxygenase-Promotors

Das virale Immediate Early 1 Protein, welches bedeutenden Einfluss auf die Aktivierung des 5-LO-Promotors gezeigt hat, ist bekannt als potenter Transaktivator viraler und zellulärer Promotoren. Dabei vermittelt das Protein seine transaktivierende Wirkung unter anderem über die Aktivierung und Induktion von Transkriptionsfaktoren wie NF κ B oder Sp1. Diese Transkriptionsfaktoren besitzen charakterisierte Bindungsstellen in der 5-LO-Promotorsequenz. Deshalb wurde zunächst überprüft, ob es nach Überexpression von Immediate Early 1 in HFF zu einer verstärkten Expression von 5-LO-relevanten Transkriptionsfaktoren kommt. Bestimmt wurden die mRNA-Spiegel von NF κ B, Sp1, c-Jun und NFAT in Abhängigkeit der Zeit (Abb. 27). Es zeigte sich, dass es 24 Stunden nach Transfektion zu einer 80fachen Induktion der Sp1-mRNA-Konzentration kommt. Dieser Anstieg korreliert mit den gemessenen mRNA-Mengen der 5-LO (Abb.48). NF κ B, c-Jun und NFAT dagegen wurden weniger ausgeprägt reguliert. Für NF κ B lässt sich dies über dessen Aktivierungsmechanismus erklären. Die Aktivierung von NF κ B erfolgt über Phosphorylierung der assoziierten I κ B-Einheit durch den I κ B-Kinase-Komplex, die daraufhin vom Ubiquitin-Ligase-Komplex polyubiquitinyliert wird, was zum proteosomalen Abbau führt. Im Anschluss kommt es zur Translokation in den Zellkern und Coaktivatoren wie CBP/p300 können rekrutieren werden, welche durch Histonacetylierung die Transkription zusätzlich steigern [81, 82]. Für IE1 ist bekannt, dass es autoinduktiv auf den MIEP einwirken kann, indem es die NF κ B-Bindung

fördert. Jedoch kommt es nicht zu einer verstärkten Expression von NF κ B, sondern zu einer verstärkten Freisetzung von transkriptionell aktivem NF κ B aus dem I κ B-Komplex. Das freie NF κ B kann nachfolgend sowohl autoregulativ auf seinen eigenen Promotor, als auch auf zelluläre Promotoren einwirken. Aufgrund des Regulationsmechanismus von NF κ B schließt ein Ausbleiben der Induktion auf mRNA-Ebene durch HCMV-Infektion die Möglichkeit der NF κ B-vermittelten 5-LO-Promotoraktivierung durch transkriptionell aktives NF κ B nicht aus. Jedoch zeigt sich kein Anstieg der NF κ B mRNA-Expression, welche aufgrund des autoregulativen Induktionsmechanismus zu erwarten gewesen wäre. Im Unterschied dazu, konnte für Sp1 ein drastischer Expressionsanstieg gezeigt werden. Sp1 ist ein Transkriptionsfaktor, der an GC-reiche Sequenzen von sogenannten Haushaltsgenen binden kann. Aber auch die 5-LO verfügt über sieben charakterisierte GC-Boxen, von denen eine als Tandemstruktur vorliegt (siehe 1.1.2.1). Eine Regulation der 5-LO-Promotoraktivität über Sp1 ist bereits beschrieben (1.1.2.2), sodass die real time PCR-Ergebnisse einen ersten Hinweis auf den möglichen induktiven Mechanismus liefern.

Um zu überprüfen, ob die Sp1-mRNS-Induktion ausschließlich durch Immediate Early 1 hervorgerufen werden kann, wurden HFF mit dem Vollvirus HCMV AD169 und der IE1-Deletionsmutante CR208 infiziert und erneut der Sp1-mRNS-Spiegel bestimmt (Abb. 28). Um das unterschiedliche Replikationsverhalten der Viren auszugleichen, wurde auch hier ein zehnfacher Überschuss der Mangelmutante eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Infektion mit CR208 ebenfalls eine Sp1-Induktion hervorrufen kann, diese in ihrer Effektivität aber nur 50% der AD169 Infektion erreicht. IE1 ist demnach alleine zwar in der Lage Sp1 zu induzieren, aber auch andere virale Proteine scheinen diesem Effekt hervorrufen zu können. Beschrieben ist, dass insbesondere IE2 aber auch pp71, ein Phosphoprotein des HCMV, welches nach Aufnahme des Virus in die Zelle für die initiale Aktivierung des MIEP verantwortlich ist, über Sp1-vermittelte Regulationen transaktivierend auf Promotorstrukturen einwirken können [400, 410]. Beide Proteine wurden zuvor im Reporterassay (Abb. 18) auf ihre transaktivierenden Fähigkeiten bezüglich des 5-LO-Promotorkonstrukt pN10 getestet, und zeigten lediglich zwei- bis dreifache Effekte. Auch die Cotransfektion von IE1 und IE2, welche eine synergistische Wirkung auf Promotorstrukturen zeigen kann, brachte keine Verstärkung des induktiven Effektes auf den 5-LO-Promotor im Reporterassay. Da diese Sp1-induzierenden viralen Proteine nicht in der Lage waren den Promotor zu aktivieren, scheint IE1 weitere regulative Eigenschaften zu besitzen, die neben der Sp1-Induktion für die 5-LO-Promotoraktivierung essentiell sind.

Um zunächst die Theorie der Sp1-abhängigen 5-LO-Promotoraktivierung nach IE1-Überexpression zu stärken und zu sehen, ob die verstärkte Sp1-RNS Expression regulativen Einfluss zeigt, wurden Reporterassay-Experimente mit Deletionskonstrukten durchgeführt. Getestet wurden sukzessive Verkürzungen der 5-LO-Promotorsequenz (pN10-pN13), wobei bei jedem Schritt GC-Boxen deletiert wurden. Die gemessene Aktivität sank mit fortschreitender Reduktion der Reporterkonstrukte (Abb. 30). Insbesondere der Verlust der GC-Boxen GC6 und GC7 sowie GC4 führte zu einschneidenden Aktivitätsminderungen. Die GC-Boxen 6 und 7 befinden sich im Konstrukt pN10 und gehen beim Übergang zu pN11 verloren. Da dieser Deletionsschritt einen großen Promotorbereich von etwa 550bp umfasst, sind die Effekte nicht charakteristisch für die darin enthaltenen GC-Boxen, sondern können durch Verlust weiterer regulativer Sequenzen vermittelt werden. Die darauf folgenden Konstrukte wurden jeweils um 50-100bp verkürzt, sodass spezifischere Aussagen über die regulativen Elemente, die dabei verloren gehen getroffen werden können. Der Übergang zwischen pN11 und pN12, also der Verlust der GC-Boxen 1 und 2 führte zu keiner signifikanten Aktivitätsminderung, wohingegen bei pN12 und pN13, welche sich durch das Vorhandensein der Tandem-GC-Box unterscheiden, die Induktion um 50% abnimmt. Die letzte Deletion der GC4-Box in pN14 führte nahezu zum kompletten Verlust der Promotoraktivität. Für präzisere Aussagen über den Einfluss einzelner GC-Boxen, wurden die Konstrukte pN10GC4/5 beziehungsweise pN13GC4/5 auf ihre Aktivität nach IE1-Überexpression getestet. Hierbei sind selektiv die jeweiligen GC-Boxen mutiert. Interessanterweise führte die Mutation der GC4-Box in beiden Konstrukten zum Verlust der Promotoraktivität, wohingegen die GC5-Box keine oder nur eine geringe Verminderung hervorrief (Abb. 31). Die GC4-Box ist daher essentiell an der Regulation der IE1-vermittelten 5-LO-Aktivierung beteiligt. Gestützt wird dieses Erkenntnis durch Vorarbeiten von Dishart et. al. [8] und Schnur et. al. [9], die sich mit der allgemeinen 5-LO-Promotorregulation befassen. In Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass vor allem die GC4-Box ausschlaggebend für die Aktivität des 5-LO-Promotors ist, die GC5-Box hingegen eine repressive Wirkung hat. Die Reporterassay-Experimente unter IE1-Überexpression bestätigen die erste Vermutung der real time PCR Daten, dass die 5-LO-Promotorregulation durch Immediate Early 1 abhängig von Sp1 ist und dabei die Promotoraktivität über die verstärkte Bindung von Sp1 an die GC4-Box vermittelt wird.

Zum *in vitro* Nachweis der verstärkten direkten Sp1-Bindung an die 5-LO-Promotorregion nach viraler Überexpression wurde ein EMSA durchgeführt. Verglichen mit der unbehandelten Probe

zeigte sich durch IE1-Überexpression eine verstärkte Komplexbindung an die GC4-Box Sonde (Abb. 49). Supershift-Versuche zur Identifizierung der Komplexpartner waren jedoch nicht erfolgreich, sodass zunächst nur die Aussage getroffen werden kann, dass IE1 eine verstärkte Komplexbindung an die 5-LO-Promotorregion um die GC4-Box hervorruft. Wahrscheinlich beinhaltet der transaktivierende Komplex mehrere Komponenten, die eine spezifische Bindung an der GC4-Region ermöglichen, da eine reine Sp1-Bindung ebenso an den restlichen GC-Boxen des 5-LO-Promotors stattfinden könnte. Yurochko et. al. [401] konnte für den NFκB-Promotor zeigen, dass die Immediate Early Proteine die Sp1-Bindung erhöhen können und so transaktivierend wirken. Auch hier wurde dabei die Interaktion mit einem weiteren Transkriptionsfaktor vermutet, der im Komplex eine synergistische Wirkung ausübt. Im Falle der NFκB-Promotors ist E2F ein potentieller Kandidat, da durch Mutationsanalysen gezeigt werden konnte, dass dessen Bindung Einfluss auf die Promotoraktivität hat. E2F ist ein Transkriptionsfaktor der nach HCMV-Infektion auf mRNA-Level induziert und in seiner Promotorbindungsaktivität gesteigert wird [383, 403, 484, 642]. Darüber hinaus konnte eine direkte Interaktion mit Sp1 gezeigt werden, die zur Verstärkung der Transkription führt [643]. Für den 5-LO-Promotor konnte bisher noch keine Bindung von E2F gezeigt werden. Betrachtet man jedoch die flankierende Sequenz der GC4-Box, so ist festzustellen, dass diese zwar keine klassische Bindungsstelle für E2F enthält, aber sehr GC-reich ist. Eine Bindung aufgrund der kurzen Konsensussequenz von CGCGC wäre daher durchaus denkbar [644]. Mutationsanalysen der 5-LO-Promotorregion oder auch ChIP-Experimente könnten Auskunft über die Bindung von E2F liefern. Im Allgemeinen muss davon ausgegangen werden, dass die transaktivierende Spezifität der GC4-Box durch Bindung mehrerer Transkriptionsfaktoren, die im Komplex wirken, zustande kommt.

Eine nähere Charakterisierung, ob *in vivo* die Sp1-Bindung nach IE1-Expression gesteigert werden kann, lieferte die Chromatin Immunopräzipitation. Hierbei wurden HCMV AD169 infizierte HFF mit IEP-überexprimierenden Zellen verglichen. Die Überexpression von IE1, nicht aber IE2, führte zur Bindung von Sp1 an den 5-LO-Promotor im proximalen Bereich. Auch nach Infektion mit AD169 konnte eine verstärkte Sp1-Bindung beobachtet werden (Abb. 50). Es zeigt sich demnach *in vitro* und *in vivo*, dass IE1 die Sp1-Bindung an den 5-LO-Promotor fördert, welche nachgeordnet dessen Aktivität steigert. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass die Induktion der Sp1-RNS alleine nicht der regulative Mechanismus zu sein scheint, da die viralen Proteine IE2 und pp71, welche ebenfalls in der Lage sind Sp1-mRNA zu induzieren, keine aktivierende

Funktion auf den 5-LO-Promotor im Reporterassay zeigten (Abb.18). Für IE2 konnte im ChIP-Experiment zusätzlich gezeigt werden, dass die Sp1-Bindung an den 5-LO-Promotor *in vivo* nicht gesteigert wird (Abb.50). Bestätigt wurde dies zusätzlich durch ein Reporterassay-Experiment, bei dem der Effekt von steigenden Konzentrationen an Sp1 mit und ohne Überexpression auf das Promotorkonstrukt pN10 untersucht wurden. Sp1 alleine war nicht in der Lage, aktivierend auf pN10 einzuwirken und nur durch IE1-Cotransfektion kann eine entsprechende Aktivierung eintreten. Der vermittelnde Effekt ist demnach eine Kombination aus Sp1-Induktion, Steigerung der DNS-Bindung und weiteren Mechanismen, die durch IE1, nicht aber seinem Partnerprotein IE2, vermittelt werden können.

Die beiden Hauptproteine des Major Immediate Early Promotors IE1 und IE2 sind sich strukturell sehr ähnlich. Sie sind beide aus drei Exons zusammengesetzt, wobei die ersten beiden identisch sind. Unterschiede bestehen im carboxyterminalen Bereich, in dem IE1 das Exon 4 trägt und IE2 das etwas größere Exon 5. Funktionell sind Exon 2 und 3 prolin- und leucinreiche Sequenzen, die die Cyclinmodulationen durch beispielsweise Cyclin E-Expression sowie die Aktivierung von viralen Early beziehungsweise Late Promotoren und damit den sequentiellen Ablauf des lytischen Zyklus beeinflussen [346, 348, 378, 379]. Die universellen Regionen unterscheiden sich dahingehend, dass sich im Exon 4 neben einer Leucin-Zipper und einer Zinkfinger-Domäne eine ATP-Bindungsstelle findet [384-386]. Über diese intrinsische Kinaseaktivität kann sowohl Autophosphorylierung als auch Phosphorylierung zellulärer Faktoren wie p107, p130 und E2F-1/2/3 induziert werden [384]. Im Unterschied dazu befinden sich im Exon 5 Zinkfinger-Regionen und weitere leucinreiche Sequenzen. Mutationsanalysen haben ergeben, dass dieses Exon entscheidend für die transrepressive IE2-Wirkung auf den Major Immediate Early-Promotor ist [305, 306]. Für nähere Aussagen, welche Region essentiell für die 5-LO-Promotoraktivierung ist, wurden Deletionsmutanten erzeugt. Dabei wurden Exon 2 und 3 (IE1 Δ 2-3), Exon 4 (IE1 Δ 4) oder ganz spezifisch die ATP-Bindungsstelle im Exon 4 (IE1 Δ ATP) deletiert. Im Reporterassay auf das 5-LO-Promotorkonstrukt pN10 zeigte sich, dass jede Deletion zur Einschränkung der Aktivität führt (Abb. 37). IE1 Δ 4 entsprach in seiner transaktivierenden Fähigkeit IE2, was verdeutlicht, dass IE2 über beispielsweise Sp1-mRNS-Induktion eine gewisse Aktivierung des 5-LO-Promotors hervorrufen kann, die drastische Aktivierung aber essentiell an das Exon 4 geknüpft ist. Interessanterweise zeigte die Deletion IE1 Δ 2-3, also das reine Exon 4, ebenfalls kaum Aktivität auf das Promotorkonstrukt. Erklärt werden könnte dies darüber, dass die promotoraktivieren-

den Fähigkeiten der Immediate Early Proteine auf virale und zelluläre Promotoren wie den Sp1-Promotor, der von beiden viralen Proteinen aktiviert werden kann, von den gemeinsamen prolin- und leucinreichen Regionen ausgehen könnte. Fehlt diese initial vorgeschaltete Aktivierung des Sp1-Promotors, bleibt die Induktion der Sp1-mRNS aus und die durch das Exon 4-vermittelte nachfolgende 5-LO-Promotorinduktion kann nicht erfolgen. Gezielte Mutation der ATP-Bindungsstelle im Exon 4 inhibiert den Effekt um 50%. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die intrinsische Kinaseaktivität entscheidend an der Effektvermittlung beteiligt zu sein scheint. Pajovic et. al. [384] haben diese phosphorylierende Eigenschaft von IE1 1997 beschrieben, und konnten zeigen, dass IE1 darüber unter anderem die Aktivität des zellulären Dihydrofolatreduktase-Promotors beeinflussen kann. IE1 autophosphoryliert sich dabei zunächst selbst, interagiert daraufhin mit den Transkriptionsfaktoren E2F [383] sowie p130 und p107 und induziert so die Aktivierung des Promotors. Dies könnte ein Ansatzpunkt für die Erklärung sein, warum IE1, nicht aber IE2 transaktivierend auf den 5-LO-Promotor einwirken kann. Hervorzuheben ist, dass in dieser Veröffentlichung eine IE1-induzierte Promotoraktivierung durch phosphoryliertes E2F gezeigt werden konnte, welches als möglicher Komplexpartner des GC4-Box-Komplexes in Frage kommen könnte.

Um folgend zu klären, ob IE1 analog zum beschriebenen Mechanismus für E2F auch Sp1 nach physikalischer Interaktion phosphorylieren kann, wurde zunächst eine Co-Immunopräzipitation mit den beiden Immediate early Proteinen sowie der Deletionsmutante IE1 Δ ATP und Sp1 durchgeführt. Die direkte Interaktion von IE1 beziehungsweise IE2 und Sp1 konnte unter anderem durch Yurochko et. al. [401] bereits gezeigt werden und bestätigte sich auch in dem durchgeführten Experiment (Abb. 38). IE1 Δ ATP dagegen zeigte eine schwächer ausgeprägte, aber durchaus vorhandene Sp1-Bindung. Die Deletionsmutante ist demnach ebenfalls in der Lage, Sp1 zu binden. Ob es nachfolgend zu einer Phosphorylierung von Sp1 kommt, wurde mittels Western Blot auf phospho-Sp1 bestimmt. Die posttranslationale Phosphorylierung von Sp1 ruft eine Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern hervor [12] und kann dadurch die DNS-Bindungsaffinität beeinflussen [12, 44, 45]. Der Western Blot zeigte deutlich, dass nach Überexpression von IE1 in HFF der zelluläre Spiegel an phospho-Sp1-Anstieg, wohingegen IE2 und die getesteten Deletionsmutanten IE1 Δ 2-3, IE1 Δ 4 und IE1 Δ ATP nur eine sehr schwache Erhöhung der Phosphorylierung hervorrufen konnten (Abb. 39). Dies bestätigt zum einen, dass IE1 die Phosphorylierung von Sp1 verstärkt und damit dessen DNA-Bindungsaffinität verändern kann,

zum anderen scheint diese Modifikation abhängig von der im Exon 4 liegenden ATP-Bindungsstelle zu sein, da weder IE2 noch IE1 Δ 4 oder IE1 Δ ATP in der Lage waren den phospho-Sp1-Spiegel zu beeinflussen. Allerdings kann auch die Deletionsmutante IE1 Δ 2-3 die Phosphorylierung nicht induzieren. Erklärt werden könnte dies in Kombination mit den Ergebnissen der Co-Immunoprecipitation dadurch, dass die Bindung von Sp1 an die viralen Immediate Early Proteine über Regionen in Exon 2 und 3 erfolgt, da sowohl IE1 als auch IE2 physikalisch mit dem Transkriptionsfaktor interagieren können. Fehlen diese Domänen, konnte keine Interaktion und nachfolgend auch keine Phosphorylierung stattfinden. Diese wird durch die ATP-Bindungsstelle und damit über die intrinsische Kinaseaktivität von Immediate Early 1 direkt oder indirekt unter Beteiligung zellulärer Kinasen vermittelt, da die Mutation dieser funktionellen Domäne zum Verlust der Phosphorylierungsfähigkeit führt.

Reguliert Immediate Early 1 die Aktivierung des 5-LO-Promotors über verstärkte Bindung von phosphoryliertem Sp1 an die GC4-Box Region, so stellt sich die Frage, ob es sich um eine direkte oder indirekte Phosphorylierung handelt. Die physikalische Interaktion der beiden Proteine würde eine direkte Phosphorylierung ermöglichen. Um dies zu testen, wurde ein *in vitro*-Kinase Assay durchgeführt, bei dem die beiden Reinproteine IE1 und Sp1 mit radioaktiv-markiertem ATP inkubiert wurden. Pajovic et. al. [384] konnten in diesem Assay zeigen, dass sich IE1 autophosphoryliert, aber auch phosphorylierend auf E2F einwirken kann, es sich somit um eine direkte Phosphorylierung handelt. Für Sp1 konnte dies jedoch nicht gezeigt werden, da keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt wurden (Abb. 40). Eine direkte Phosphorylierung konnte demnach nicht nachgewiesen werden. Eine indirekte Phosphorylierung über die Rekrutierung und Aktivierung von zellulären Kinasen wäre eine weitere Möglichkeit die den Anstieg des phospho-Sp1-Levels nach IE1-Überexpression erklären könnte. Die Veröffentlichung von Chun et. al. [578] untersucht die Interaktion des viralen HIV Tat-1-Proteins, ebenfalls ein unmittelbar nach viraler Infektion exprimiertes Protein, welches in seinen Fähigkeiten den HCMV Immediate Early Proteinen stark ähnelt, mit Sp1. Hier konnte gezeigt werden, dass HIV Tat-1 die Phosphorylierung von Sp1 über die Rekrutierung der DNS-PK verstärkt und so die Aktivierung zellulärer Promotoren reguliert. Um zu testen, ob diese Kinase auch einen Einfluss auf die IE1-vermittelte Sp1-Phosphorylierung hat, wurde ein Reporterassay mit Wortmanninzusatz durchgeführt (Abb. 42). Wortmannin ist ein irreversibler Inhibitor von Phosphoinositid-3-Kinasen und DNS-PK. Bei einer Konzentration von 5 μ M wurde die IE1-induzierte Promotoraktivität um 80% reduziert.

Dies spricht deutlich dafür, dass DNS-PK in die Effektvermittlung involviert ist. Chun et. al. haben für HIV Tat-1 zwei unterschiedliche Modellvorstellungen der Interaktion diskutiert (Abb. 43). Zum einen könnte das virale Protein als Linker zwischen Sp1 und DNS-PK fungieren und so die erforderliche räumliche Nähe hervorrufen, zum anderen könnte die Bindung des viralen Proteins an Sp1 eine Konformationsänderung hervorrufen, welche die nachfolgende Phosphorylierung vereinfacht [578]. Aufschluss darüber ob IE1 direkt mit DNS-PK interagieren kann, sollte ein *Pull-down*-Versuch geben. Dabei konnte keine Bindung von IE1 an DNS-PK nachgewiesen werden (Abb. 44). IE1 kann damit keine Linkerfunktion zwischen Sp1 und DNS-PK einnehmen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Immediate early 1 aufgrund der intrinsischen Kinaseaktivität die zelluläre Konzentration an phospho-Sp1 erhöht, diese Regulation jedoch nicht über eine direkte Phosphorylierung hervorgerufen wird, sondern durch Rekrutierung und Aktivierung zellulärer Kinasen, wie zum Beispiel DNS-PK, beeinflusst wird.

Es ist bekannt, dass das humane Cytomegalovirus mit vielen zellulären Kinasen interagieren kann und so Vorgänge wie den lytischen Replikationszyklus, aber auch die Aktivierung zellulärer Promotoren, beeinflussen kann (siehe 1.2.7). Zur Testung, welche zellulären Kinasen in die 5-LO-Promotoraktivierung durch IE1 involviert sind, wurde ein Proteinkinase-Inhibitor-Screening durchgeführt. Dazu wurden Inhibitoren der wichtigsten zellulären Kinasen im Reporterassay unter Überexpression von IE1 überprüft. Getestet wurde zunächst Triciribine, einen Akt-Inhibitor, der im Unterschied zu Wortmannin später in die Phosphorylierungskaskade der PI3-Kinasen eingreift und selektiv PI3-Kinasen inhibiert. Es konnte kein Einfluss auf das 5-LO-Promotorkonstrukt durch Zusatz des Inhibitors nachgewiesen werden (Abb. 45A). Dies bestätigt, dass der Akt-Signalweg bzw. PI3-Kinasen nicht in die IE1-vermittelte Promotoraktivierung involviert sind. Die Wortmannin-abhängige Hemmung des IE1-Effekts im Reporterassay (Abb.42) scheint daher nicht durch PI3-Kinasen, sondern DNS-PK vermittelt zu sein. Die PI3-Kinaseaktivität wird unmittelbar nach HCMV-Infektion durch Bindung viraler Glycoproteine an zelluläre Rezeptoren erhöht und aktiviert nachfolgend sowohl den MIEP als auch den NFκB Signalweg. Die Unabhängigkeit des IE1-induzierten induktiven Effekts von Triciribine bestätigt, dass NFκB als Transkriptionsfaktor nicht in die Promotoraktivierung involviert ist. Des Weiteren wurden Inhibitoren des MAP (mitogen activated protein)-Kinase-Signalwegs getestet, darunter der MEK1/2-Inhibitor SL327, Apigenin als MAPK/ERK-Inhibitor, JNK-Inhibitor SP600125 und der p38-Inhibitor PD169319. Im Unterschied zu Triciribine waren alle Inhibitoren des MAPK-Signalwegs

in der Lage die IE1-induzierte 5-LO-Promotoraktivität signifikant zu senken (Abb.45 A). Der MAP-Kinase-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der viralen Infektion. So konnte durch HCMV eine Aktivierung von ERK1/2 und p38 gezeigt werden [491, 492]. ERK verbleibt länger im phosphorylierten Zustand durch Inhibition der abbauenden Phosphatasen und aktiviert darauffolgend die Transkriptionsfaktoren AP1 und CREB [396, 409, 492, 495-499]. Es wird davon ausgegangen, dass die Inhibition und damit ERK-Aktivierung über Immediate Early Proteine vermittelt wird, da UV-inaktiviertes, replikationsdefizientes Virus keine Erhöhung der Kinaseaktivität zeigen [492]. Darüber hinaus kann ERK die Immediate Early Proteine IE1 und IE2 *in vitro* direkt phosphorylieren, was deren Promotorbindung positiv beeinflusst [500]. Die Reduktion der 5-LO-Promotoraktivität nach Zusatz von Apigenin könnte sich demnach dadurch erklären, dass die ERK-vermittelte Phosphorylierung von IE1 ausbleibt, und damit dessen Aktivität gemindert wird. Außerdem wäre eine aktivierende Phosphorylierung weiterer Transkriptionsfaktoren des aktivierenden GC4-Box-Komplexes, wie beispielsweise AP1, denkbar, der durch die Inhibition ausbleiben würde. Die zweite Komponente des MAP-Kinase-Signalweges, deren Hemmung durch den Inhibitor PD169319 die IE1-vermittelte induktive Wirkung auf den 5-LO-Promotor reduziert, ist p38. Diese Kinase vermittelt ihre zellulären Effekte über HSP27 und Rb. HSP27, ein Chaperon, welches die Faltung, die Translokation und die Komplexbildung von Proteinen unterstützt [503], könnte dabei Einfluss auf die Ausbildung des aktivierenden GC4-Box-Komplexes haben. Rb dagegen ist ein zellulärer Regulator, der mit Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie interagieren kann und essentielle Enzyme der DNS-Replikation wie HDACs oder die RNS-Polymerase II rekrutiert [504-507]. Interessanterweise zeigt sich hier wieder eine Verbindung zur Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren, die neben Sp1 in die Effektvermittlung involviert zu sein scheinen. Auch der JNK-Inhibitor SP600125 reduziert die 5-LO-Promotoraktivität signifikant. Über den regulativen Einfluss von JNK während der HCMV-Infektion gibt es widersprüchliche Veröffentlichungen. Wang et. al [509] und Dou et. al. [510] konnten eine Aktivierung der JNK nach Infektion zeigen. Diese wird durch ein synergistisches Zusammenwirken von IE1 und MEKK1 hervorgerufen, was nachgeordnet zur Aktivierung des JNK- und ERK-Pathways führt. Aktive JNK phosphoryliert die c-Jun-Untereinheit von AP1 und fördert so die Genexpression [511]. Die Gruppe um Xuan et. al. [514] veröffentlichte dagegen eine durch das virale Immediate Early Protein pUL38 vermittelte Unterdrückung der JNK-Phosphorylierung. Für die Aktivierung des 5-LO-Promotors scheint die IE1-induzierte JNK-Aktivierung von Bedeutung zu sein, da der verwendete Inhibitor in dieser Kaskade regulative Einflüsse zeigt (Abb. 45 A). Allerdings verfügt

der 5-LO-Promotor über keine definierte AP1-Bindungsstelle und funktionelle Regulation über AP1 konnte bislang ebenfalls noch nicht nachgewiesen werden. Eine Induktion über erhöhte Expression von AP1 als direkter Regulationsmechanismus ist daher unwahrscheinlich. Übereinstimmend mit den getesteten selektiven Inhibitoren der den Kinasen ERK, p38 und JNK des MAPK-Signalweges, zeigt auch der MEK1/2-Inhibitor SL327, welcher früher in die Phosphorylierungskaskade eingreift, inhibierende Wirkung auf den induktiven IE1-Effekt. Sodass zusammenfassend gesagt werden kann, dass die IE1-vermittelte Aktivierung des 5-LO-Promotors von MAPK-Kinasen beeinflusst werden kann.

Eine weitere getestete Inhibitorklasse sind die Inhibitoren der Proteinkinasen PKC, PKA und PKG. Die hier verwendeten Stoffe sind Chelerythrine und H-8 (Abb. 45B). Chelerythrine als PKC-Inhibitor ist nicht in der Lage, eine signifikante Hemmung des IE1-Effektes hervorzurufen. In viral infizierten Zellen fungiert die PKC zum einen als Aktivator des MIEP, indem es durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration die Bindung von cAMP an die *Response*-Elemente des Promotors fördert [469, 470]. Zum anderen ist die PKC-induzierte Phosphorylierung zellulärer Membranrezeptoren essentiell für die Aufnahme viraler Partikel [472]. Diese Mechanismen sind nicht involviert in die Aktivitätserhöhung des 5-LO-Promotors. Dagegen zeigt H-8, ein Inhibitor, der konzentrationsabhängig auf die PKA und PKG wirkt, eine signifikante Hemmung des Effektes im Reporterassay (Abb. 45B). PKA kann wie PKC den MIEP-Promotor aktivieren, scheint aber noch weitere transaktivatorische Fähigkeiten zu haben, die für die Effektvermittlung essentiell sind. Bislang gibt es keine näheren Studien über die funktionelle Rolle der PKG während der Infektion mit HCMV.

Die Testung von SU4312, einem Inhibitor von VEGFR und PDGFR erzielte wie die Inhibitoren des MAPK- und PKA/PKG-Signalweges eine Hemmung der Aktivierung des 5-LO-Promotors (Abb. 45C). Die beiden Wachstumsfaktoren regulieren physiologische Vorgänge wie Vaskulogenese und Angiogenese [545, 605] und sind im Bezug auf die HCMV-Infektion mit der Ausprägung von entzündlichen Symptomen assoziiert [534-536]. Für den genauen Regulationsmechanismus konnte bislang nur gezeigt werden, dass es bei erhöhten Spiegeln zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Chemotaxis von Monozyten kommt, was nachfolgend die Entzündung unterstützt [537, 538]. Diese Faktoren scheinen keinen direkten Einfluss auf die Promotoraktivierung zu haben. Romano et. al. [645] konnten zeigen, dass 5-LO

die Aktivität des VEGF-Promotors steigern kann und so die Expression erhöht. Es besteht daher ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen diesen beiden Proteinen. Denkbar wäre, dass die von VEGF- und PDGF-induzierten sekundären Effekte wie Zellproliferation durch beispielsweise Veränderung des zellulären Histonstatus einen Einfluss auf die 5-LO-Promotoraktivität haben. Eine Inhibition mit SU4312 könnte dadurch die Aktivität indirekt beeinflussen.

Des Weiteren zeigt Roscovitin einen regulativen Einfluss auf den IE1-vermittelten Effekt (Abb. 45 D). Dies ist ein CDK-Inhibitor, der in die Regulation des Zellzykluses eingreift, welcher die HCMV-Infektion maßgeblich beeinflusst. So kommt es beispielsweise in der G0/G1-Phase zur exzessiven Expression von Immediate Early Proteinen [519, 520]. Dabei fördern CDK7 und CDK9 die virale Transkription durch Hyperphosphorylierung der RNS-Polymerase II [521, 522]. Durch Hemmung der CDK-Aktivität mit Inhibitoren kommt es zur kompletten Unterdrückung sowohl der HCMV-Replikation [525] als auch der Wirtszellreplikation, da zelluläre Pre-Replikationskomplexe nicht gebildet werden können [516]. Dies erklärt auch, warum Roscovitin im Reporterassay eine Inhibition des IE1-Effektes verursachte. Die Downregulation der allgemeinen Replikation führt unspezifisch zur Reduktion der Promotoraktivität von sowohl 5-LO als auch weiteren zellulären Promotoren wie Sp1, die in die Induktion involviert sind.

Im Allgemeinen kann nach dem Proteinkinase-Inhibitor-Screening eine Abhängigkeit von mehreren zellulären Kinase-Signalwegen festgestellt werden, die ein komplexes Bild der IE1 induzierten Promotoraktivierung erzeugen. Relevant scheinen vor allem die Mitglieder der Tyrosinkinase- und der MAP-Kinasefamilie zu sein, die neben Sp1 weitere Transkriptionsfaktoren zur Bindung an die GC4-Box-Region rekrutieren können.

Um abschließend den entscheidenden Einfluss des Transkriptionsfaktors Sp1 zu bestätigen, wurde ein lentiviraler Sp1-*Knock-down* durchgeführt. Die Effektivität der Downregulation wurde mittels real time PCR auf mRNA-Ebene und durch Western Blot Analyse auf Proteinebene bestätigt (Abb. 46A+B). Die Sp1-defizienten Zellen zeigten sowohl im Reporterassay auf das 5-LO-Promotorkonstrukt pN10 als auch in real time PCR-Experimenten nach viraler Überexpression keine Induktion (Abb. 47, 48). Getestet wurden hierbei neben IE1 und IE2 auch die Promotordeletionskonstrukte IE1 Δ 2-3, IE1 Δ 4 und IE1 Δ ATP. Im Vergleich zu den nicht-transduzierten

Zellen fiel die Promotoraktivität auf eine zwei- bis dreifache Induktion ab. Daraus lässt sich schließen, dass Sp1 essentiell an der Effektvermittlung beteiligt ist und ein Fehlen dieses Transkriptionsfaktors nicht ausgeglichen werden kann.

Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Immediate Early 1 die Promotoraktivität von 5-LO über einem Regulationsmechanismus aktiviert, in dem Sp1 eine zentrale Funktion besitzt. Das virale Protein induziert dabei zunächst die Expression des Transkriptionsfaktors (Abb. 27) und verstärkt dessen Phosphorylierung. Darüberhinaus bindet Sp1 nach IE1-Überexpression und viraler Infektion verstärkt an den proximalen 5-LO-Promotor, wobei die GC4-Box eine entscheidende Funktion einzunehmen scheint (Abb. 39, 49, 50). Dies resultiert in einer Aktivierung der Transkription. Im Unterschied dazu ist Immediate Early 2 nicht in der Lage diese Sp1-DNS-Bindung zu fördern (Abb. 49), wonach die IE1 universelle Region des Exons 4 dafür verantwortlich zu sein scheint. Die darin enthaltene ATP-Bindungsstelle ermöglicht IE1 eine intrinsische Kinaseaktivität [384]. Allerdings kommt es nicht zu einer direkten Phosphorylierung von Sp1 durch IE1 (Abb. 40), sondern zelluläre Kinasen, vor allem des MAPK-Signalweges, sind hier vermutlich in diese posttranslationale Modifikation involviert (Abb. 42, 45). Interessanterweise führt lediglich die Sp1-Bindung an die GC4-Box-Region des 5-LO-Promotors zu einer Aktivierung, wohingegen andere Sp1-Bindungsstellen keine aktivierenden Eigenschaften zeigen. Dies spricht für die Interaktion zwischen Sp1 und weiteren Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise E2F, die in räumlicher Nähe binden und im Zusammenspiel die Induktion hervorrufen können. Gestützt werden diese mechanistischen Untersuchungen durch eine Veröffentlichung von Straat et. al. [380], die für die humane Telomerase ebenfalls eine Sp1-abhängige Promotoraktivierung durch Immediate Early 1 in humanen Fibroblasten zeigen konnten. Der zweite Teil der Arbeit charakterisiert damit den näheren induktiven Mechanismus von Immediate early 1 auf den 5-LO-Promotor im Bezug auf dessen transaktivatorische Fähigkeiten.

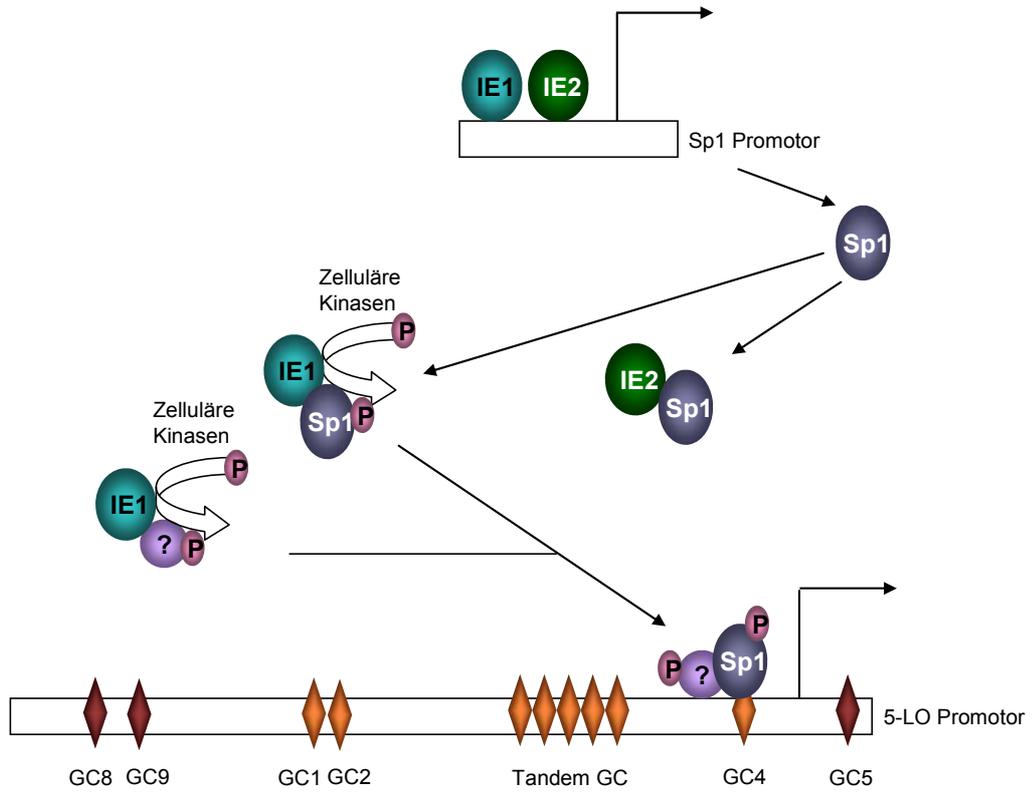


Abbildung 55: Modellvorstellung der IE1-vermittelten Regulation des 5-LO-Promotors über Sp1

5.2.2 HDAC-inhibitorischer Einfluss auf die 5-Lipoxygenase Promotoraktivität

In den mechanistischen Studien zur Untersuchung der transaktivatorischen Fähigkeiten von Immediate Early 1 gab es Hinweise darauf, dass die Induktion und Aktivierung des Transkriptionsfaktors Sp1 nicht alleinig an der Vermittlung des induktiven Effektes auf die 5-LO beteiligt ist. So konnte im Reporterassay auf das Promotordeletionskonstrukt pN10 durch Überexpression von Sp1 der IE1-Effekt nicht nachgestellt werden (Abb. 34). Da für die Immediate Early Proteine eine Histondeacetylase-inhibierende Wirkung bereits beschrieben ist [435], und bekannt ist, dass der 5-LO-Promotor durch HDAC-Inhibition aktiviert werden kann [9], wurde im dritten Teil dieser Arbeit dieser Aspekt näher untersucht.

Zur Überprüfung, ob die viralen Immediate Early Proteine IE1 und IE2 eine Protein-Protein-Interaktion mit den für den 5-LO-Promotor essentiellen HDACs zeigen, wurde ein *Pull-down*-Experiment durchgeführt (Abb. 50). Vorherige Veröffentlichungen von Nevels et. al. [464], Park et. al. [441] und Reeves et. al. [448] konnten bereits Interaktionen zwischen IE1 und HDAC3 sowie IE2 und HDAC1/2/3 nachweisen. Das durchgeführte *Pull-down*-Experiment sollte darüber hinaus die Interaktion zwischen IE1 und HDAC1/2 näher untersuchen. Es bestätigten sich die bereits beschriebenen Interaktionen zwischen den viralen Proteinen und den Histondeacetylase und zusätzlich konnte eine Interaktion zwischen IE1 und HDAC1/2 nachgewiesen werden. Es zeigte sich demnach, dass beide virale Proteine mit HDAC1/2/3 interagieren können. Da beide Immediate Early Proteine die Möglichkeit der Interaktion haben, liegt die Vermutung nahe, dass die Bindungen über gemeinsame Domänen in Exon 2/3 vermittelt werden. Alternativ könnten Zinkfinger-Motive, die beide viralen Proteine in ihren universellen Regionen besitzen, für die Interaktion verantwortlich sein, da HDAC3 im zellulären Kontext über diese Motive mit nukleären Rezeptoren interagiert [158]. Da in diesem *Pull-down*-Experiment die Interaktion von aufgereinigtem viralem Reinprotein mit zellulärem Extrakt überprüft wurde, könnte die Bindung von HDACs an die IEPs auch durch ein weiteres zelluläres Protein vermittelt werden. PML könnte einen möglichen Linker darstellen, da sowohl IE1 als auch HDAC3 hieran binden können [92, 443, 444]. Als Bestandteil zelluläre ND10-Strukturen kann IE1 sich verstärkt an PML anlagern, da es zu einer Akkumulation an diese zelluläre Struktur nach Infektion kommt [443, 646]. Ob die Bindung von IE1 an PML pro- oder antivirale Effekte zeigt, wird bislang noch kontrovers diskutiert. So konnten Tavalai et. al. [647] im PML *Knock-down* Zellen eine verstärkte virale Replikation zeigen,

was dessen Einfluss in die intrinsische Immunantwort nach viraler Infektion nahelegt. Dagegen konnte gezeigt werden, dass die Anlagerung von Immediate early Proteinen an die ND10-Strukturen die Transkription fördert und so die virale Replikation induziert [648]. Der Aspekt der transkriptionsfördernden Wirkung würde für die Linkerfunktion zwischen den Immediate Early Proteinen und den HDACs sprechen.

Für die Untersuchung der funktionellen Einflüsse der HDAC-Bindung durch Immediate Early 1, wurde die Aktivität der Histondeacetylasen mit und ohne virale Überexpression bestimmt (Abb. 51). Dazu wurde zum einen die allgemeine HDAC-Aktivität mit dem Substrat ZMAL, aber auch selektiv die HDAC1-Aktivität mittels B61 vermessen [649]. Es zeigte sich, dass IE1 die allgemeine HDAC-Aktivität signifikant inhibieren kann. Bei der Testung der HDAC1 spezifischen Aktivität bestätigte sich die inhibitorische Fähigkeit. Die Interaktion zwischen IE1 und HDAC führte zu einer Reduktion der Aktivität der histonmodifizierenden Enzyme. Nevels et. al. [435] konnten zeigen, dass es in Abwesenheit von IE1 zu einer verminderten H4-Acetylierung (acH4) von sowohl viralen Promotoren wie UL44 und MIEP aber auch zellulären Promotoren wie c-fos kommt. Übereinstimmend damit zeigte die IE1-Deletionsmutante CR208 eine verminderte Replikationsfähigkeit, die durch den Zusatz von TsA wieder erhöht werden konnte. TsA als pan-HDAC-Inhibitor imitiert damit die IE1-induzierte HDAC-Wirkung. Im HDAC-Aktivitätsassay konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass IE1 eine direkte Wirkung auf die Enzymaktivität ausübt, und resultierend dadurch auf den Chromatinstatus und die transkriptionelle Promotoraktivität Einfluss nehmen kann. Im physiologischen Kontext nutzt das Virus diese Eigenschaft aus, um aus der Latenzphase zu reaktivieren.

Funktionelle Studien sollten daraufhin zeigen, ob die durch IE1 reduzierte HDAC-Aktivität Auswirkungen auf die Regulation des 5-LO-Promotors hat. In der Veröffentlichung von Klan et. al. [171] konnte gezeigt werden, dass der pan-HDAC-Inhibitor TsA die Aktivität des 5-LO-Promotors steigern kann. Neuere Untersuchungen selektiver HDAC-Inhibitoren sowie gezielte *Knock-down* Experimente einzelner HDACs zeigten, dass die Regulation des 5-LO-Promotors durch HDAC2, vor allem aber durch HDAC3 vermittelt wird [172]. Darüber hinaus konnte Doetzlhofer et. al. [26] für Sp1 eine HDAC-abhängige Regulation nachweisen (Abb. 56). Sp1 interagiert direkt mit HDAC1 und wird daraufhin deacetyliert, was eine Transkriptionsrepression zur Folge hat. Bei

Inhibition der HDAC1-Aktivität hingegen, kann Sp1 u.a. in Kombination mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie E2F1-3 an die DNS binden und eine Transkriptionsaktivierung induzieren.

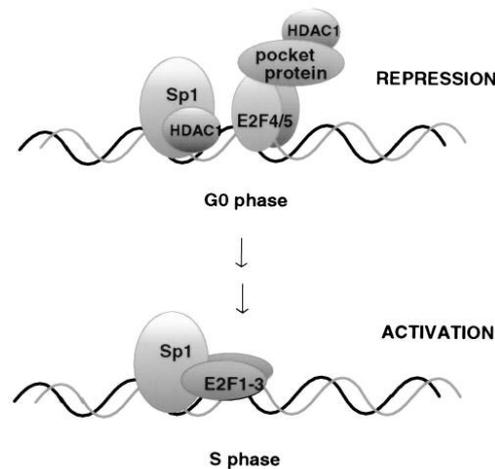


Abbildung 56: Modellvorstellung der HDAC1-abhängigen Sp1-Bindung nach Doetzlhofer et. al. [26]

Zur Überprüfung, welchen Einfluss diese epigenetischen Regulationsmechanismen auf die IE1-induzierte 5-LO-Promotoraktivierung haben, wurde ein Reporterassay-Experiment durchgeführt. Darin wurde versucht, durch Überexpression einzelner HDAC-Proteine den inhibitorischen Effekt von IE1 aufzuheben (Abb. 53). Die verstärkte HDAC-Proteinmenge wurde dabei mittels Western Blot Analyse überprüft (Abb. 54). Es zeigte sich, dass steigende Mengen an HDAC1 den induktiven Effekt auf den 5-LO-Promotor aufheben konnten. Diese Regulation ist ebenfalls für HDAC3, nicht aber für HDAC2 zu beobachten. Die Versuche zeigten zum einen, dass die Induktion des 5-LO-Promotors durch IE1 abhängig von der zellulären Aktivität der Histondeacetylasen ist, zum anderen bestätigte sich das Bild, dass HDAC1 und 3 dabei die essentielle Funktion übernehmen. Dies stimmt mit den Beobachtungen der *Knock-down* Experimente überein, in denen HDAC3 als wichtigster epigenetischer Regulator charakterisiert wurde. HDAC1-Inhibition dagegen scheint keinen direkten Einfluss auf die 5-LO-Promotorstruktur auszuüben, sondern vermittelt seine Wirkung über die Acetylierung von Sp1. Diese Effekte scheinen abhängig von der verwendeten Zelllinie und der jeweiligen endogenen Sp1-Konzentration zu sein, da in MM6 im Unterschied zu Fibroblasten und HEK293T die 5-LO-Promotorregulation HDAC1-unabhängig verläuft [26, 172].

Bezug nehmend auf die Ergebnissen des ersten Teils, in denen gezeigt werden konnte, dass die Sp1-Bindung an die GC4-Box-Region des 5-LO-Promotors essentiell für die IE1-induzierte Aktivierung ist, lässt sich das Ergebnis der Reporteragenassays mit HDAC-Überexpression dahingehend interpretieren, dass das virale Protein über HDAC3-Inhibition den Chromatinstatus des 5-LO-Promotors direkt beeinflussen kann. Die HDAC1-Inhibition vermittelt dagegen zelltypabhängig additive Effekte über die Regulation der Sp1-Bindung an die Promotorstruktur. Eine Überexpression von sowohl HDAC1 als auch HDAC3 hat demnach eine verminderte Induktion des 5-LO-Promotors durch IE1 zur Folge.

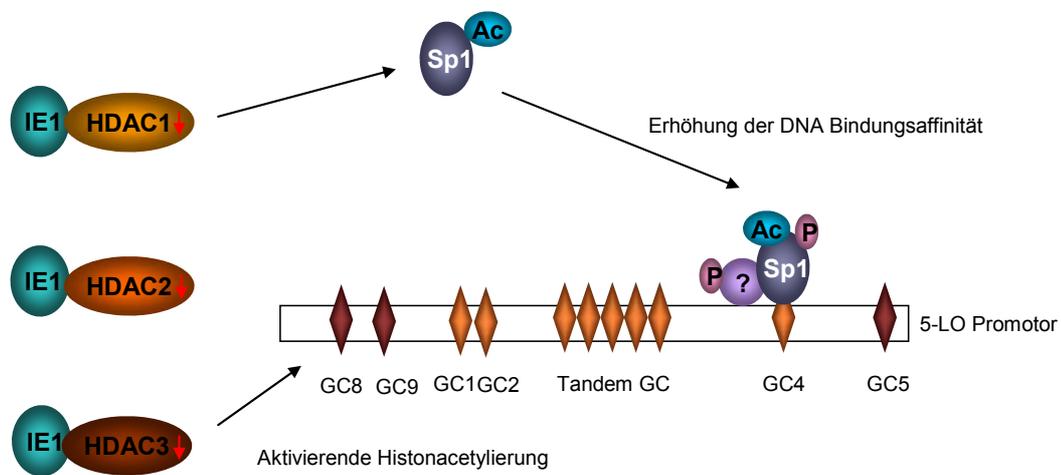


Abbildung 57: Modellvorstellung der IE1-vermittelten 5-LO-Promotorregulation über HDAC-Inhibition

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass Immediate Early 1 neben der Sp1-vermittelten Aktivierung des 5-LO-Promotors auch über Regulation der HDACs und damit Veränderung des Chromatinstatus Einfluss nehmen kann. Bestätigt wird dieser Mechanismus durch die Untersuchungen von Straat et. al. [380], in denen gezeigt werden konnte, dass ebenfalls der humane Telomerase Promotor über einen Sp1- und HDAC-abhängigen Signalweg reguliert wird. Der dritte Teil dieser Arbeit liefert damit nähere Erkenntnisse über die komplexe Regulation des 5-LO-Promotors durch das virale Immediate Early 1 Protein. Die im Ziel der Arbeit postulierten Verknüpfungspunkte zwischen den funktionellen Eigenschaften von Immediate Early 1 und den Aktivierungsstrategien des 5-Lipoxygenase Promotors konnten bestätigt und ein präzises Bild des Induktionsmechanismus aufgeklärt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die 5-Lipoxygenase ist das Schlüsselenzym der Bildung proentzündlicher Leukotriene. Diese Mediatoren sind assoziiert mit Erkrankungen des entzündlichen Formenkreises wie beispielsweise Arteriosklerose [6]. Durch die Veröffentlichungen von Qiu et. al. [248] und Gredmark-Russ et. al. [650] konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit humanen Cytomegalovirus *in vitro* und *in vivo* zur Induktion der 5-LO in HPASMCs und SMCs (*smooth muscle cells*) führt. HCMV ist ein β -Herpesvirus, welches nach einer zumeist asymptomatischen Primärinfektion, dauerhaft im Wirt persistiert und bei Schwächung des Immunsystems oder entzündliche Prozessen reaktiviert werden kann [256]. Geht das Virus in die lytische Replikationsphase über, werden Entzündungsprozesse gefördert, die zur Ausprägung von Krankheitsbildern wie Retinitis, rheumatoider Arthritis oder auch Psoriasis führen. Es besteht demnach ein Zusammenhang zwischen der aktiven HCMV-Infektion und Erkrankungen des entzündlichen Formenkreises, welche unter anderem durch die Induktion der 5-LO vermittelt wurden.

Ziel der Arbeit war es, den molekularen Mechanismus der viral induzierten 5-LO-Promotoraktivierung aufzuklären. Dazu wurde zunächst überprüft, ob die Infektion mit HCMV in HFF, einer Zelllinie die äußerst permissiv für die Infektion ist und daher zumeist als Testsystem für HCMV herangezogen wird, eine verstärkte 5-LO-Expression hervorruft, oder ob es sich um einen zelltypspezifischen Effekt der *smooth muscle cells* handelt. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Infektion zu einer verstärkten Promotoraktivierung, mRNA- sowie Proteinexpression der 5-LO kam (Abb. 19, 23, 24). Weitere Untersuchungen charakterisierten, welches virale Protein die Effektvermittlung bedingte. Aufgrund der sequentiellen Genexpression des Virus unterscheidet man nach Zeitpunkt der Expression in Immediate Early, Early und Late Proteine, wobei letztere erst nach Replikation des viralen Genoms exprimiert werden. Der Zusatz von Foscavir als Replikationsinhibitor verdeutlichte, dass ein Immediate Early oder Early Protein die Induktion hervorruft (Abb. 16). Reporterassay-Experimente unter Überexpression einzelner viraler Proteine zeigten, dass Immediate Early 1 essentiell an der Erhöhung der 5-LO-Promotoraktivität beteiligt ist (Abb. 18). Weitergehende Versuche unter Verwendung des IE1-Deletionsvirus CR208 bestätigten, dass die Induktion der 5-LO-Promotoraktivität sowie der mRNA-Expression durch dieses virale Protein vermittelt wird (Abb. 18, 20-22). Auf Proteinebene konnte ebenfalls nach IE1-Überexpression beziehungsweise nach Infektion mit HCMV eine erhöhte 5-LO-

Expression detektiert werden (Abb. 23 und 24). Aktivitätsuntersuchungen, bei denen die Konzentration der 5-LO-Produkte LTB₄ und 5-HETE gemessen wurden, bestätigten, dass das Enzym funktionsfähig ist (Abb. 25). Nach Infektion mit HCMV kommt es demnach zur IE1-vermittelten Induktion der 5-LO auf mRNA- und Proteinebene sowie nachgeordnet zur verstärkten Produktion von inflammatorischen Leukotrienen, die an der Ausbildung der entzündlichen Symptomatik einer lytischen Infektion beteiligt sind.

Immediate Early 1 ist ein potenter Transaktivator, der sowohl virale als auch zelluläre Promotorstrukturen aktivieren kann [387]. Funktionell wird dies reguliert über die Förderung der Transkriptionsfaktor-Expression, aber auch durch Beeinflussung histonmodifizierender Enzyme wie Histondeacetylasen [464]. Für den 5-LO-Promotor ist bekannt, dass dessen Aktivität über Bindung von Sp1, sowie durch HDAC-Inhibition beeinflusst werden kann [9, 171]. Diese beiden Regulationsmechanismen stellen demnach mögliche Verknüpfungspunkte in der viral induzierten Induktion des 5-LO-Promotors dar. Zunächst wurde die Expression von Transkriptionsfaktoren, welche charakterisierte Bindungsstellen im 5-LO-Promotor besitzen, nach IE1-Überexpression untersucht. Es zeigte sich, dass der zelluläre Sp1-mRNA-Spiegel durch IE1 80fach induziert werden kann (Abb. 27). Im Reporterassay mit 5-LO-Promotordeletionskonstrukten, bei denen gezielt einzelne Sp1-Bindungsstellen, sogenannte GC-Boxen, mutiert wurden, konnte bestätigt werden, dass die IE1-vermittelte Induktion essentiell von Sp1-abhängt, da die Mutation der GC4-Box die Aktivierung nahezu komplett inhibiert (Abb. 30, 31). Auch der Zusatz von Mithramycin, einem DNS-Interkalator, welcher die Bindung von Sp1 an die DNS unterdrückt, ist in der Lage die Induktion abzuschwächen (Abb. 33) [651]. Um die direkte Sp1-Bindung an den 5-LO-Promotor nachzuweisen wurden sowohl EMSA- als auch ChIP-Experimente durchgeführt. Es zeigte sich, dass *in vitro* und *in vivo* die Sp1-Bindung an den proximalen 5-LO-Promotor nach IE1-Überexpression beziehungsweise nach Infektion zunimmt (Abb. 49, 50). Interessanterweise wird dieser Effekt nicht durch Immediate Early 2, einer Spleißvariante von IE1, welche eine große strukturelle Ähnlichkeit aufweist, hervorgerufen. Da Veröffentlichungen gezeigt haben, dass beide Immediate Early Proteine in der Lage sind, Sp1 auf mRNA-Level zu induzieren, muss ein weiterer regulatorischer Mechanismus in die Sp1-Promotorbindung involviert sein [410]. In Co-Immunopräzipitations Versuchen zeigten beide IEPs eine Interaktion mit Sp1 (Abb. 38), wonach der Unterschied in der transaktivierenden Fähigkeit des 5-LO-Promotors nicht durch Protein-Protein-Bindung mit Sp1 bedingt wird. Strukturell

unterscheiden sich die beiden Proteine in ihrer carboxyterminalen Sequenz. Für IE1 ist hier eine intrinsische Kinaseaktivität beschrieben, die zur Autophosphorylierung, aber auch zur Phosphorylierung von Bindungsproteinen führen kann. Western Blot Analysen auf den zellulären phospho-Sp1-Gehalt nach viraler Überexpression konnten zeigen, dass IE1, nicht aber IE2 die posttranslationale Modifikation des Transkriptionsfaktors fördert (Abb. 39). Auch die Testung viraler Deletionsmutanten, denen einzelne Exons beziehungsweise die ATP-Bindungsstelle der Kinasedomäne fehlen, bestätigten die Schlüsselfunktion dieses Strukturelements (Abb. 37). Ob es sich um eine direkte oder indirekte Phosphorylierung von Sp1 durch IE1 handelt wurde durch *in vitro* Kinase-Assays und die Testung unterschiedlicher Proteinkinase-Inhibitoren bestimmt (Abb. 40, 42, 45). Obwohl die beiden Proteine miteinander interagieren können, kam es nicht zu einer direkten Phosphorylierung, sondern zelluläre Kinasen wie Tyrosinkinasen und nachgeordnet die Mitglieder des MAPK-Signalweges sind in die Phosphorylierung von Sp1 involviert. Die finale Bestätigung der essentiellen Funktion von Sp1 in der IE1-vermittelten Aktivierung des 5-LO-Promotors lieferte ein Reporterassay-Experiment mit Sp1-*Knock-down* Zellen, welche nach viraler Überexpression keine 5-LO-Promotoraktivität und mRNA-Expression mehr zeigten (Abb. 47, 48). Für die Vermittlung der IE1-induzierten 5-LO-Promotoraktivierung sind dessen transaktivatorische Fähigkeiten demnach essentiell, durch Erhöhung der Sp1-mRNA-Expression und nachfolgender Phosphorylierung wird die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors an die GC4-Box des 5-LO-Promotors erhöht und dieser damit transkriptionell aktiviert.

Neben der Regulation über verstärkte phospho-Sp1-Bindung an die GC4-Box Region muss die Induktion von 5-LO durch IE1 noch über weitere Interaktionen vermittelt werden, da die reine Sp1-Überexpression ohne IE1 keine Promotoraktivierung hervorrufen konnte (Abb. 34). Überprüft wurde daher die HDAC-inhibitorische Fähigkeit von IE1, da der 5-LO-Promotor über diese epigenetischen Mechanismen reguliert werden kann. *Pull-down*-Experimente zeigten zunächst eine Protein-Protein-Interaktion zwischen IE1 und HDAC1/2/3 (Abb. 51). Nachfolgend konnte in einem HDAC-Aktivitätsassay gezeigt werden, dass diese Interaktion die Enzymaktivität der HDACs drastisch reduziert (Abb. 52). Durch HDAC-Inhibition liegen Promotorstrukturen zunehmend acetyliert vor und sind damit transkriptionell aktiv. Für den funktionellen Nachweis auf den 5-LO-Promotor diente ein Reporterassay-Experiment in dem IE1 und in steigenden Mengen HDAC überexprimiert wurde (Abb. 53). Die Überexpression von HDAC1 und HDAC3 konnten den aktivierenden Einfluss von IE1 auf den 5-LO-Promotor teilweise konzentrationsabhängig

revertieren und scheinen damit an der Effektvermittlung beteiligt zu sein. Die Charakterisierung der HDAC-vermittelten 5-LO-Promotorregulation von Pufahl et. al. bestätigte durch *Knock-down* Experimente, dass HDAC3 entscheidenden Einfluss auf den 5-LO-Promotor hat [172]. HDAC1 dagegen reguliert über die verstärkte Deacetylierung von Sp1 dessen DNS-Bindungsaffinität. Eine Hemmung dieser beiden Histondeacetylasen durch das virale Protein erhöht damit die Aktivität des 5-LO-Promotors.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Ziel der Arbeit erreicht wurde und ein detaillierter Mechanismus der 5-LO-Promotoraktivierung durch HCMV aufgeklärt wurde. Immediate Early 1 induziert dabei zunächst die Expression und Phosphorylierung von Sp1. Ebenso interagiert das virale Protein mit HDAC1/2/3 und hemmt deren Aktivität, wodurch es zur Öffnung der 5-LO-Promotorstruktur kommt. Entscheidend ist hierbei vor allem die Hemmung von HDAC3. HDAC1 Inhibition sorgt im getesteten Zellsystem zusätzlich für verstärkte Acetylierung des Transkriptionsfaktors Sp1, welcher aufgrund der dadurch erhöhten DNS-Bindungsaffinität an die GC4-Box-Region binden und so die Transkription fördern kann. Interessanterweise ist die Bindung an andere beschriebene GC-Boxen des 5-LO-Promotors nicht induktiv, was die Annahme nahelegt, dass nicht Sp1 alleine, sondern ein transaktivatorischer Komplex an diese Region bindet. Die Aktivierung des Promotors führt nachfolgend zur mRNA- und Proteinexpression, welche eine verstärkte Leukotrienbildung zur Folge hat. Diese Mediatoren sind in die Entstehung der entzündlichen Charakteristik einer aktiven HCMV involviert. Das Virus macht sich demnach generelle Prinzipien der Transaktivierung zu Nutze und fördert so zum einen seine Reaktivierung aus der Latenz, zum anderen die produktive Verbreitung der Infektion.

7 ABKÜRZUNGEN

5-HETE	5-Hydroxyeicosatetraensäure
5-HPETE	5-Hydroperoxyeicosatetraensäure
5-LO	5-Lipoxygenase
5-oxo-EETE	5-oxo-Eicosatetraensäure
AA	arachadonic acid, Arachidonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3-Amino-5-Ethylcarbazol
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ANOVA	analysis of variance
AP-2	activating protein-2
ARD	Ankyrin repeat domain
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adenosintriphosphat
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrom X-linked protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BIC	Natriumbicarbonat
BLT	leukotriene B4 receptor
bp	base pairs, Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CamKII	Calcium/Calmodulin dependend protein kinase II
CBP	CREB binding protein
CD	Circulardichroismus bzw. cluster of differentiation
CDK	cyclin-dependent kinase, Cyclin-abhängige Kinase
ChIP	chromatinimmunoprecipitation, Chromatinimmunopräzipitation
CLP	Coactosin-like protein
CML	Chronisch myeloide Leukämie
Co-IP	coimmunoprecipitation, Co-Immunopräzipitation

Abkürzungen

COX-2	Cyclooxygenase 2
cPLA ₂	cytosolic phospholipase A ₂ , Zytosolische Phospholipase A ₂
CREB	cAMP responsive element binding protein
crs	cis repression element, cis repressives Element
CTF-1	cardiotrophin 1
CysLT	Cysteinyl Leukotriene
Da	Dalton
DAG	Diacylglyceride
DHA	Docosahexaensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	DNA-dependend protein kinase; DNS-abhängige Proteinkinase
DNMT-1	DNA-cytosin-methyltransferase-1, DNS-Cytosin-Methyltransferase-1
DNS	Deoxyribonucleic acid; Deoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DUSP6	dual specificity phosphatase 6
E	Early
E2F	E2 factor
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Egr-1	Early-growth response factor 1
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EPA	Eicosapentaensäure
ERF	Ets2 repressor factor
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
Ets-1	v-etv erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLAP	5-lipoxygenase activating protein
fMLP	N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanin
G9a	histone-lysine N-methyltransferase 2
gB	glycoprotein B, Glycoprotein B

Abkürzungen

GM-CSF	granulocyte-macrophage stimulating factor
GPx	Glutathionperoxidasen
GSH	Glutathion
GSK3 β	glycogen synthase kinase 3
GST	glutathion-S-transferase
HAT	Histonacetyltransferase
HCMV	human cytomegalovirus; Humanes Cytomegalovirus
HDAC	Histondeacetylase
hDaxx	human death domain associated protein
HeBS	Hepes buffered saline
HEK293T	human embryonic kidney 293 T cells; Humane embryonale Nierenzellen 293T
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethanesulfonisäure
HETE	Hydroxyeicosatetraenoic acid, Hydroxyeicosatetraensäure
HFF	human foreskin fibroblasts, Humane Vorhaut-Fibroblasten
HMT	Histonmethyltransferase
HP-1	heterochromatin protein-1
HPASMC	human pulmonary arterial smooth muscle cells
HPETE	Hydroperoxyeicosatertaensäure
hpi	hours post infection
HSP	heat shock protein
hTERT	humane Telomerase
IE	Immediate Early
IE1	Immediate Early 1
IE2	Immediate Early 2
IEP	Immediate Early Proteine
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IKK	I κ B-kinase-komplex
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
I κ B	inhibitors of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells

Abkürzungen

JMJD	jumonji-domain-containing demethylase
JNK	c-Jun N-terminal kinase, c-Jun N-terminale Kinase
KLF	Krüppel like factor
L	Late
LB	luria broth
LC-MS/MS	liquid chromatography-mass spectrometry
LO	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LSD	Lysin Demethylase
LTA4	Leukotrien A4
LTB4	Leukotrien B4
LTC4	Leukotrien C4
LTD4	Leukotrien D4
LTE4	Leukotrien E4
MAP	mitogen-activated protein
MAPEG	membran assoziated proteins in eicosanoid and glutathion metabolism
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MARCKS	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
Mcl-1	myeloid cell leukemia sequence 1
MCMV	murine cytomegalovirus, Murines Cytomegalovirus
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MEK	mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase
MEKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MGST	microsomal glutathion-S-transferase
MHC II	major histocompatibility complex class II
MIEP	Major Immediate Early Promotor
MIP-1 α	chemokine ligand 3
MK2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
MKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MKP3	MAP kinase specific phosphatase 3
MM6	Mono Mac 6

Abkürzungen

Mnk-1	MAP-kinase interacting serine/threonine kinase 1
MOI	multiplicity of infection; Multiplizität der Infektion
mRNS	messenger ribonucleinacid, messenger Ribonukleinsäure
MSK	salt-inducible kinase 1
NAB	NGFI-A binding protein
NAD ⁺	Nicotinamid Adenin Dinucleotid
NCoR	nuclear receptor corepressor
ND10	nuclear domain 10
NES	nuclear export sequence, nukleäre Exportsequenz
NF-1	Nuclear factor IIC
NFAT-1	nuclear factor of activating T-cells-1
NFκB	nuclear factor kappa B
NLS	nuclear localisation sequence, nukleäres Lokalisationssignal
OAG	Oleyl-2-acetyllycerol
oriLyt	lytic origin of replication
P/CAF	Lysin Acetyltransferase 2B
p300	E1A binding protein
PAF	platelet-activating factor
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffer salin
PC	Phosphatidylcholin
PCR	polymerase cain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PGE ₂	Prostaglandin E2
PI3K	phosphoinositide 3-kinase; Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G

Abkürzungen

PML	promyelocytic leukemia
PMNL	polymorphnuclear leukocytes, Polymorphnukleäre Leukozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	peroxisom proliferator-activated receptor
PRMT	protein arginin methyltransferase
PTM	Posttranslationale Modifikation
Pu.1	spleen focus forming virus proviral integration oncogene spi1
qPCR	real time PCR
RAR	retinoic acid receptor
Rb	retinablastoma
REL	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
rh	recombinant, rekombinant
RHD	REL-Homologie Domäne
RLU	relative luminescence units, Relative Lumineszenz Einheiten
RNS	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RNS-Pol II	RNA-Polymerase II; RNS-Polymerase II
rpm	rounds per minute
RUNX1	runt-related transcription factor 1
RXR	retinoid-X-receptor
S.E.M.	standard error of the mean
SAP1 α	prosaposin α
SBE	SMAD binding element
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SKIP	SNW domain containing protein 1
SMAD	sma and mad related family
SMC	smooth muscle cells
SMRT	nuclear receptor corepressor 2
Sp1/3	specificity factor 1/3
STI	Soybean trypsin inhibitor
SUMO	small ubiquitin-related modifiers
TAF	TATA associated factor

Abkürzungen

TBP	TATA binding protein
Tef-1	EA domain family member 1
TFIIB	Transcription initiation factor IIB
TFIID	TATA box binding factor IID
TGF β	transforming growth factor β
TIS	transcription initiation site, Transkriptionsinitiationsstelle
TLR	Toll-like receptor
TNF α	tumor necrosis factor α
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TsA	Trichostatin A
UBC	ubiquitin conjugating enzyme
UV	ultraviolett
V	Volt
VDR	vitamin-D-receptor
VDRE	vitamin-D-response element
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VSVG	Vesicular stomatitis virus G protein
WT1	Wilms tumor 1
YY1	Ying Yang 1

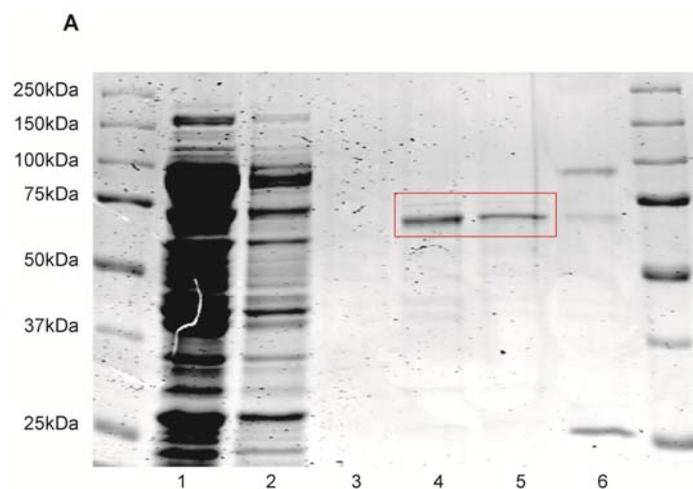
8 ANHANG

8.1 Etablierung der viralen Proteinexpression

8.1.1 Aufreinigung bakteriell-exprimierter viraler Proteine

Um näher zu charakterisieren, ob es sich bei der durch IE1-induzierten Sp1-Phosphorylierung um eine direkte oder Kinase-vermittelte Reaktion handelt, wurde die Expression der viralen Proteine IE1 und IE2 in BL21DE3pLysS *E. coli* in Anlehnung an die Veröffentlichung von Furnari et al. [417] von Ann-Kathrin Häfner (AK Prof. Steinhilber) etabliert.

Die Proteinaufreinigung erfolgte über den GST-tag der umklonierten Expressionsplasmide. Nach Aufreinigung über GSH-Sepharose Säulen befand das aufgereinigte Protein in der Spaltungsfraction (Abb. 58, Spur 4). Für IE1 ist hier eine 72 kDa Bande zu sehen, für IE2 eine etwas größere 86 kDa Bande. Im GST-Eluat (Abb. 58, Spur 6) findet sich neben dem eluierten GSH-tag (26 kDa) des Proteins, für IE1 auch noch ein Teil ungespaltenes GST-IE1 (98 kDa), dass mit 40U Factor Xa nach 2 Stunden noch nicht vollständig abgespalten war. Da die erreichten Proteinkonzentrationen jedoch für die folgenden Versuche ausreichend waren, wurde die Spaltungszeit nicht verlängert.



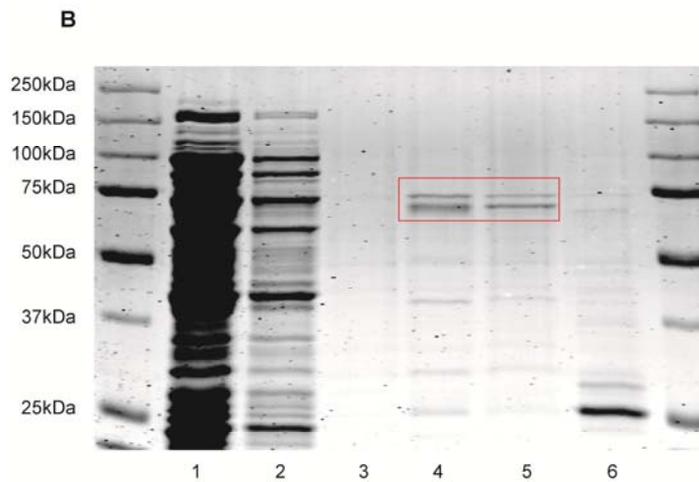


Abbildung 58: Coomassie Gele der Etablierung der Proteinexpression; (A) Immediate Early 1 (B) Immediate Early 2; Spur 1: Durchfluss; Spur 2: PBS Waschschrift; Spur 3: Cleavage-Puffer; Spur 4: Spaltungsfraction; Spur 5: Aufkonzentriertes Protein; Spur 6: GST-Eluat

8.1.2 Faltungsanalyse der bakteriell-exprimierten Proteine

Für die Überprüfung, ob nach bakterieller Expression die viralen Proteine gefaltet vorliegen, was eine Grundvoraussetzung für deren Funktionalität darstellt, wurde ein CD-Spektrum von Immediate Early 1 und Immediate Early 2 aufgenommen und mit den Referenzspektren (Abb. 59) verglichen. Die Analyse wurde mit Hilfe von Mirjam Schröder (Arbeitskreis Prof. Steinhilber) durchgeführt.

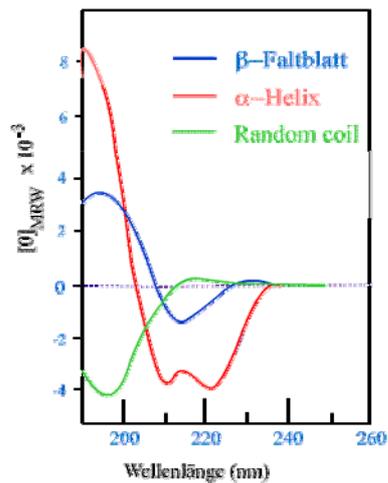


Abbildung 59: UV- Referenzspektren unterschiedlicher Faltungstypen am Beispiel von Poly-L-Lysin nach [652]

Die Spektren der viralen Proteine deuteten darauf hin, dass beide Proteine gefaltet vorliegen (Abb. 60). Für Immediate Early 1 entsprach das UV-Spektrum dem Referenzspektrum α -helikal gefalteter Proteine (Abb. 60A), Immediate Early 2 hingegen eher der *random-coiled* Struktur (Abb. 60b). Man kann also davon ausgehen, dass beide Proteine einer gewissen Faltung unterliegen. Da es keine Veröffentlichungen bezüglich der Sekundärstruktur der beiden HCMV-Proteine gibt, kann man keine Aussage darüber treffen, ob diese Strukturen der nativen Faltung entsprechen.

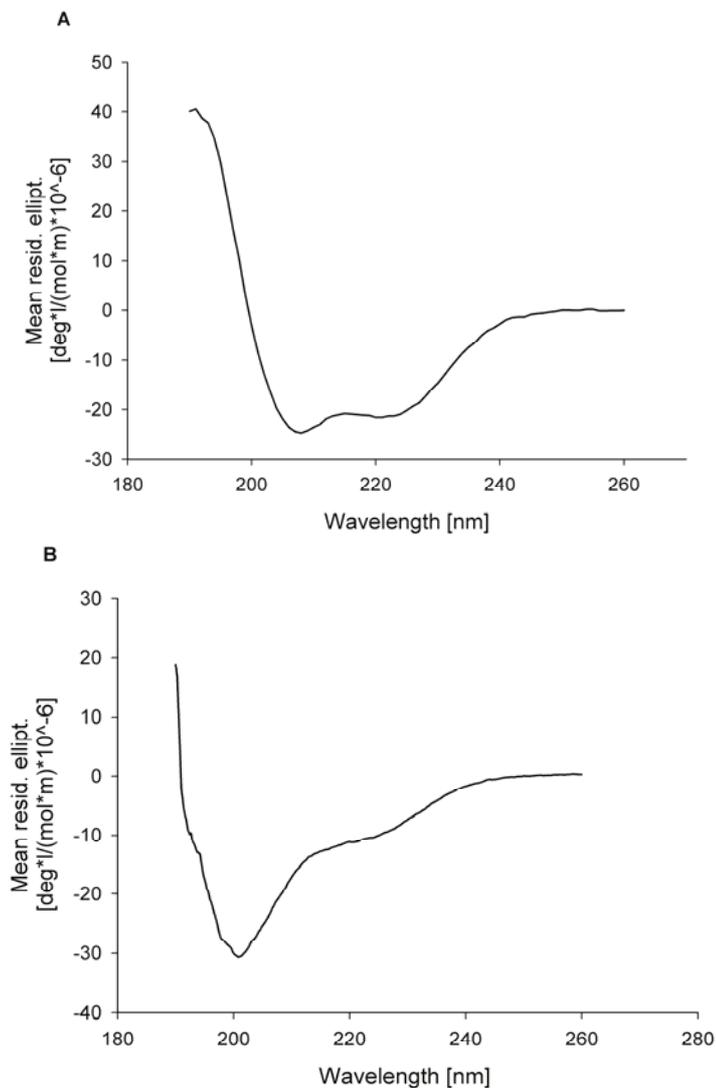


Abbildung 60: UV-Spektren der bakteriell-exprimierten viralen Proteine Immediate Early 1 (A) und Immediate Early 2 (B); Die Proteine werden in einer Endkonzentration von 10 μ M in 10 mM PB-Puffer pH 7,5 aufgenommen und danach das UV-Spektrum im Bereich zwischen 180nm und 260nm gemessen.

8.1.3 ATP-Bindung von Immediate Early 1

Die ATP-Bindungsstelle im Exon 4 von Immediate Early 1 (Abb. 36) ist eine bereits beschriebene funktionelle Domäne, die für den induktiven Effekt von Immediate Early 1 auf 5-LO entscheidend zu sein scheint (Abb. 37). Um die Funktionalität dieser Domäne zu überprüfen, wurde das aufgereinigte IE1 Protein über eine ATP-Säule gegeben (Abb. 61).

Die höchste Proteinkonzentration fand sich in Spur 4, dem ATP-Eluat, und nur geringe Mengen in Spur 2 und 3, den Waschfraktionen. Es lässt sich feststellen, dass Immediate Early 1 an die ATP-Agarose binden kann, die ATP-Bindungsstelle demnach funktionell zu sein scheint.

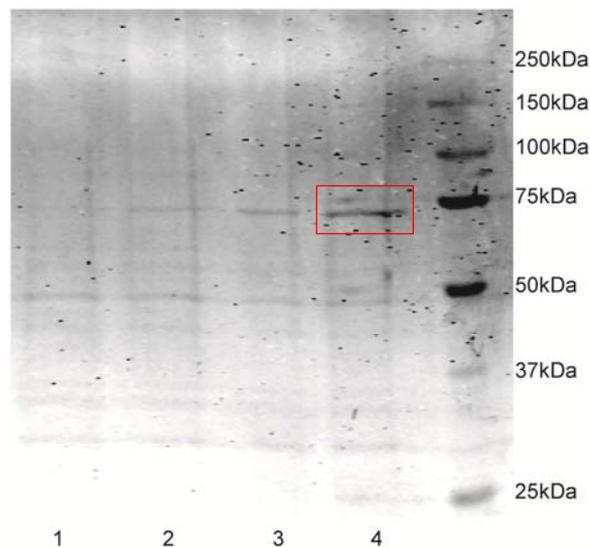


Abbildung 61: Überprüfung der ATP-Bindungsstelle von Immediate Early 1; Spur 1: Proteinlösung in PB-EDTA (Auftrag); Spur 2: PBS/EDTA Waschschrift; Spur 3: 0,5 M NaCl Waschschrift; Spur 4: ATP-Eluat

9 ABBILDUNGEN

Abbildung 1: Struktur des 5-LO-Gens und Charakterisierung der GC-Boxen in der Promotorregion modifiziert nach Radmark et. al. [6].....	3
Abbildung 2: Regulation der zellulären Sp1-Aktivität.....	5
Abbildung 3: Nucleosomale DNS-Organisation [141].....	11
Abbildung 4: Struktur der humanen 5-Lipoxygenase.....	16
Abbildung 5: Übersicht der Leukotrienbiosynthese nach Radmark et. al. [190].....	18
Abbildung 6: Zelluläre Regulation der 5-Lipoxygenase nach Radmark et. al. [6].....	22
Abbildung 7: Strukturformel Zileuton.....	25
Abbildung 8: Strukturformel Montelukast (A) und Zafirlukast (B).....	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Cytomegalovirions nach expasy [260].....	27
Abbildung 10: Darstellung des lytischen Replikationszyklus nach Knipe et. al. [317].....	30
Abbildung 11: Charakterisierung der Transkriptionsfaktor Bindungsstellen im Major Immediate Early-Promotor sowie Struktur der Immediate Early Proteine.....	35
Abbildung 12: Regulation des Major Immediate Early Promotors über Histonmodifikation nach Sinclair et. al. [1].....	41
Abbildung 13: Regulation des lytischen Replikationszykluses von HCMV durch Histonmodifikation abgewandelt nach Sinclair et. al.....	43
Abbildung 14: Induktion der 5-LO-mRNS-Expression in HFF nach Infektion mit HCMV AD169.....	71
Abbildung 15: AEC-Färbung von HCMV AD169 MOI 1 infizierten humanen Vorhaut-Fibroblasten.....	72

Abbildung 16: Induktion der 5-LO-mRNS-Expression in HFF nach Infektion mit HCMV AD169	73
Abbildung 17: 5-LO-mRNS-Expression in HFF nach Infektion mit HCMV AD169, UV inaktiviertem Virus sowie filtriertem (virusfreiem) Virusüberstand.	74
Abbildung 18: Induktion des 5-LO-Promotorfragments pN10 in humanen Vorhaut-Fibroblasten nach Überexpression diverser HCMV Proteine	75
Abbildung 19: AEC-Färbung von humanen Vorhaut-Fibroblasten infiziert mit unterschiedlichen Virusstämmen..	76
Abbildung 20: Induktion von pN10 in infizierten HFF	77
Abbildung 21: Quantifizierung der Immediate Early 1-mRNS in CR208 infizierten HFF	78
Abbildung 22: Quantifizierung des 5-LO-mRNS-Spiegels in infizierten HFF	79
Abbildung 23: Immunocytochemische Färbung von 5-LO und IE1 in infizierten bzw. IE1 überexprimierten HFF.	80
Abbildung 24: Western Blot als Expressionskontrolle des 5-LO-Proteins in uninfizierten, IE1 überexprimierten oder AD169 infizierten HFF	80
Abbildung 25: Bestimmung der 5-LO-Produktbildung nach HCMV-Infektion und IE1-Überexpression	81
Abbildung 26: Expressionskontrolle von 5-LO, FLAP und cPLA ₂ im Western Blot.....	82
Abbildung 27: Induktion 5-LO relevanter Transkriptionsfaktoren nach IE1-Überexpression in HFF	83
Abbildung 28: Quantifizierung der Sp1-mRNS-Induktion nach Infektion von HFF mit unterschiedlichen HCMV- Stämmen.....	84
Abbildung 29: Schematische Darstellung der 5-LO-Promotorkonstrukte pN10-pN14.....	85
Abbildung 30: Induktion unterschiedlicher 5-LO-Promotorkonstrukte durch IE1-Überexpression in HFF	86
Abbildung 31: Induktion von 5-LO GC-Boxmutanten nach Überexpression von IE1 in HFF.....	87
Abbildung 32: Strukturformel von Mithramycin	88

Abbildung 33: Hemmung des IE1-vermittelten induktiven Effekts auf pN10 durch Mithramycinzusatz	89
Abbildung 34: Induktion von pN10 nach Überexpression von IE1 und steigenden Mengen Sp1 in HFF.....	90
Abbildung 35: Western Blot der Sp1-Proteinlevel nach Überexpression in HFF	90
Abbildung 36: Schematische Darstellung der Spleißvarianten IE1 und IE2	91
Abbildung 37: Induktion des 5-LO-Promotorfragments pN10 durch Überexpression von IE1, IE2 bzw. deren Deletionsmutanten in HFF.	92
Abbildung 38: Interaktion zwischen IEP und Sp1 in überexprimierten HFF.....	93
Abbildung 39: Western Blot in humanen Vorhaut-Fibroblasten auf das phospho-Sp1-Level nach Immediate Early Protein-Überexpression.....	94
Abbildung 40: <i>In vitro</i> Kinase Assay	95
Abbildung 41: Strukturformel von Wortmannin.....	96
Abbildung 42: Induktion von pN10 nach IE1-Überexpression in HFF unter Wortmanninzusatz	97
Abbildung 43: Postulierte Interaktion zwischen HIV-1 Tat-1 und Sp1/DNS-PK nach Chun et. al. [578]	98
Abbildung 44: Western Blot zur Kontrolle der Interaktion zwischen IE1 und DNS-PK.....	99
Abbildung 45: Induktion von pN10 nach IE1-Überexpression unter Proteinkinase-Inhibitorzusatz in HFF.	103
Abbildung 46: Nachweis der Sp1-Defizienz in HFF Δ Sp1 auf mRNS- und Proteinebene.....	104
Abbildung 47: Vergleich des IE1-Effektes auf pN10 im Reporterassay zwischen HFF Wildtyp und HFF Δ Sp1	105
Abbildung 48: Induktion der 5-LO nach IE1-Überexpression in HFF	106
Abbildung 49: Proteinbindung an die GC4-Box Region des 5-LO-Promotors nach Überexpression in HFF	107

Abbildung 50: <i>In vivo</i> Nachweis der Sp1-Bindung an den proximalen Sp1-Promotor in HFF nach Infektion und Transfektion	108
Abbildung 51: Protein-Protein-Interaktion zwischen IE1 / IE2 und HDAC1-3.....	109
Abbildung 52: Quantifizierung der HDAC-Aktivität in IE1-überexprimierten HFF	111
Abbildung 53: Induktion von pN10 nach Überexpression von IE1 und variierenden HDAC-Mengen in HFF.....	113
Abbildung 54: Western Blot zur Kontrolle der HDAC-Expression nach Überexpression in HFF.....	113
Abbildung 55: Modellvorstellung der IE1-vermittelten Regulation des 5-LO-Promotors über Sp1.....	132
Abbildung 56: Modellvorstellung der HDAC1-abhängigen Sp1-Bindung nach Doetzlhofer et. al. [26].....	135
Abbildung 57: Modellvorstellung der IE1-vermittelten 5-LO-Promotorregulation über HDAC-Inhibition	136
Abbildung 58: Coomassie Gele der Etablierung der Proteinexpression.....	149
Abbildung 59: UV- Referenzspektren unterschiedlicher Faltungstypen am Beispiel von Poly-L-Lysin nach [652]	149
Abbildung 60: UV-Spektren der bakteriell-exprimierten viralen Proteine Immediate Early 1 (A) und Immediate Early 2 (B).....	150
Abbildung 61: Überprüfung der ATP-Bindungsstelle von Immediate Early 1	151

10 REFERENZEN

1. Sinclair, J., *Chromatin structure regulates human cytomegalovirus gene expression during latency, reactivation and lytic infection*. *Biochim Biophys Acta*. 1799(3-4): p. 286-95.
2. Gilbert, N.C., et al., *The structure of human 5-lipoxygenase*. *Science*. 331(6014): p. 217-9.
3. Boyington, J.C., B.J. Gaffney, and L.M. Amzel, *Structure of soybean lipoxygenase-I*. *Biochem Soc Trans*, 1993. 21 (Pt 3)(3): p. 744-8.
4. Funk, C.D., et al., *Characterization of the human 5-lipoxygenase gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(8): p. 2587-91.
5. Hoshiko, S., O. Radmark, and B. Samuelsson, *Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(23): p. 9073-7.
6. Radmark, O., et al., *5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity*. *Trends Biochem Sci*, 2007. 32(7): p. 332-41.
7. Silverman, E.S., et al., *Egr-1 and Sp1 interact functionally with the 5-lipoxygenase promoter and its naturally occurring mutants*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998. 19(2): p. 316-23.
8. Dishart, D., et al., *GC-rich sequences in the 5-lipoxygenase gene promoter are required for expression in Mono Mac 6 cells, characterization of a novel Sp1 binding site*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1738(1-3): p. 37-47.
9. Schnur, N., et al., *The histone deacetylase inhibitor trichostatin A mediates upregulation of 5-lipoxygenase promoter activity by recruitment of Sp1 to distinct GC-boxes*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1771(10): p. 1271-82.
10. Drazen, J.M., et al., *Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment*. *Nat Genet*, 1999. 22(2): p. 168-70.
11. Chadjichristos, C., et al., *Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 beta down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes*. *J Biol Chem*, 2003. 278(41): p. 39762-72.
12. Li, L., et al., *Gene regulation by Sp1 and Sp3*. *Biochem Cell Biol*, 2004. 82(4): p. 460-71.
13. Wang, L., et al., *Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer*. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(17): p. 6371-80.
14. Safe, S. and M. Abdelrahim, *Sp transcription factor family and its role in cancer*. *Eur J Cancer*, 2005. 41(16): p. 2438-48.
15. Chuang, J.Y., et al., *Overexpression of Sp1 leads to p53-dependent apoptosis in cancer cells*. *Int J Cancer*, 2009. 125(9): p. 2066-76.
16. Watanabe, G., et al., *Inhibition of cyclin D1 kinase activity is associated with E2F-mediated inhibition of cyclin D1 promoter activity through E2F and Sp1*. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(6): p. 3212-22.
17. Suske, G., E. Bruford, and S. Philipsen, *Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family*. *Genomics*, 2005. 85(5): p. 551-6.
18. Nicolas, M., et al., *Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human transcription factor Sp1 gene*. *J Biol Chem*, 2001. 276(25): p. 22126-32.
19. Briggs, M.R., et al., *Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1*. *Science*, 1986. 234(4772): p. 47-52.
20. Kadonaga, J.T., et al., *Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain*. *Cell*, 1987. 51(6): p. 1079-90.
21. Kadonaga, J.T. and R. Tjian, *Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83(16): p. 5889-93.

22. Ammanamanchi, S., J.W. Freeman, and M.G. Brattain, *Acetylated sp3 is a transcriptional activator*. J Biol Chem, 2003. 278(37): p. 35775-80.
23. Schwarzmayr, L., et al., *Regulation of the E2F-associated phosphoprotein promoter by GC-box binding proteins*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. 40(12): p. 2845-53.
24. Kong, L.M., et al., *Transcription factor Sp1 regulates expression of cancer-associated molecule CD147 in human lung cancer*. Cancer Sci, 2010. 101(6): p. 1463-70.
25. Rosmarin, A.G., et al., *Sp1 cooperates with the ets transcription factor, GABP, to activate the CD18 (beta2 leukocyte integrin) promoter*. J Biol Chem, 1998. 273(21): p. 13097-103.
26. Doetzlhofer, A., et al., *Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1*. Mol Cell Biol, 1999. 19(8): p. 5504-11.
27. Zhang, J.S., et al., *A conserved alpha-helical motif mediates the interaction of Sp1-like transcriptional repressors with the corepressor mSin3A*. Mol Cell Biol, 2001. 21(15): p. 5041-9.
28. Lin, R.K., et al., *Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer*. Cancer Res. 70(14): p. 5807-17.
29. Lee, J.S., K.M. Galvin, and Y. Shi, *Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(13): p. 6145-9.
30. Khachigian, L.M., A.J. Williams, and T. Collins, *Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 1995. 270(46): p. 27679-86.
31. McDonough, P.M., et al., *Collaborative roles for c-Jun N-terminal kinase, c-Jun, serum response factor, and Sp1 in calcium-regulated myocardial gene expression*. J Biol Chem, 1997. 272(38): p. 24046-53.
32. Pena, P., et al., *Activator protein-2 mediates transcriptional activation of the CYP11A1 gene by interaction with Sp1 rather than binding to DNA*. Mol Endocrinol, 1999. 13(8): p. 1402-16.
33. Feng, X.H., X. Lin, and R. Derynck, *Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta*. EMBO J, 2000. 19(19): p. 5178-93.
34. Parisi, F., P. Wirapati, and F. Naef, *Identifying synergistic regulation involving c-Myc and sp1 in human tissues*. Nucleic Acids Res, 2007. 35(4): p. 1098-107.
35. Sugawara, A., et al., *Transcription suppression of thromboxane receptor gene by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via an interaction with Sp1 in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2002. 277(12): p. 9676-83.
36. Cheng, H.T., et al., *Functional role of VDR in the activation of p27Kip1 by the VDR/Sp1 complex*. J Cell Biochem, 2006. 98(6): p. 1450-6.
37. Cheng, Y.H., et al., *Retinoic acid (RA) regulates 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometrium: interaction of RA receptors with specificity protein (SP) 1/SP3 for estradiol metabolism*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. 93(5): p. 1915-23.
38. Spengler, M.L. and M.G. Brattain, *Sumoylation inhibits cleavage of Sp1 N-terminal negative regulatory domain and inhibits Sp1-dependent transcription*. J Biol Chem, 2006. 281(9): p. 5567-74.
39. Xiao, H., T. Hasegawa, and K. Isobe, *p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21(waf1/cip1) promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor*. J Biol Chem, 2000. 275(2): p. 1371-6.
40. Song, C.Z., et al., *Functional interplay between CBP and PCAF in acetylation and regulation of transcription factor KLF13 activity*. J Mol Biol, 2003. 329(2): p. 207-15.
41. Huang, W., et al., *Trichostatin A induces transforming growth factor beta type II receptor promoter activity and acetylation of Sp1 by recruitment of PCAF/p300 to a Sp1.NF-Y complex*. J Biol Chem, 2005. 280(11): p. 10047-54.

42. Suzuki, T., et al., *Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding*. Genes Cells, 2000. 5(1): p. 29-41.
43. Han, I. and J.E. Kudlow, *Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility*. Mol Cell Biol, 1997. 17(5): p. 2550-8.
44. Fojas de Borja, P., et al., *Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription*. EMBO J, 2001. 20(20): p. 5737-47.
45. Jackson, S.P., et al., *GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase*. Cell, 1990. 63(1): p. 155-65.
46. Olofsson, B.A., et al., *Phosphorylation of Sp1 in response to DNA damage by ataxia telangiectasia-mutated kinase*. Mol Cancer Res, 2007. 5(12): p. 1319-30.
47. Milanini-Mongiat, J., J. Pouyssegur, and G. Pages, *Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription*. J Biol Chem, 2002. 277(23): p. 20631-9.
48. Bonello, M.R. and L.M. Khachigian, *Fibroblast growth factor-2 represses platelet-derived growth factor receptor-alpha (PDGFR-alpha) transcription via ERK1/2-dependent Sp1 phosphorylation and an atypical cis-acting element in the proximal PDGFR-alpha promoter*. J Biol Chem, 2004. 279(4): p. 2377-82.
49. Goebel, M.K., *The PU.1 transcription factor is the product of the putative oncogene Spi-1*. Cell, 1990. 61(7): p. 1165-6.
50. Chen, H., et al., *PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells*. Oncogene, 1995. 11(8): p. 1549-60.
51. Hromas, R., et al., *Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1*. Blood, 1993. 82(10): p. 2998-3004.
52. Klemsz, M.J., et al., *The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene*. Cell, 1990. 61(1): p. 113-24.
53. Zhang, D.E., et al., *The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor*. Mol Cell Biol, 1994. 14(1): p. 373-81.
54. Petrovick, M.S., et al., *Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1*. Mol Cell Biol, 1998. 18(7): p. 3915-25.
55. Rosmarin, A.G., R. Levy, and D.G. Tenen, *Cloning and analysis of the CD18 promoter*. Blood, 1992. 79(10): p. 2598-604.
56. Pahl, H.L., A.G. Rosmarin, and D.G. Tenen, *Characterization of the myeloid-specific CD11b promoter*. Blood, 1992. 79(4): p. 865-70.
57. Hagemeyer, C., et al., *The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIIID in vitro: RB shows sequence similarity to TFIIID and TFIIIB*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(4): p. 1580-4.
58. Hohaus, S., et al., *PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene*. Mol Cell Biol, 1995. 15(10): p. 5830-45.
59. Nagulapalli, S., J.M. Pongubala, and M.L. Atchison, *Multiple proteins physically interact with PU.1. Transcriptional synergy with NF-IL6 beta (C/EBP delta, CRP3)*. J Immunol, 1995. 155(9): p. 4330-8.
60. Oelgeschlager, M., et al., *C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter*. Mol Cell Biol, 1996. 16(9): p. 4717-25.
61. Behre, G., et al., *c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor*. J Biol Chem, 1999. 274(8): p. 4939-46.
62. Ho, S.N., et al., *NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium-regulated and exhibits distinct DNA binding specificity*. J Biol Chem, 1995. 270(34): p. 19898-907.

63. Luo, C., et al., *Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes*. Mol Cell Biol, 1996. 16(7): p. 3955-66.
64. Shaw, J.P., et al., *Identification of a putative regulator of early T cell activation genes*. Science, 1988. 241(4862): p. 202-5.
65. Caetano, M.S., et al., *NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression*. FASEB J, 2002. 16(14): p. 1940-2.
66. Crabtree, G.R. and E.N. Olson, *NFAT signaling: choreographing the social lives of cells*. Cell, 2002. 109 Suppl: p. S67-79.
67. Graef, I.A., et al., *Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons*. Cell, 2003. 113(5): p. 657-70.
68. Masuda, E.S., et al., *NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus*. Mol Cell Biol, 1995. 15(5): p. 2697-706.
69. Baksh, S., et al., *NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression*. Mol Cell, 2002. 10(5): p. 1071-81.
70. Hernandez, G.L., et al., *Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2*. J Exp Med, 2001. 193(5): p. 607-20.
71. Horsley, V. and G.K. Pavlath, *NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation*. J Cell Biol, 2002. 156(5): p. 771-4.
72. Iniguez, M.A., et al., *An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes*. J Biol Chem, 2000. 275(31): p. 23627-35.
73. Sweetser, M.T., et al., *The roles of nuclear factor of activated T cells and ying-yang 1 in activation-induced expression of the interferon-gamma promoter in T cells*. J Biol Chem, 1998. 273(52): p. 34775-83.
74. Zaichuk, T.A., et al., *Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition*. J Exp Med, 2004. 199(11): p. 1513-22.
75. Jain, J., et al., *A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region*. J Biol Chem, 1995. 270(8): p. 4138-45.
76. Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan, *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function*. Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 707-47.
77. Macian, F., C. Lopez-Rodriguez, and A. Rao, *Partners in transcription: NFAT and AP-1*. Oncogene, 2001. 20(19): p. 2476-89.
78. Baldwin, A.S., Jr., *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol, 1996. 14: p. 649-83.
79. Chen, L.F. and W.C. Greene, *Shaping the nuclear action of NF-kappaB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(5): p. 392-401.
80. Baeuerle, P.A., *IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control*. Cell, 1998. 95(6): p. 729-31.
81. Zhong, H., R.E. Voll, and S. Ghosh, *Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300*. Mol Cell, 1998. 1(5): p. 661-71.
82. Andrisani, O.M., *CREB-mediated transcriptional control*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1999. 9(1): p. 19-32.
83. Rothwarf, D.M. and M. Karin, *The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus*. Sci STKE, 1999. 1999(5): p. RE1.
84. Camandola, S., et al., *Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 229(2): p. 643-7.
85. Thommesen, L., et al., *Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A2 block TNF-induced activation of transcription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1*. J Immunol, 1998. 161(7): p. 3421-30.

86. Williams, T., et al., *Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements*. *Genes Dev*, 1988. 2(12A): p. 1557-69.
87. Garcia, M.A., et al., *Identification of amino acid residues of transcription factor AP-2 involved in DNA binding*. *J Mol Biol*, 2000. 301(4): p. 807-16.
88. Wankhade, S., et al., *Characterization of the activation domains of AP-2 family transcription factors*. *J Biol Chem*, 2000. 275(38): p. 29701-8.
89. Braganca, J., et al., *Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2*. *J Biol Chem*, 2003. 278(18): p. 16021-9.
90. Gaubatz, S., et al., *Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2*. *EMBO J*, 1995. 14(7): p. 1508-19.
91. Begon, D.Y., et al., *Yin Yang 1 cooperates with activator protein 2 to stimulate ERBB2 gene expression in mammary cancer cells*. *J Biol Chem*, 2005. 280(26): p. 24428-34.
92. Wu, F. and A.S. Lee, *YY1 as a regulator of replication-dependent hamster histone H3.2 promoter and an interactive partner of AP-2*. *J Biol Chem*, 2001. 276(1): p. 28-34.
93. McPherson, L.A., A.V. Loktev, and R.J. Weigel, *Tumor suppressor activity of AP2alpha mediated through a direct interaction with p53*. *J Biol Chem*, 2002. 277(47): p. 45028-33.
94. Imagawa, M., R. Chiu, and M. Karin, *Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP*. *Cell*, 1987. 51(2): p. 251-60.
95. Grether-Beck, S., et al., *Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(25): p. 14586-91.
96. Huang, Y. and F.E. Domann, *Redox modulation of AP-2 DNA binding activity in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 249(2): p. 307-12.
97. Hilger-Eversheim, K., et al., *Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control*. *Gene*, 2000. 260(1-2): p. 1-12.
98. Pellikainen, J.M. and V.M. Kosma, *Activator protein-2 in carcinogenesis with a special reference to breast cancer--a mini review*. *Int J Cancer*, 2007. 120(10): p. 2061-7.
99. Pfisterer, P., et al., *A subtractive gene expression screen suggests a role of transcription factor AP-2 alpha in control of proliferation and differentiation*. *J Biol Chem*, 2002. 277(8): p. 6637-44.
100. Kelavkar, U., et al., *Human 15-lipoxygenase gene promoter: analysis and identification of DNA binding sites for IL-13-induced regulatory factors in monocytes*. *Mol Biol Rep*, 1998. 25(3): p. 173-82.
101. Guha, M., et al., *Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression*. *Blood*, 2001. 98(5): p. 1429-39.
102. Lim, C.P., N. Jain, and X. Cao, *Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1*. *Oncogene*, 1998. 16(22): p. 2915-26.
103. Gashler, A. and V.P. Sukhatme, *Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1995. 50: p. 191-224.
104. Silverman, E.S., et al., *cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1)*. *Biochem J*, 1998. 336 (Pt 1): p. 183-9.
105. Svaren, J., et al., *NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli*. *Mol Cell Biol*, 1996. 16(7): p. 3545-53.

106. Liu, C., et al., *EGR-1, the reluctant suppression factor: EGR-1 is known to function in the regulation of growth, differentiation, and also has significant tumor suppressor activity and a mechanism involving the induction of TGF-beta1 is postulated to account for this suppressor activity.* Crit Rev Oncog, 1996. 7(1-2): p. 101-25.
107. Silverman, E.S. and T. Collins, *Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology.* Am J Pathol, 1999. 154(3): p. 665-70.
108. Kaufmann, K. and G. Thiel, *Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor induce expression of Egr-1, a zinc finger transcription factor, in human malignant glioma cells.* J Neurol Sci, 2001. 189(1-2): p. 83-91.
109. Silverman, E.S., et al., *Inducible PDGF A-chain transcription in smooth muscle cells is mediated by Egr-1 displacement of Sp1 and Sp3.* Am J Physiol, 1997. 273(3 Pt 2): p. H1415-26.
110. Mayer, S.I., et al., *Epidermal-growth-factor-induced proliferation of astrocytes requires Egr transcription factors.* J Cell Sci, 2009. 122(Pt 18): p. 3340-50.
111. Biesiada, E., M. Razandi, and E.R. Levin, *Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation.* J Biol Chem, 1996. 271(31): p. 18576-81.
112. Liu, C., et al., *Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1.* Cancer Gene Ther, 1998. 5(1): p. 3-28.
113. Sukhatme, V.P., et al., *A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization.* Cell, 1988. 53(1): p. 37-43.
114. Khachigian, L.M., et al., *Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury.* Science, 1996. 271(5254): p. 1427-31.
115. McCaffrey, T.A., et al., *High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis.* J Clin Invest, 2000. 105(5): p. 653-62.
116. Wieschaus, E., C. Nusslein-Volhard, and H. Kluding, *Kruppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation.* Dev Biol, 1984. 104(1): p. 172-86.
117. Bain, M. and J. Sinclair, *Targeted inhibition of the transcription factor YY1 in an embryonal carcinoma cell line results in retarded cell growth, elevated levels of p53 but no increase in apoptotic cell death.* Eur J Cell Biol, 2005. 84(5): p. 543-53.
118. Shi, Y., J.S. Lee, and K.M. Galvin, *Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1.* Biochim Biophys Acta, 1997. 1332(2): p. F49-66.
119. Palko, L., et al., *The Yin Yang-1 (YY1) protein undergoes a DNA-replication-associated switch in localization from the cytoplasm to the nucleus at the onset of S phase.* J Cell Sci, 2004. 117(Pt 3): p. 465-76.
120. Yao, Y.L., et al., *Cloning, chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1.* Nucleic Acids Res, 1998. 26(16): p. 3776-83.
121. Nguyen, N., et al., *Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2.* J Biol Chem, 2004. 279(24): p. 25927-34.
122. Shi, Y., et al., *Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein.* Cell, 1991. 67(2): p. 377-88.
123. Weill, L., E. Shestakova, and E. Bonnefoy, *Transcription factor YY1 binds to the murine beta interferon promoter and regulates its transcriptional capacity with a dual activator/repressor role.* J Virol, 2003. 77(5): p. 2903-14.
124. Thomas, M.J. and E. Seto, *Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key?* Gene, 1999. 236(2): p. 197-208.
125. Lu, S.Y., M. Rodriguez, and W.S. Liao, *YY1 represses rat serum amyloid A1 gene transcription and is antagonized by NF-kappa B during acute-phase response.* Mol Cell Biol, 1994. 14(9): p. 6253-63.

126. De Rinaldis, E., et al., *The binding sites for Xenopus laevis FIII/YY1 in the first exon of L1 and L14 ribosomal protein genes are dispensable for promoter expression.* Eur J Biochem, 1998. 255(3): p. 563-9.
127. Chiang, C.M. and R.G. Roeder, *Cloning of an intrinsic human TFIIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators.* Science, 1995. 267(5197): p. 531-6.
128. Usheva, A. and T. Shenk, *TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA.* Cell, 1994. 76(6): p. 1115-21.
129. Joo, M., et al., *Yin Yang 1 enhances cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. 292(5): p. L1219-26.
130. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.* Science, 1988. 240(4854): p. 889-95.
131. Tagami, T., et al., *The interaction of the vitamin D receptor with nuclear receptor corepressors and coactivators.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. 253(2): p. 358-63.
132. Haussler, M.R., et al., *The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed.* J Bone Miner Res, 1998. 13(3): p. 325-49.
133. Kimmel-Jehan, C., F. Jehan, and H.F. DeLuca, *Salt concentration determines 1,25-dihydroxyvitamin D3 dependency of vitamin D receptor-retinoid X receptor-vitamin D-responsive element complex formation.* Arch Biochem Biophys, 1997. 341(1): p. 75-80.
134. Yanagi, Y., et al., *Positive and negative modulation of vitamin D receptor function by transforming growth factor-beta signaling through smad proteins.* J Biol Chem, 1999. 274(19): p. 12971-4.
135. Yanagisawa, J., et al., *Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators.* Science, 1999. 283(5406): p. 1317-21.
136. Brungs, M., et al., *On the induction of 5-lipoxygenase expression and activity in HL-60 cells: effects of vitamin D3, retinoic acid, DMSO and TGF beta.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. 205(3): p. 1572-80.
137. Sorg, B.L., et al., *Analysis of the 5-lipoxygenase promoter and characterization of a vitamin D receptor binding site.* Biochim Biophys Acta, 2006. 1761(7): p. 686-97.
138. Seuter, S., et al., *Functional characterization of vitamin D responding regions in the human 5-Lipoxygenase gene.* Biochim Biophys Acta, 2007. 1771(7): p. 864-72.
139. Stoffers, K.L., et al., *Calcitriol upregulates open chromatin and elongation markers at functional vitamin D response elements in the distal part of the 5-lipoxygenase gene.* J Mol Biol, 2010. 395(4): p. 884-96.
140. Luger, K., *Structure and dynamic behavior of nucleosomes.* Curr Opin Genet Dev, 2003. 13(2): p. 127-35.
141. <http://www.bio.miami.edu/dana/104/nucleosome.jpg>.
142. Brown, S.W., *Heterochromatin.* Science, 1966. 151(709): p. 417-25.
143. Grunstein, M., *Histone acetylation in chromatin structure and transcription.* Nature, 1997. 389(6649): p. 349-52.
144. Zhang, Y. and D. Reinberg, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails.* Genes Dev, 2001. 15(18): p. 2343-60.
145. Davie, J.R. and L.C. Murphy, *Level of ubiquitinated histone H2B in chromatin is coupled to ongoing transcription.* Biochemistry, 1990. 29(20): p. 4752-7.
146. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function.* Cell, 2007. 128(4): p. 693-705.
147. Cress, W.D. and E. Seto, *Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer.* J Cell Physiol, 2000. 184(1): p. 1-16.
148. Davie, J.R., et al., *Nuclear organization and chromatin dynamics--Sp1, Sp3 and histone deacetylases.* Adv Enzyme Regul, 2008. 48: p. 189-208.

149. Ekwall, K., *Genome-wide analysis of HDAC function*. Trends Genet, 2005. 21(11): p. 608-15.
150. Goll, M.G. and T.H. Bestor, *Histone modification and replacement in chromatin activation*. Genes Dev, 2002. 16(14): p. 1739-42.
151. Li, B., M. Carey, and J.L. Workman, *The role of chromatin during transcription*. Cell, 2007. 128(4): p. 707-19.
152. Fletcher, T.M. and J.C. Hansen, *Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms*. J Biol Chem, 1995. 270(43): p. 25359-62.
153. Grant, P.A., *A tale of histone modifications*. Genome Biol, 2001. 2(4): p. REVIEWS0003.
154. Loidl, P., *Histone acetylation: facts and questions*. Chromosoma, 1994. 103(7): p. 441-9.
155. Lee, K.K. and J.L. Workman, *Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8(4): p. 284-95.
156. Walkinshaw, D.R., et al., *Histone deacetylases as transducers and targets of nuclear signaling*. J Cell Biochem, 2008. 104(5): p. 1541-52.
157. Gao, L., et al., *Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family*. J Biol Chem, 2002. 277(28): p. 25748-55.
158. Franco, P.J., G. Li, and L.N. Wei, *Interaction of nuclear receptor zinc finger DNA binding domains with histone deacetylase*. Mol Cell Endocrinol, 2003. 206(1-2): p. 1-12.
159. Juan, L.J., et al., *Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation*. J Biol Chem, 2000. 275(27): p. 20436-43.
160. Gregoret, I.V., Y.M. Lee, and H.V. Goodson, *Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis*. J Mol Biol, 2004. 338(1): p. 17-31.
161. Clarke, S., *Protein methylation*. Curr Opin Cell Biol, 1993. 5(6): p. 977-83.
162. Gary, J.D. and S. Clarke, *RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998. 61: p. 65-131.
163. Pal, S., et al., *Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes*. Mol Cell Biol, 2004. 24(21): p. 9630-45.
164. Singh, V., et al., *DAL-1/4.1B tumor suppressor interacts with protein arginine N-methyltransferase 3 (PRMT3) and inhibits its ability to methylate substrates in vitro and in vivo*. Oncogene, 2004. 23(47): p. 7761-71.
165. Margueron, R., P. Trojer, and D. Reinberg, *The key to development: interpreting the histone code?* Curr Opin Genet Dev, 2005. 15(2): p. 163-76.
166. Sims, R.J., 3rd, K. Nishioka, and D. Reinberg, *Histone lysine methylation: a signature for chromatin function*. Trends Genet, 2003. 19(11): p. 629-39.
167. Shi, Y., et al., *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. Cell, 2004. 119(7): p. 941-53.
168. Whetstone, J.R., et al., *Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases*. Cell, 2006. 125(3): p. 467-81.
169. Koshihara, Y., M. Mizumura, and S. Murota, *Enhancement of 5-lipoxygenase activity in mastocytoma P-815 cells by n-butyrate treatment*. J Biol Chem, 1982. 257(13): p. 7302-5.
170. Covault, J., et al., *Histone hypoacetylation following release of HTC cells from butyrate*. J Biol Chem, 1982. 257(10): p. 5809-15.
171. Klan, N., et al., *Trichostatin A and structurally related histone deacetylase inhibitors induce 5-lipoxygenase promoter activity*. Biol Chem, 2003. 384(5): p. 777-85.

172. Pufahl, L., et al., *Trichostatin A induces 5-lipoxygenase promoter activity and mRNA expression via inhibition of histone deacetylase 2 and 3*. J Cell Mol Med, 2011. Aug 24. doi:10.1111/j.1582-4934.20011.01420.x. [Epub ahead of print].
173. Chen, X.S. and C.D. Funk, *The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation*. J Biol Chem, 2001. 276(1): p. 811-8.
174. Hemak, J., D. Gale, and T.G. Brock, *Structural characterization of the catalytic domain of the human 5-lipoxygenase enzyme*. J Mol Model, 2002. 8(4): p. 102-12.
175. Kulkarni, S., et al., *Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase*. J Biol Chem, 2002. 277(15): p. 13167-74.
176. Rakonjac, M., et al., *Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A4 production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(35): p. 13150-5.
177. Reddy, K.V., T. Hammarberg, and O. Radmark, *Mg²⁺ activates 5-lipoxygenase in vitro: dependency on concentrations of phosphatidylcholine and arachidonic acid*. Biochemistry, 2000. 39(7): p. 1840-8.
178. Hammarberg, T., et al., *Mutations at the C-terminal isoleucine and other potential iron ligands of 5-lipoxygenase*. Eur J Biochem, 1995. 230(2): p. 401-7.
179. Riendeau, D., et al., *Stimulation of 5-lipoxygenase activity under conditions which promote lipid peroxidation*. Biochem J, 1989. 263(2): p. 565-72.
180. Chasteen, N.D., et al., *Characterization of the non-heme iron center of human 5-lipoxygenase by electron paramagnetic resonance, fluorescence, and ultraviolet-visible spectroscopy: redox cycling between ferrous and ferric states*. Biochemistry, 1993. 32(37): p. 9763-71.
181. Rouzer, C.A. and B. Samuelsson, *The importance of hydroperoxide activation for the detection and assay of mammalian 5-lipoxygenase*. FEBS Lett, 1986. 204(2): p. 293-6.
182. Murphy, R.C. and M.A. Gijon, *Biosynthesis and metabolism of leukotrienes*. Biochem J, 2007. 405(3): p. 379-95.
183. Yokomizo, T., et al., *A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis*. Nature, 1997. 387(6633): p. 620-4.
184. Ford-Hutchinson, A.W., M. Gresser, and R.N. Young, *5-Lipoxygenase*. Annu Rev Biochem, 1994. 63: p. 383-417.
185. Ford-Hutchinson, A.W., et al., *Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes*. Nature, 1980. 286(5770): p. 264-5.
186. Flamand, N., et al., *Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains*. Cell Mol Life Sci, 2007. 64(19-20): p. 2657-70.
187. Gimbrone, M.A., Jr., A.F. Brock, and A.I. Schafer, *Leukotriene B₄ stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells*. J Clin Invest, 1984. 74(4): p. 1552-5.
188. Leier, I., et al., *The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates*. J Biol Chem, 1994. 269(45): p. 27807-10.
189. Samuelsson, B., et al., *Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects*. Science, 1987. 237(4819): p. 1171-6.
190. Werz, O. and D. Steinhilber, *Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors*. Pharmacol Ther, 2006. 112(3): p. 701-18.
191. Brungs, M., et al., *Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D₃*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(1): p. 107-11.
192. Kudo, I. and M. Murakami, *Phospholipase A2 enzymes*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. 68-69: p. 3-58.
193. Hirabayashi, T., T. Murayama, and T. Shimizu, *Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2*. Biol Pharm Bull, 2004. 27(8): p. 1168-73.

194. Clark, J.D., et al., *Cytosolic phospholipase A2*. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 1995. 12(2-3): p. 83-117.
195. Dessen, A., et al., *Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism*. *Cell*, 1999. 97(3): p. 349-60.
196. Burkert, E., et al., *Cell type-dependent activation of 5-lipoxygenase by arachidonic acid*. *J Leukoc Biol*, 2003. 73(1): p. 191-200.
197. Werz, O., et al., *Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2)*. *J Biol Chem*, 2002. 277(17): p. 14793-800.
198. Werz, O., *5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2002. 1(1): p. 23-44.
199. Werz, O. and D. Steinhilber, *Development of 5-lipoxygenase inhibitors--lessons from cellular enzyme regulation*. *Biochem Pharmacol*, 2005. 70(3): p. 327-33.
200. Spanbroek, R., et al., *5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(2): p. 663-8.
201. Luo, M., et al., *Multiple nuclear localization sequences allow modulation of 5-lipoxygenase nuclear import*. *Traffic*, 2004. 5(11): p. 847-54.
202. Jones, S.M., et al., *Structural and functional criteria reveal a new nuclear import sequence on the 5-lipoxygenase protein*. *J Biol Chem*, 2002. 277(41): p. 38550-6.
203. Jones, S.M., et al., *Identification of two novel nuclear import sequences on the 5-lipoxygenase protein*. *J Biol Chem*, 2003. 278(12): p. 10257-63.
204. Hanaka, H., T. Shimizu, and T. Izumi, *Nuclear-localization-signal-dependent and nuclear-export-signal-dependent mechanisms determine the localization of 5-lipoxygenase*. *Biochem J*, 2002. 361(Pt 3): p. 505-14.
205. Luo, M., et al., *Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B4 synthetic capacity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(21): p. 12165-70.
206. Straif, D., et al., *Glutathione peroxidase-1 but not -4 is involved in the regulation of cellular 5-lipoxygenase activity in monocytic cells*. *Biochem J*, 2000. 349(Pt 2): p. 455-61.
207. Werz, O. and D. Steinhilber, *Selenium-dependent peroxidases suppress 5-lipoxygenase activity in B-lymphocytes and immature myeloid cells. The presence of peroxidase-insensitive 5-lipoxygenase activity in differentiated myeloid cells*. *Eur J Biochem*, 1996. 242(1): p. 90-7.
208. Borgeat, P. and B. Samuelsson, *Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(5): p. 2148-52.
209. McDonald, P.P., et al., *Studies on the activation of human neutrophil 5-lipoxygenase induced by natural agonists and Ca²⁺ ionophore A23187*. *Biochem J*, 1991. 280 (Pt 2): p. 379-85.
210. Wu, X., et al., *Molecular characterization of the constitutive expression of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene in macrophages*. *Biochem J*, 2003. 375(Pt 2): p. 351-63.
211. Flamand, N., et al., *Cyclic AMP-mediated inhibition of 5-lipoxygenase translocation and leukotriene biosynthesis in human neutrophils*. *Mol Pharmacol*, 2002. 62(2): p. 250-6.
212. Werz, O., et al., *5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(10): p. 5261-6.
213. Luo, M., et al., *Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523*. *J Biol Chem*, 2004. 279(40): p. 41512-20.
214. Homig, C., et al., *1-Oleoyl-2-acetylgllycerol stimulates 5-lipoxygenase activity via a putative (phospho)lipid binding site within the N-terminal C2-like domain*. *J Biol Chem*, 2005. 280(29): p. 26913-21.

215. Albert, D., et al., *The role of diacylglyceride generation by phospholipase D and phosphatidic acid phosphatase in the activation of 5-lipoxygenase in polymorphonuclear leukocytes*. J Leukoc Biol, 2008. 83(4): p. 1019-27.
216. Esser, J., et al., *Coactosin-like protein functions as a stabilizing chaperone for 5-lipoxygenase: role of tryptophan 102*. Biochem J, 2009. 425(1): p. 265-74.
217. Provost, P., et al., *5-Lipoxygenase interacts with coactosin-like protein*. J Biol Chem, 2001. 276(19): p. 16520-7.
218. Jakobsson, P.J., et al., *Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 161(2 Pt 2): p. S20-4.
219. Okuno, T., et al., *Leukotriene B4 receptor and the function of its helix 8*. J Biol Chem, 2005. 280(37): p. 32049-52.
220. Yokomizo, T., et al., *A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders*. J Exp Med, 2000. 192(3): p. 421-32.
221. Devchand, P.R., et al., *The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control*. Nature, 1996. 384(6604): p. 39-43.
222. Lynch, K.R., et al., *Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor*. Nature, 1999. 399(6738): p. 789-93.
223. Sarau, H.M., et al., *Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor*. Mol Pharmacol, 1999. 56(3): p. 657-63.
224. Sjoström, M., et al., *Dominant expression of the CysLT2 receptor accounts for calcium signaling by cysteinyl leukotrienes in human umbilical vein endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. 23(8): p. e37-41.
225. Takasaki, J., et al., *The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 274(2): p. 316-22.
226. Maekawa, A., et al., *Functional recognition of a distinct receptor preferential for leukotriene E4 in mice lacking the cysteinyl leukotriene 1 and 2 receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(43): p. 16695-700.
227. Lotzer, K., C.D. Funk, and A.J. Habenicht, *The 5-lipoxygenase pathway in arterial wall biology and atherosclerosis*. Biochim Biophys Acta, 2005. 1736(1): p. 30-7.
228. McMillan, R.M., *Leukotrienes in respiratory disease*. Paediatr Respir Rev, 2001. 2(3): p. 238-44.
229. Brain, S.D., et al., *Leukotrienes C4 and D4 in psoriatic skin lesions*. Prostaglandins, 1985. 29(4): p. 611-9.
230. Brain, S.D., et al., *Leukotriene B4-like material in scale of psoriatic skin lesions*. Br J Pharmacol, 1984. 83(1): p. 313-7.
231. Ford-Hutchinson, A.W., *5-Lipoxygenase activation in psoriasis: a dead issue?* Skin Pharmacol, 1993. 6(4): p. 292-7.
232. Davidson, E.M., S.A. Rae, and M.J. Smith, *Leukotriene B4, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 1983. 42(6): p. 677-9.
233. Klickstein, L.B., C. Shapleigh, and E.J. Goetzl, *Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis*. J Clin Invest, 1980. 66(5): p. 1166-70.
234. De Caterina, R., et al., *Leukotriene B4 production in human atherosclerotic plaques*. Biomed Biochim Acta, 1988. 47(10-11): p. S182-5.
235. Aiello, R.J., et al., *Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. 22(3): p. 443-9.
236. Allen, S., et al., *Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries*. Circulation, 1998. 97(24): p. 2406-13.
237. Spanbroek, R., et al., *Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(3): p. 1238-43.

238. Subbarao, K., et al., *Role of leukotriene B4 receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(2): p. 369-75.
239. Feuerstein, G., *Leukotrienes and the cardiovascular system*. *Prostaglandins*, 1984. 27(5): p. 781-802.
240. Chen, J., et al., *The efficient total synthesis of bis-glycosyl apigenin from naringenin: a greener way*. *Carbohydr Res*, 2009. 344(16): p. 2245-9.
241. Mehrabian, M., et al., *Integrating genotypic and expression data in a segregating mouse population to identify 5-lipoxygenase as a susceptibility gene for obesity and bone traits*. *Nat Genet*, 2005. 37(11): p. 1224-33.
242. Ren, W. and R. Dziak, *Effects of leukotrienes on osteoblastic cell proliferation*. *Calcif Tissue Int*, 1991. 49(3): p. 197-201.
243. Gallwitz, W.E., et al., *5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices*. *J Biol Chem*, 1993. 268(14): p. 10087-94.
244. Claesson, H.E., J.A. Lindgren, and B. Gustafsson, *Opsonized bacteria stimulate leukotriene synthesis in human leukocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 1985. 836(3): p. 361-7.
245. Hennes, T., et al., *A kinetic study of immune mediators in the lungs of mice infected with influenza A virus*. *J Immunol*, 1992. 149(3): p. 932-9.
246. Gosselin, J. and P. Borgeat, *Epstein-Barr virus modulates 5-lipoxygenase product synthesis in human peripheral blood mononuclear cells*. *Blood*, 1997. 89(6): p. 2122-30.
247. Coffey, M.J., S.M. Phare, and M. Peters-Golden, *Role of leukotrienes in killing of Mycobacterium bovis by neutrophils*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2004. 71(3): p. 185-90.
248. Qiu, H., et al., *Human CMV infection induces 5-lipoxygenase expression and leukotriene B4 production in vascular smooth muscle cells*. *J Exp Med*, 2008. 205(1): p. 19-24.
249. Gaudreault, E. and J. Gosselin, *Leukotriene B4-mediated release of antimicrobial peptides against cytomegalovirus is BLT1 dependent*. *Viral Immunol*, 2007. 20(3): p. 407-20.
250. Gosselin, J., P. Borgeat, and L. Flamand, *Leukotriene B4 protects latently infected mice against murine cytomegalovirus reactivation following allogeneic transplantation*. *J Immunol*, 2005. 174(3): p. 1587-93.
251. McMillan, R.M. and E.R. Walker, *Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors*. *Trends Pharmacol Sci*, 1992. 13(8): p. 323-30.
252. Chen, Q.H., P.N. Rao, and E.E. Knaus, *Synthesis and biological evaluation of a novel class of rofecoxib analogues as dual inhibitors of cyclooxygenases (COXs) and lipoxygenases (LOXs)*. *Bioorg Med Chem*, 2006. 14(23): p. 7898-909.
253. Maier, T.J., et al., *Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase*. *Biochem Pharmacol*, 2008. 76(7): p. 862-72.
254. Li, L., et al., *The anti-inflammatory effects of ZLJ-6, a novel dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase inhibitor*. *Eur J Pharmacol*, 2009. 607(1-3): p. 244-50.
255. Mastalerz, L. and J. Kumik, *Antileukotriene drugs in the treatment of asthma*. *Pol Arch Med Wewn*. 120(3): p. 103-8.
256. Mocarski, E.S., Jr., *Biology and replication of cytomegalovirus*. *Transfus Med Rev*, 1988. 2(4): p. 229-34.
257. Wright, H.T., Jr., C.R. Goodheart, and A. Lielausis, *Human Cytomegalovirus. Morphology by Negative Staining*. *Virology*, 1964. 23: p. 419-24.
258. McGavran, M.H. and M.G. Smith, *Ultrastructural, Cytochemical, and Microchemical Observations on Cytomegalovirus (Salivary Gland Virus) Infection of Human Cells in Tissue Culture*. *Exp Mol Pathol*, 1965. 76: p. 1-10.
259. Huang, E.S., S.T. Chen, and J.S. Pagano, *Human cytomegalovirus. I. Purification and characterization of viral DNA*. *J Virol*, 1973. 12(6): p. 1473-81.
260. http://expasy.org/viralzone/complete_by_protein/180.html. [cited].

261. Reusser, P., et al., *Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease*. Blood, 1991. 78(5): p. 1373-80.
262. Staras, S.A., et al., *Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994*. Clin Infect Dis, 2006. 43(9): p. 1143-51.
263. Weller, T.H., J.B. Hanshaw, and D.E. Scott, *Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease*. Virology, 1960. 12: p. 130-2.
264. Pereira, L., et al., *Insights into viral transmission at the uterine-placental interface*. Trends Microbiol, 2005. 13(4): p. 164-74.
265. Streblov, D.N., et al., *Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: induction of paracrine factors that promote angiogenesis and wound healing*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. 325: p. 397-415.
266. Soderberg-Naucler, C., *Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer?* J Intern Med, 2006. 259(3): p. 219-46.
267. Cobbs, C.S., et al., *Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma*. Cancer Res, 2002. 62(12): p. 3347-50.
268. Michaelis, M., H.W. Doerr, and J. Cinatl, *The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions*. Neoplasia, 2009. 11(1): p. 1-9.
269. Miller, G., *Brain cancer. A viral link to glioblastoma?* Science, 2009. 323(5910): p. 30-1.
270. Isaacson, M.K., L.K. Juckem, and T. Compton, *Virus entry and innate immune activation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. 325: p. 85-100.
271. Sinzger, C., et al., *Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues*. J Gen Virol, 1995. 76 (Pt 4): p. 741-50.
272. Sinzger, C. and G. Jahn, *Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis*. Intervirology, 1996. 39(5-6): p. 302-19.
273. Sinzger, C., et al., *Hepatocytes are permissive for human cytomegalovirus infection in human liver cell culture and In vivo*. J Infect Dis, 1999. 180(4): p. 976-86.
274. Wiley, C.A. and J.A. Nelson, *Role of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus in AIDS encephalitis*. Am J Pathol, 1988. 133(1): p. 73-81.
275. Rummelt, V., et al., *Triple retinal infection with human immunodeficiency virus type 1, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 1. Light and electron microscopy, immunohistochemistry, and in situ hybridization*. Ophthalmology, 1994. 101(2): p. 270-9.
276. Rosenthal, L.J., et al., *Cytomegalovirus replication in primary and passaged human placental cells*. Intervirology, 1981. 16(3): p. 168-75.
277. Halwachs-Baumann, G., et al., *Human trophoblast cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus*. J Virol, 1998. 72(9): p. 7598-602.
278. Gonczol, E., P.W. Andrews, and S.A. Plotkin, *Cytomegalovirus infection of human teratocarcinoma cells in culture*. J Gen Virol, 1985. 66 (Pt 3): p. 509-15.
279. LaFemina, R. and G.S. Hayward, *Constitutive and retinoic acid-inducible expression of cytomegalovirus immediate-early genes in human teratocarcinoma cells*. J Virol, 1986. 58(2): p. 434-40.
280. Ibanez, C.E., et al., *Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages*. J Virol, 1991. 65(12): p. 6581-8.
281. Lathey, J.L. and S.A. Spector, *Unrestricted replication of human cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages*. J Virol, 1991. 65(11): p. 6371-5.

282. Maciejewski, J.P. and S.C. St Jeor, *Human cytomegalovirus infection of human hematopoietic progenitor cells*. Leuk Lymphoma, 1999. 33(1-2): p. 1-13.
283. Reeves, M.B., et al., *An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling*. J Gen Virol, 2005. 86(Pt 11): p. 2949-54.
284. Weinshenker, B.G., S. Wilton, and G.P. Rice, *Phorbol ester-induced differentiation permits productive human cytomegalovirus infection in a monocytic cell line*. J Immunol, 1988. 140(5): p. 1625-31.
285. Choi, Y.C., N.S. Swack, and G.D. Hsiung, *Effect of heparin on cytomegalovirus replication*. Proc Soc Exp Biol Med, 1978. 157(4): p. 569-71.
286. Kimpton, C.P., D.J. Morris, and G. Corbitt, *Inhibitory effects of various anticoagulants on the infectivity of human cytomegalovirus*. J Virol Methods, 1989. 24(3): p. 301-6.
287. Neyts, J., et al., *Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate*. Virology, 1992. 189(1): p. 48-58.
288. McKeating, J.A., P.D. Griffiths, and J.E. Grundy, *Cytomegalovirus in urine specimens has host beta 2 microglobulin bound to the viral envelope: a mechanism of evading the host immune response?* J Gen Virol, 1987. 68 (Pt 3): p. 785-92.
289. McKeating, J.A., et al., *Detection of cytomegalovirus by ELISA in urine samples is inhibited by beta 2 microglobulin*. J Med Virol, 1986. 18(4): p. 341-8.
290. Fioretti, A., et al., *Nonproductive infection of guinea pig cells with human cytomegalovirus*. J Virol, 1973. 11(6): p. 998-1003.
291. Einhorn, L., H. Gadler, and B. Wahren, *Adsorption of purified human cytomegalovirus and induction of early antigens in different cells*. J Med Virol, 1982. 10(4): p. 225-34.
292. DeMarchi, J.M., *Nature of the block in the expression of some early virus genes in cells abortively infected with human cytomegalovirus*. Virology, 1983. 129(2): p. 287-97.
293. LaFemina, R.L. and G.S. Hayward, *Replicative forms of human cytomegalovirus DNA with joined termini are found in permissively infected human cells but not in non-permissive Balb/c-3T3 mouse cells*. J Gen Virol, 1983. 64 (Pt 2): p. 373-89.
294. Mocarski, E.S., Jr., et al., *Molecular genetic analysis of cytomegalovirus gene regulation in growth, persistence and latency*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. 154: p. 47-74.
295. Nelson, J.A., J.W. Gnann, Jr., and P. Ghazal, *Regulation and tissue-specific expression of human cytomegalovirus*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. 154: p. 75-100.
296. Spector, D.H., et al., *Human cytomegalovirus early gene expression*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. 154: p. 21-45.
297. Stamminger, T. and B. Fleckenstein, *Immediate-early transcription regulation of human cytomegalovirus*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. 154: p. 3-19.
298. Liu, B. and M.F. Stinski, *Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements*. J Virol, 1992. 66(7): p. 4434-44.
299. Waldman, W.J., et al., *Preservation of natural endothelial cytopathogenicity of cytomegalovirus by propagation in endothelial cells*. Arch Virol, 1991. 117(3-4): p. 143-64.
300. Hermiston, T.W., et al., *Identification and characterization of the human cytomegalovirus immediate-early region 2 gene that stimulates gene expression from an inducible promoter*. J Virol, 1987. 61(10): p. 3214-21.
301. Pizzorno, M.C., et al., *trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus*. J Virol, 1988. 62(4): p. 1167-79.
302. Depto, A.S. and R.M. Stenberg, *Regulated expression of the human cytomegalovirus pp65 gene: octamer sequence in the promoter is required for activation by viral gene products*. J Virol, 1989. 63(3): p. 1232-8.

303. Klucher, K.M., D.K. Rabert, and D.H. Spector, *Sequences in the human cytomegalovirus 2.7-kilobase RNA promoter which mediate its regulation as an early gene*. J Virol, 1989. 63(12): p. 5334-43.
304. Hermiston, T.W., C.L. Malone, and M.F. Stinski, *Human cytomegalovirus immediate-early two protein region involved in negative regulation of the major immediate-early promoter*. J Virol, 1990. 64(7): p. 3532-6.
305. Malone, C.L., D.H. Vesole, and M.F. Stinski, *Transactivation of a human cytomegalovirus early promoter by gene products from the immediate-early gene IE2 and augmentation by IE1: mutational analysis of the viral proteins*. J Virol, 1990. 64(4): p. 1498-506.
306. Stenberg, R.M., et al., *Promoter-specific trans activation and repression by human cytomegalovirus immediate-early proteins involves common and unique protein domains*. J Virol, 1990. 64(4): p. 1556-65.
307. Geelen, J.L., et al., *Human cytomegalovirus DNA. I. Molecular weight and infectivity*. J Virol, 1978. 26(3): p. 813-6.
308. Lakeman, A.D. and J.E. Osborn, *Size of infectious DNA from human and murine cytomegaloviruses*. J Virol, 1979. 30(1): p. 414-6.
309. Stinski, M.F., E.S. Mocarski, and D.R. Thomsen, *DNA of human cytomegalovirus: size heterogeneity and defectiveness resulting from serial undiluted passage*. J Virol, 1979. 31(1): p. 231-9.
310. Weststrate, M.W., J.L. Geelen, and J. van der Noordaa, *Human cytomegalovirus DNA: physical maps for restriction endonucleases BglII, hindIII and XbaI*. J Gen Virol, 1980. 49(1): p. 1-21.
311. Greenaway, P.J., et al., *Human cytomegalovirus DNA: BamHI, EcoRI and PstI restriction endonuclease cleavage maps*. Gene, 1982. 18(3): p. 355-60.
312. Oram, J.D., et al., *Use of recombinant plasmids to investigate the structure of the human cytomegalovirus genome*. J Gen Virol, 1982. 59(Pt 1): p. 111-29.
313. Spector, D.H., L. Hock, and J.C. Tamashiro, *Cleavage maps for human cytomegalovirus DNA strain AD169 for restriction endonucleases EcoRI, BglII, and HindIII*. J Virol, 1982. 42(2): p. 558-82.
314. Kouzarides, T., et al., *Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene*. J Virol, 1987. 61(1): p. 125-33.
315. Heilbronn, R., et al., *Genomic localization, sequence analysis, and transcription of the putative human cytomegalovirus DNA polymerase gene*. J Virol, 1987. 61(1): p. 119-24.
316. Marks, J.R. and D.H. Spector, *Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatamers*. Virology, 1988. 162(1): p. 98-107.
317. Knipe, D.M. and A. Cliffe, *Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection*. Nat Rev Microbiol, 2008. 6(3): p. 211-21.
318. Spaete, R.R. and E.S. Mocarski, *The alpha sequence of the cytomegalovirus genome functions as a cleavage/packaging signal for herpes simplex virus defective genomes*. J Virol, 1985. 54(3): p. 817-24.
319. Mocarski, E.S., A.C. Liu, and R.R. Spaete, *Structure and variability of the alpha sequence in the genome of human cytomegalovirus (Towne strain)*. J Gen Virol, 1987. 68 (Pt 8): p. 2223-30.
320. Kemble, G.W. and E.S. Mocarski, *A host cell protein binds to a highly conserved sequence element (pac-2) within the cytomegalovirus alpha sequence*. J Virol, 1989. 63(11): p. 4715-28.
321. Stevens, J.G., *Latent characteristics of selected herpesviruses*. Adv Cancer Res, 1978. 26: p. 227-56.
322. Taylor-Wiedeman, J., P. Sissons, and J. Sinclair, *Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers*. J Virol, 1994. 68(3): p. 1597-604.
323. Mendelson, M., et al., *Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors*. J Gen Virol, 1996. 77 (Pt 12): p. 3099-102.

324. Sindre, H., et al., *Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells*. *Blood*, 1996. 88(12): p. 4526-33.
325. Hahn, G., R. Jores, and E.S. Mocarski, *Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(7): p. 3937-42.
326. Mayo, D.R., J.A. Armstrong, and M. Ho, *Reactivation of murine cytomegalovirus by cyclophosphamide*. *Nature*, 1977. 267(5613): p. 721-3.
327. Mayo, D., J.A. Armstrong, and M. Ho, *Activation of latent murine cytomegalovirus infection: cocultivation, cell transfer, and the effect of immunosuppression*. *J Infect Dis*, 1978. 138(6): p. 890-6.
328. Polic, B., et al., *Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection*. *J Exp Med*, 1998. 188(6): p. 1047-54.
329. Kurz, S.K. and M.J. Reddehase, *Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence*. *J Virol*, 1999. 73(10): p. 8612-22.
330. Bevan, I.S., C.C. Sammons, and C. Sweet, *Investigation of murine cytomegalovirus latency and reactivation in mice using viral mutants and the polymerase chain reaction*. *J Med Virol*, 1996. 48(4): p. 308-20.
331. Kurz, S.K., et al., *Focal transcriptional activity of murine cytomegalovirus during latency in the lungs*. *J Virol*, 1999. 73(1): p. 482-94.
332. Koffron, A.J., et al., *Cellular localization of latent murine cytomegalovirus*. *J Virol*, 1998. 72(1): p. 95-103.
333. Docke, W.D., et al., *Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor*. *Lancet*, 1994. 343(8892): p. 268-9.
334. Fietze, E., et al., *Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor*. *Transplantation*, 1994. 58(6): p. 675-80.
335. Guttman, R.D., et al., *Pharmacokinetics, foreign protein immune response, cytokine release, and lymphocyte subsets in patients receiving thymoglobuline and immunosuppression*. *Transplant Proc*, 1997. 29(7A): p. 24S-26S.
336. Soderberg-Naucler, C., K.N. Fish, and J.A. Nelson, *Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors*. *Cell*, 1997. 91(1): p. 119-26.
337. Yagyu, K., et al., *Reactivation of latent cytomegalovirus in allografts: comparison of lung graft and kidney graft in rats*. *Transplant Proc*, 1994. 26(4): p. 2343-4.
338. Bruning, J.H., et al., *Passive transfer of cytomegalovirus by cardiac and renal organ transplants in a rat model*. *Transplantation*, 1986. 41(6): p. 695-8.
339. Dowling, J.N., et al., *Enhancement of murine cytomegalovirus infection during graft-vs.-host reaction*. *J Infect Dis*, 1977. 135(6): p. 990-4.
340. Lalor, P.F. and D.H. Adams, *Lymphocyte homing to allografts*. *Transplantation*, 2000. 70(8): p. 1131-9.
341. Briscoe, D.M., S.I. Alexander, and A.H. Lichtman, *Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection*. *Curr Opin Immunol*, 1998. 10(5): p. 525-31.
342. Barnes, P.J. and M. Karin, *Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. *N Engl J Med*, 1997. 336(15): p. 1066-71.
343. Karmann, K., et al., *CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(10): p. 4342-6.
344. Colberg-Poley, A.M., et al., *Human cytomegalovirus US3 and UL36-38 immediate-early proteins regulate gene expression*. *J Virol*, 1992. 66(1): p. 95-105.
345. Jahn, G., et al., *Predominant immediate-early transcripts of human cytomegalovirus AD 169*. *J Virol*, 1984. 49(2): p. 363-70.

346. Stenberg, R.M., et al., *Regulated expression of early and late RNAs and proteins from the human cytomegalovirus immediate-early gene region*. J Virol, 1989. 63(6): p. 2699-708.
347. Stenberg, R.M., D.R. Thomsen, and M.F. Stinski, *Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus*. J Virol, 1984. 49(1): p. 190-9.
348. Stenberg, R.M., P.R. Witte, and M.F. Stinski, *Multiple spliced and unspliced transcripts from human cytomegalovirus immediate-early region 2 and evidence for a common initiation site within immediate-early region 1*. J Virol, 1985. 56(3): p. 665-75.
349. Stasiak, M. and B. Zernicki, *Delayed response learning to visual stimuli in cats*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 1991. 51(1-2): p. 63-6.
350. Stasiak, P.C. and E.S. Mocarski, *Transactivation of the cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the alpha gene product TRS1 in addition to IE1 and IE2*. J Virol, 1992. 66(2): p. 1050-8.
351. Jeang, K.T., M.S. Cho, and G.S. Hayward, *Abundant constitutive expression of the immediate-early 94K protein from cytomegalovirus (Colburn) in a DNA-transfected mouse cell line*. Mol Cell Biol, 1984. 4(10): p. 2214-23.
352. Jeang, K.T., et al., *Multiple tandemly repeated binding sites for cellular nuclear factor 1 that surround the major immediate-early promoters of simian and human cytomegalovirus*. J Virol, 1987. 61(5): p. 1559-70.
353. Ghazal, P., et al., *Binding of transcription factors and creation of a large nucleoprotein complex on the human cytomegalovirus enhancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(11): p. 3658-62.
354. Ghazal, P., H. Lubon, and L. Hennighausen, *Specific interactions between transcription factors and the promoter-regulatory region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene*. J Virol, 1988. 62(3): p. 1076-9.
355. Ghazal, P., et al., *Interactions between cellular regulatory proteins and a unique sequence region in the human cytomegalovirus major immediate-early promoter*. Virology, 1990. 174(1): p. 18-25.
356. Lubon, H., et al., *Cell-specific activity of the modulator region in the human cytomegalovirus major immediate-early gene*. Mol Cell Biol, 1989. 9(3): p. 1342-5.
357. Sambucetti, L.C., et al., *NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation*. EMBO J, 1989. 8(13): p. 4251-8.
358. Zhang, X.Y., et al., *Three MDBP sites in the immediate-early enhancer-promoter region of human cytomegalovirus*. Virology, 1991. 182(2): p. 865-9.
359. Isomura, H., et al., *Two Sp1/Sp3 binding sites in the major immediate-early proximal enhancer of human cytomegalovirus have a significant role in viral replication*. J Virol, 2005. 79(15): p. 9597-607.
360. Conaway, J.W. and R.C. Conaway, *Initiation of eukaryotic messenger RNA synthesis*. J Biol Chem, 1991. 266(27): p. 17721-4.
361. Gill, G. and R. Tjian, *Eukaryotic coactivators associated with the TATA box binding protein*. Curr Opin Genet Dev, 1992. 2(2): p. 236-42.
362. Chee, M., et al., *Identification of the major capsid protein gene of human cytomegalovirus*. J Virol, 1989. 63(3): p. 1345-53.
363. Cherrington, J.M. and E.S. Mocarski, *Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element*. J Virol, 1989. 63(3): p. 1435-40.
364. Schmidt, E.V., et al., *The cytomegalovirus enhancer: a pan-active control element in transgenic mice*. Mol Cell Biol, 1990. 10(8): p. 4406-11.
365. Stinski, M.F., *Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides*. J Virol, 1978. 26(3): p. 686-701.
366. Michelson, S., et al., *Human cytomegalovirus-induced immediate early antigens: analysis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis after immunoprecipitation*. J Virol, 1979. 32(1): p. 259-67.

367. Blanton, R.A. and M.J. Tevethia, *Immunoprecipitation of virus-specific immediate-early and early polypeptides from cells lytically infected with human cytomegalovirus strain AD 169*. *Virology*, 1981. 112(1): p. 262-73.
368. Gibson, W., *Protein counterparts of human and simian cytomegaloviruses*. *Virology*, 1983. 128(2): p. 391-406.
369. Otto, S.M., et al., *Subcellular localization of the major immediate early protein (IE1) of human cytomegalovirus at early times after infection*. *Virology*, 1988. 162(2): p. 478-82.
370. Hutchinson, N.I. and M.J. Tocci, *Characterization of a major early gene from the human cytomegalovirus long inverted repeat; predicted amino acid sequence of a 30-kDa protein encoded by the 1.2-kb mRNA*. *Virology*, 1986. 155(1): p. 172-82.
371. Boshart, M., et al., *A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus*. *Cell*, 1985. 41(2): p. 521-30.
372. Baracchini, E., et al., *An isoform variant of the cytomegalovirus immediate-early auto repressor functions as a transcriptional activator*. *Virology*, 1992. 188(2): p. 518-29.
373. Everett, R.D., *Trans activation of transcription by herpes virus products: requirement for two HSV-1 immediate-early polypeptides for maximum activity*. *EMBO J*, 1984. 3(13): p. 3135-41.
374. Davis, M.G., et al., *Immediate-early gene region of human cytomegalovirus trans-activates the promoter of human immunodeficiency virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(23): p. 8642-6.
375. Tevethia, M.J., et al., *Participation of two human cytomegalovirus immediate early gene regions in transcriptional activation of adenovirus promoters*. *Virology*, 1987. 161(2): p. 276-85.
376. Depto, A.S. and R.M. Stenberg, *Functional analysis of the true late human cytomegalovirus pp28 upstream promoter: cis-acting elements and viral trans-acting proteins necessary for promoter activation*. *J Virol*, 1992. 66(5): p. 3241-6.
377. Chang, C.P., C.L. Malone, and M.F. Stinski, *A human cytomegalovirus early gene has three inducible promoters that are regulated differentially at various times after infection*. *J Virol*, 1989. 63(1): p. 281-90.
378. White, E.A. and D.H. Spector, *Exon 3 of the human cytomegalovirus major immediate-early region is required for efficient viral gene expression and for cellular cyclin modulation*. *J Virol*, 2005. 79(12): p. 7438-52.
379. Lafemina, R.L., et al., *Expression of the acidic nuclear immediate-early protein (IE1) of human cytomegalovirus in stable cell lines and its preferential association with metaphase chromosomes*. *Virology*, 1989. 172(2): p. 584-600.
380. Straat, K., et al., *Activation of telomerase by human cytomegalovirus*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. 101(7): p. 488-97.
381. Bryant, L.A., et al., *The human cytomegalovirus 86-kilodalton major immediate-early protein interacts physically and functionally with histone acetyltransferase P/CAF*. *J Virol*, 2000. 74(16): p. 7230-7.
382. Hayhurst, G.P., et al., *CCAAT box-dependent activation of the TATA-less human DNA polymerase alpha promoter by the human cytomegalovirus 72-kilodalton major immediate-early protein*. *J Virol*, 1995. 69(1): p. 182-8.
383. Margolis, M.J., et al., *Interaction of the 72-kilodalton human cytomegalovirus IE1 gene product with E2F1 coincides with E2F-dependent activation of dihydrofolate reductase transcription*. *J Virol*, 1995. 69(12): p. 7759-67.
384. Pajovic, S., et al., *Identification of a viral kinase that phosphorylates specific E2Fs and pocket proteins*. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(11): p. 6459-64.
385. Landschulz, W.H., P.F. Johnson, and S.L. McKnight, *The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins*. *Science*, 1988. 240(4860): p. 1759-64.
386. Miller, J., A.D. McLachlan, and A. Klug, *Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes*. *EMBO J*, 1985. 4(6): p. 1609-14.
387. Lukac, D.M., J.R. Manuppello, and J.C. Alwine, *Transcriptional activation by the human cytomegalovirus immediate-early proteins: requirements for simple promoter structures and interactions with multiple components of the transcription complex*. *J Virol*, 1994. 68(8): p. 5184-93.

388. Spengler, M.L., et al., *SUMO-1 modification of human cytomegalovirus IE1/IE72*. J Virol, 2002. 76(6): p. 2990-6.
389. Staprans, S.I., D.K. Rabert, and D.H. Spector, *Identification of sequence requirements and trans-acting functions necessary for regulated expression of a human cytomegalovirus early gene*. J Virol, 1988. 62(9): p. 3463-73.
390. Iwamoto, G.K., et al., *Modulation of interleukin 1 beta gene expression by the immediate early genes of human cytomegalovirus*. J Clin Invest, 1990. 85(6): p. 1853-7.
391. Reifel-Miller, A.E. and C.H. Lee, *Detection of an IE responsive element(s) in the BamHI J fragment of human cytomegalovirus AD169*. Virology, 1990. 177(2): p. 496-504.
392. Biegalko, B.J. and A.P. Geballe, *Sequence requirements for activation of the HIV-1 LTR by human cytomegalovirus*. Virology, 1991. 183(1): p. 381-5.
393. Ghazal, P., et al., *A discrete cis element in the human immunodeficiency virus long terminal repeat mediates synergistic trans activation by cytomegalovirus immediate-early proteins*. J Virol, 1991. 65(12): p. 6735-42.
394. Hagemeyer, C., et al., *The human cytomegalovirus 80-kilodalton but not the 72-kilodalton immediate-early protein transactivates heterologous promoters in a TATA box-dependent mechanism and interacts directly with TFIID*. J Virol, 1992. 66(7): p. 4452-6.
395. Hunninghake, G.W., et al., *The functional importance of a cap site-proximal region of the human prointerleukin 1 beta gene is defined by viral protein trans-activation*. Mol Cell Biol, 1992. 12(8): p. 3439-48.
396. Wade, E.J., K.M. Klucher, and D.H. Spector, *An AP-1 binding site is the predominant cis-acting regulatory element in the 1.2-kilobase early RNA promoter of human cytomegalovirus*. J Virol, 1992. 66(4): p. 2407-17.
397. Walker, S., et al., *A 10-base-pair element of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat (LTR) is an absolute requirement for transactivation by the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein but can be compensated for by other LTR regions in transactivation by the 80-kilodalton IE2 protein*. J Virol, 1992. 66(3): p. 1543-50.
398. Klucher, K.M., et al., *In vivo and in vitro analysis of transcriptional activation mediated by the human cytomegalovirus major immediate-early proteins*. Mol Cell Biol, 1993. 13(2): p. 1238-50.
399. Lang, D. and T. Stamminger, *The 86-kilodalton IE-2 protein of human cytomegalovirus is a sequence-specific DNA-binding protein that interacts directly with the negative autoregulatory response element located near the cap site of the IE-1/2 enhancer-promoter*. J Virol, 1993. 67(1): p. 323-31.
400. Kronschnabl, M. and T. Stamminger, *Synergistic induction of intercellular adhesion molecule-1 by the human cytomegalovirus transactivators IE2p86 and pp71 is mediated via an Sp1-binding site*. J Gen Virol, 2003. 84(Pt 1): p. 61-73.
401. Yurochko, A.D., et al., *Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters*. J Virol, 1997. 71(6): p. 4638-48.
402. Fortunato, E.A., et al., *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, 1997. 71(11): p. 8176-85.
403. Poma, E.E., et al., *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, 1996. 70(11): p. 7867-77.
404. Reeves, M., et al., *Human cytomegalovirus IE72 protein interacts with the transcriptional repressor hDaxx to regulate LUNA gene expression during lytic infection*. J Virol. 84(14): p. 7185-94.
405. Kamata, T., S. Tanaka, and Y. Watanabe, *Human cytomegalovirus-induced chromatin factors responsible for changes in template activity and structure of infected cell chromatin*. Virology, 1978. 90(2): p. 197-208.
406. Kamata, T., S. Tanaka, and Y. Watanabe, *Characterization of the human cytomegalovirus-induced chromatin factor responsible for activation of host cell chromatin template*. Virology, 1979. 97(1): p. 224-8.

407. Speir, E., et al., *Aspirin attenuates cytomegalovirus infectivity and gene expression mediated by cyclooxygenase-2 in coronary artery smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1998. 83(2): p. 210-6.
408. Bresnahan, W.A., T. Albrecht, and E.A. Thompson, *The cyclin E promoter is activated by human cytomegalovirus 86-kDa immediate early protein*. *J Biol Chem*, 1998. 273(34): p. 22075-82.
409. Schwartz, R., B. Helmich, and D.H. Spector, *CREB and CREB-binding proteins play an important role in the IE2 86-kilodalton protein-mediated transactivation of the human cytomegalovirus 2.2-kilobase RNA promoter*. *J Virol*, 1996. 70(10): p. 6955-66.
410. Xu, J. and L. Ye, *Human cytomegalovirus IE2 protein interacts with transcription activating factors*. *Sci China C Life Sci*, 2002. 45(6): p. 604-12.
411. Castillo, J.P. and T.F. Kowalik, *Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control*. *Gene*, 2002. 290(1-2): p. 19-34.
412. Caswell, R., L. Bryant, and J. Sinclair, *Human cytomegalovirus immediate-early 2 (IE2) protein can transactivate the human hsp70 promoter by alleviation of Dr1-mediated repression*. *J Virol*, 1996. 70(6): p. 4028-37.
413. Lang, D., et al., *Functional interaction between the human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein and the cellular transcription factor CREB*. *J Virol*, 1995. 69(10): p. 6030-7.
414. Choi, K.S., S.J. Kim, and S. Kim, *The retinoblastoma gene product negatively regulates transcriptional activation mediated by the human cytomegalovirus IE2 protein*. *Virology*, 1995. 208(2): p. 450-6.
415. Samaniego, L.A., M.J. Tevethia, and D.J. Spector, *The human cytomegalovirus 86-kilodalton immediate-early 2 protein: synthesis as a precursor polypeptide and interaction with a 75-kilodalton protein of probable viral origin*. *J Virol*, 1994. 68(2): p. 720-9.
416. Jupp, R., et al., *Human cytomegalovirus IE86 protein interacts with promoter-bound TATA-binding protein via a specific region distinct from the autorepression domain*. *J Virol*, 1993. 67(12): p. 7539-46.
417. Furnari, B.A., et al., *Human cytomegalovirus immediate-early gene 2 protein interacts with itself and with several novel cellular proteins*. *J Virol*, 1993. 67(8): p. 4981-91.
418. Caswell, R., et al., *The human cytomegalovirus 86K immediate early (IE) 2 protein requires the basic region of the TATA-box binding protein (TBP) for binding, and interacts with TBP and transcription factor TFIIIB via regions of IE2 required for transcriptional regulation*. *J Gen Virol*, 1993. 74 (Pt 12): p. 2691-8.
419. Hagemeyer, C., et al., *The 72K IE1 and 80K IE2 proteins of human cytomegalovirus independently trans-activate the c-fos, c-myc and hsp70 promoters via basal promoter elements*. *J Gen Virol*, 1992. 73 (Pt 9): p. 2385-93.
420. Taylor, R.T. and W.A. Bresnahan, *Human cytomegalovirus immediate-early 2 gene expression blocks virus-induced beta interferon production*. *J Virol*, 2005. 79(6): p. 3873-7.
421. Taylor, R.T. and W.A. Bresnahan, *Human cytomegalovirus immediate-early 2 protein IE86 blocks virus-induced chemokine expression*. *J Virol*, 2006. 80(2): p. 920-8.
422. Poole, E., et al., *NF-kappaB-mediated activation of the chemokine CCL22 by the product of the human cytomegalovirus gene UL144 escapes regulation by viral IE86*. *J Virol*, 2008. 82(9): p. 4250-6.
423. Pizzomo, M.C. and G.S. Hayward, *The IE2 gene products of human cytomegalovirus specifically down-regulate expression from the major immediate-early promoter through a target sequence located near the cap site*. *J Virol*, 1990. 64(12): p. 6154-65.
424. Cherrington, J.M., E.L. Khoury, and E.S. Mocarski, *Human cytomegalovirus ie2 negatively regulates alpha gene expression via a short target sequence near the transcription start site*. *J Virol*, 1991. 65(2): p. 887-96.
425. Liu, B., T.W. Hermiston, and M.F. Stinski, *A cis-acting element in the major immediate-early (IE) promoter of human cytomegalovirus is required for negative regulation by IE2*. *J Virol*, 1991. 65(2): p. 897-903.

426. Macias, M.P. and M.F. Stinski, *An in vitro system for human cytomegalovirus immediate early 2 protein (IE2)-mediated site-dependent repression of transcription and direct binding of IE2 to the major immediate early promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(2): p. 707-11.
427. Schwartz, R., et al., *Site-specific binding of the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein to an early gene promoter*. J Virol, 1994. 68(9): p. 5613-22.
428. Scully, A.L., et al., *The human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein interacts with an early gene promoter via site-specific DNA binding and protein-protein associations*. J Virol, 1995. 69(10): p. 6533-40.
429. Poon, A.P., Y. Liang, and B. Roizman, *Herpes simplex virus 1 gene expression is accelerated by inhibitors of histone deacetylases in rabbit skin cells infected with a mutant carrying a cDNA copy of the infected-cell protein no. 0*. J Virol, 2003. 77(23): p. 12671-8.
430. Lomonte, P., et al., *Functional interaction between class II histone deacetylases and ICP0 of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 2004. 78(13): p. 6744-57.
431. Lukac, D.M., et al., *TAF-like functions of human cytomegalovirus immediate-early proteins*. J Virol, 1997. 71(10): p. 7227-39.
432. Murphy, J.C., et al., *Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation*. EMBO J, 2002. 21(5): p. 1112-20.
433. St Jeor, S., et al., *Analysis of human cytomegalovirus nucleoprotein complexes*. J Virol, 1982. 41(1): p. 309-12.
434. Kierszenbaum, A.L. and E.S. Huang, *Chromatin pattern consisting of repeating bipartite structures in WI-38 cells infected with human cytomegalovirus*. J Virol, 1978. 28(2): p. 661-4.
435. Nevels, M., C. Paulus, and T. Shenk, *Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(49): p. 17234-9.
436. Davie, J.R., *Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate*. J Nutr, 2003. 133(7 Suppl): p. 2485S-2493S.
437. Brosch, G., et al., *Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of Cochliobolus carbonum*. Plant Cell, 1995. 7(11): p. 1941-50.
438. Gawn, J.M. and R.F. Greaves, *Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a broad block to viral delayed-early gene expression*. J Virol, 2002. 76(9): p. 4441-55.
439. Greaves, R.F. and E.S. Mocarski, *Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant*. J Virol, 1998. 72(1): p. 366-79.
440. Mocarski, E.S., et al., *A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(21): p. 11321-6.
441. Park, J.J., et al., *Functional interaction of the human cytomegalovirus IE2 protein with histone deacetylase 2 in infected human fibroblasts*. J Gen Virol, 2007. 88(Pt 12): p. 3214-23.
442. Reeves, M., et al., *Autorepression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer at late times of infection is mediated by the recruitment of chromatin remodeling enzymes by IE86*. J Virol, 2006. 80(20): p. 9998-10009.
443. Ahn, J.H., E.J. Brignole, 3rd, and G.S. Hayward, *Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML*. Mol Cell Biol, 1998. 18(8): p. 4899-913.
444. Wu, W.S., et al., *The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases*. Mol Cell Biol, 2001. 21(7): p. 2259-68.
445. Wilkinson, G.W., et al., *Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product*. J Gen Virol, 1998. 79 (Pt 5): p. 1233-45.

446. Koriath, F., et al., *The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1*. Exp Cell Res, 1996. 229(1): p. 155-8.
447. Nevels, M., W. Brune, and T. Shenk, *SUMOylation of the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein facilitates expression of the 86-kilodalton IE2 protein and promotes viral replication*. Journal of virology, 2004. 78(14): p. 7803-12.
448. Reeves, M.B., *Chromatin-mediated regulation of cytomegalovirus gene expression*. Virus Res. 157(2): p. 134-43.
449. Nitzsche, A., C. Paulus, and M. Nevels, *Temporal dynamics of cytomegalovirus chromatin assembly in productively infected human cells*. J Virol, 2008. 82(22): p. 11167-80.
450. Keller, M.J., et al., *Reversal of human cytomegalovirus major immediate-early enhancer/promoter silencing in quiescently infected cells via the cyclic AMP signaling pathway*. J Virol, 2007. 81(12): p. 6669-81.
451. Netterwald, J., et al., *Two gamma interferon-activated site-like elements in the human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer are important for viral replication*. J Virol, 2005. 79(8): p. 5035-46.
452. Stern, J.L., et al., *Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression by the cellular transcription factor CCAAT displacement protein*. Virology, 2008. 378(2): p. 214-25.
453. Zweidler-Mckay, P.A., et al., *Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor*. Mol Cell Biol, 1996. 16(8): p. 4024-34.
454. Nelson, J.A., C. Reynolds-Kohler, and B.A. Smith, *Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene*. Mol Cell Biol, 1987. 7(11): p. 4125-9.
455. Wright, E., et al., *Ets-2 repressor factor recruits histone deacetylase to silence human cytomegalovirus immediate-early gene expression in non-permissive cells*. J Gen Virol, 2005. 86(Pt 3): p. 535-44.
456. Dosa, R., K. Burian, and E. Gonczol, *Human cytomegalovirus latency is associated with the state of differentiation of the host cells: an in vitro model in teratocarcinoma cells*. Acta Microbiol Immunol Hung, 2005. 52(3-4): p. 397-406.
457. loudinkova, E., et al., *Control of human cytomegalovirus gene expression by differential histone modifications during lytic and latent infection of a monocytic cell line*. Gene, 2006. 384: p. 120-8.
458. Meier, J.L., *Reactivation of the human cytomegalovirus major immediate-early regulatory region and viral replication in embryonal Ntera2 cells: role of trichostatin A, retinoic acid, and deletion of the 21-base-pair repeats and modulator*. J Virol, 2001. 75(4): p. 1581-93.
459. Reeves, M. and J. Sinclair, *Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. 325: p. 297-313.
460. Maul, G.G., *Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication*. Bioessays, 1998. 20(8): p. 660-7.
461. Maul, G.G., A.M. Ishov, and R.D. Everett, *Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1*. Virology, 1996. 217(1): p. 67-75.
462. Woodhall, D.L., et al., *Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter*. J Biol Chem, 2006. 281(49): p. 37652-60.
463. Groves, I.J., M.B. Reeves, and J.H. Sinclair, *Lytic infection of permissive cells with human cytomegalovirus is regulated by an intrinsic 'pre-immediate-early' repression of viral gene expression mediated by histone post-translational modification*. J Gen Virol, 2009. 90(Pt 10): p. 2364-74.
464. Nevels, M., C. Paulus, and T. Shenk, *Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. 101(49): p. 17234-9.
465. Cuevas-Bennett, C. and T. Shenk, *Dynamic histone H3 acetylation and methylation at human cytomegalovirus promoters during replication in fibroblasts*. J Virol, 2008. 82(19): p. 9525-36.

466. Trojer, P. and D. Reinberg, *Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature?* Mol Cell, 2007. 28(1): p. 1-13.
467. Marchini, A., H. Liu, and H. Zhu, *Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes.* J Virol, 2001. 75(4): p. 1870-8.
468. White, E.A., et al., *Small internal deletions in the human cytomegalovirus IE2 gene result in nonviable recombinant viruses with differential defects in viral gene expression.* J Virol, 2004. 78(4): p. 1817-30.
469. Liu, X., et al., *Phorbol ester-induced human cytomegalovirus major immediate-early (MIE) enhancer activation through PKC-delta, CREB, and NF-kappaB desilences MIE gene expression in quiescently infected human pluripotent NTera2 cells.* J Virol. 84(17): p. 8495-508.
470. Niller, H.H. and L. Hennighausen, *Phytohemagglutinin-induced activity of cyclic AMP (cAMP) response elements from cytomegalovirus is reduced by cyclosporine and synergistically enhanced by cAMP.* J Virol, 1990. 64(5): p. 2388-91.
471. Kristoffersen, A.K., K. Tasken, and H. Rollag, *Expression of protein kinase A and protein kinase C during ongoing human cytomegalovirus infection.* Arch Virol, 1994. 138(1-2): p. 85-93.
472. Keay, S. and B.R. Baldwin, *Evidence for the role of cell protein phosphorylation in human cytomegalovirus/host cell fusion.* J Gen Virol, 1996. 77 (Pt 10): p. 2597-604.
473. Milbradt, J., S. Auerchs, and M. Marschall, *Cytomegaloviral proteins pUL50 and pUL53 are associated with the nuclear lamina and interact with cellular protein kinase C.* J Gen Virol, 2007. 88(Pt 10): p. 2642-50.
474. Milbradt, J., et al., *Cytomegaloviral proteins that associate with the nuclear lamina: components of a postulated nuclear egress complex.* J Gen Virol, 2009. 90(Pt 3): p. 579-90.
475. Waheed, I., et al., *Binding of the human cytomegalovirus 80-kDa immediate-early protein (IE2) to minor groove A/T-rich sequences bounded by CG dinucleotides is regulated by protein oligomerization and phosphorylation.* Virology, 1998. 252(1): p. 235-57.
476. Franke, T.F., et al., *The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase.* Cell, 1995. 81(5): p. 727-36.
477. King, W.G., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation.* Mol Cell Biol, 1997. 17(8): p. 4406-18.
478. Klippel, A., et al., *Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways.* Mol Cell Biol, 1996. 16(8): p. 4117-27.
479. Madrid, L.V., et al., *Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB.* Mol Cell Biol, 2000. 20(5): p. 1626-38.
480. Reddy, S.A., J.H. Huang, and W.S. Liao, *Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF-kappa B activation.* J Immunol, 2000. 164(3): p. 1355-63.
481. Boyle, K.A., R.L. Pietropaolo, and T. Compton, *Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway.* Mol Cell Biol, 1999. 19(5): p. 3607-13.
482. Johnson, R.A., et al., *Human cytomegalovirus up-regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: inhibition of PI3-K activity inhibits viral replication and virus-induced signaling.* J Virol, 2001. 75(13): p. 6022-32.
483. Chan, G., et al., *PI3K-dependent upregulation of Mcl-1 by human cytomegalovirus is mediated by epidermal growth factor receptor and inhibits apoptosis in short-lived monocytes.* J Immunol. 184(6): p. 3213-22.
484. Kowalik, T.F., et al., *Multiple mechanisms are implicated in the regulation of NF-kappa B activity during human cytomegalovirus infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(3): p. 1107-11.
485. Mar, E.C., Y.C. Cheng, and E.S. Huang, *Effect of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine on human cytomegalovirus replication in vitro.* Antimicrob Agents Chemother, 1983. 24(4): p. 518-21.

486. Yurochko, A.D., et al., *Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters*. J Virol, 1995. 69(9): p. 5391-400.
487. Dhanasekaran, N. and E. Premkumar Reddy, *Signaling by dual specificity kinases*. Oncogene, 1998. 17(11 Reviews): p. 1447-55.
488. Robinson, M.J. and M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein kinase pathways*. Curr Opin Cell Biol, 1997. 9(2): p. 180-6.
489. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn, *Signal transduction through MAP kinase cascades*. Adv Cancer Res, 1998. 74: p. 49-139.
490. Weitzman, J.B. and M. Yaniv, *Signal transduction pathways and modulation of gene activity*. Clin Chem Lab Med, 1998. 36(8): p. 535-9.
491. Johnson, R.A., S.M. Huong, and E.S. Huang, *Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct pathways: a novel mechanism for activation of p38*. J Virol, 2000. 74(3): p. 1158-67.
492. Rodems, S.M. and D.H. Spector, *Extracellular signal-regulated kinase activity is sustained early during human cytomegalovirus infection*. J Virol, 1998. 72(11): p. 9173-80.
493. Yurochko, A.D. and E.S. Huang, *Human cytomegalovirus binding to human monocytes induces immunoregulatory gene expression*. J Immunol, 1999. 162(8): p. 4806-16.
494. Wang, J., et al., *HCMV infection attenuates hydrogen peroxide induced endothelial apoptosis-- involvement of ERK pathway*. FEBS Lett, 2006. 580(11): p. 2779-87.
495. Chan, Y.J., et al., *Synergistic interactions between overlapping binding sites for the serum response factor and ELK-1 proteins mediate both basal enhancement and phorbol ester responsiveness of primate cytomegalovirus major immediate-early promoters in monocyte and T-lymphocyte cell types*. J Virol, 1996. 70(12): p. 8590-605.
496. Frost, J.A., et al., *A requirement for extracellular signal-regulated kinase (ERK) function in the activation of AP-1 by Ha-Ras, phorbol 12-myristate 13-acetate, and serum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(9): p. 3844-8.
497. Pende, M., et al., *Neurotransmitter- and growth factor-induced cAMP response element binding protein phosphorylation in glial cell progenitors: role of calcium ions, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 kinase pathway*. J Neurosci, 1997. 17(4): p. 1291-301.
498. Xing, J., D.D. Ginty, and M.E. Greenberg, *Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase*. Science, 1996. 273(5277): p. 959-63.
499. Xing, J., et al., *Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation*. Mol Cell Biol, 1998. 18(4): p. 1946-55.
500. Harel, N.Y. and J.C. Alwine, *Phosphorylation of the human cytomegalovirus 86-kilodalton immediate-early protein IE2*. J Virol, 1998. 72(7): p. 5481-92.
501. Yi, H.A., et al., *Cellular signals involved in cyclooxygenase-2 expression induced by human cytomegalovirus*. Virus Res, 2009. 146(1-2): p. 89-96.
502. Johnson, R.A., S.M. Huong, and E.S. Huang, *Inhibitory effect of 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H -imidazole on HCMV DNA replication and permissive infection*. Antiviral Res, 1999. 41(3): p. 101-11.
503. Georgopoulos, C. and W.J. Welch, *Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones*. Annu Rev Cell Biol, 1993. 9: p. 601-34.
504. Brehm, A., et al., *Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription*. Nature, 1998. 391(6667): p. 597-601.
505. Laminie, C.G., et al., *Mechanistic analysis of RNA polymerase III regulation by the retinoblastoma protein*. EMBO J, 1997. 16(8): p. 2061-71.

506. Magnaghi-Jaulin, L., et al., *Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase*. Nature, 1998. 391(6667): p. 601-5.
507. Weinberg, R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, 1995. 81(3): p. 323-30.
508. Hagemeyer, C., et al., *Functional interaction between the HCMV IE2 transactivator and the retinoblastoma protein*. EMBO J, 1994. 13(12): p. 2897-903.
509. Wang, X. and G.E. Sonenshein, *Induction of the RelB NF-kappaB subunit by the cytomegalovirus IE1 protein is mediated via Jun kinase and c-Jun/Fra-2 AP-1 complexes*. J Virol, 2005. 79(1): p. 95-105.
510. Dou, J., et al., *Human cytomegalovirus induces caspase-dependent apoptosis of megakaryocytic CHRF-288-11 cells by activating the JNK pathway*. Int J Hematol. 91(4): p. 620-9.
511. Kim, S., et al., *Human cytomegalovirus IE1 protein activates AP-1 through a cellular protein kinase(s)*. J Gen Virol, 1999. 80 (Pt 4): p. 961-9.
512. Karin, M., *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem, 1995. 270(28): p. 16483-6.
513. De Smaele, E., et al., *Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling*. Nature, 2001. 414(6861): p. 308-13.
514. Xuan, B., et al., *Human cytomegalovirus protein pUL38 induces ATF4 expression, inhibits persistent JNK phosphorylation, and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced cell death*. J Virol, 2009. 83(8): p. 3463-74.
515. Terhune, S., et al., *Human cytomegalovirus UL38 protein blocks apoptosis*. J Virol, 2007. 81(7): p. 3109-23.
516. Sanchez, V., et al., *Cyclin-dependent kinase activity is required at early times for accurate processing and accumulation of the human cytomegalovirus UL122-123 and UL37 immediate-early transcripts and at later times for virus production*. J Virol, 2004. 78(20): p. 11219-32.
517. Ekholm, S.V. and S.I. Reed, *Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle*. Curr Opin Cell Biol, 2000. 12(6): p. 676-84.
518. Pines, J., *Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners*. Trends Biochem Sci, 1993. 18(6): p. 195-7.
519. Fortunato, E.A., et al., *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, 2002. 76(11): p. 5369-79.
520. Salvant, B.S., E.A. Fortunato, and D.H. Spector, *Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription*. J Virol, 1998. 72(5): p. 3729-41.
521. Kapasi, A.J. and D.H. Spector, *Inhibition of the cyclin-dependent kinases at the beginning of human cytomegalovirus infection specifically alters the levels and localization of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases cdk9 and cdk7 at the viral transcriptosome*. J Virol, 2008. 82(1): p. 394-407.
522. Tamrakar, S., A.J. Kapasi, and D.H. Spector, *Human cytomegalovirus infection induces specific hyperphosphorylation of the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II that is associated with changes in the abundance, activity, and localization of cdk9 and cdk7*. J Virol, 2005. 79(24): p. 15477-93.
523. Bresnahan, W.A., et al., *Inhibition of cellular Cdk2 activity blocks human cytomegalovirus replication*. Virology, 1997. 231(2): p. 239-47.
524. Rechter, S., et al., *Cyclin-dependent Kinases Phosphorylate the Cytomegalovirus RNA Export Protein pUL69 and Modulate Its Nuclear Localization and Activity*. J Biol Chem, 2009. 284(13): p. 8605-13.
525. Hertel, L., S. Chou, and E.S. Mocarski, *Viral and cell cycle-regulated kinases in cytomegalovirus-induced pseudomitosis and replication*. PLoS Pathog, 2007. 3(1): p. e6.
526. Bresnahan, W.A., et al., *Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1*. Virology, 1996. 224(1): p. 150-60.

527. Dittmer, D. and E.S. Mocarski, *Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition*. J Virol, 1997. 71(2): p. 1629-34.
528. Jault, F.M., et al., *Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest*. J Virol, 1995. 69(11): p. 6697-704.
529. Lu, M. and T. Shenk, *Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S*. J Virol, 1996. 70(12): p. 8850-7.
530. Staib, F., et al., *The p53 tumor suppressor network is a key responder to microenvironmental components of chronic inflammatory stress*. Cancer Res, 2005. 65(22): p. 10255-64.
531. Prydzial, E.L. and J.F. Wright, *Prothrombinase assembly on an enveloped virus: evidence that the cytomegalovirus surface contains procoagulant phospholipid*. Blood, 1994. 84(11): p. 3749-57.
532. Melnick, J.L., et al., *Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells*. Lancet, 1983. 2(8351): p. 644-7.
533. Reinhardt, B., et al., *Upregulation of functionally active vascular endothelial growth factor by human cytomegalovirus*. J Gen Virol, 2005. 86(Pt 1): p. 23-30.
534. Inoue, M., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis*. Circulation, 1998. 98(20): p. 2108-16.
535. Moulton, K.S., et al., *Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(8): p. 4736-41.
536. Waltenberger, J., *Modulation of growth factor action: implications for the treatment of cardiovascular diseases*. Circulation, 1997. 96(11): p. 4083-94.
537. Barleon, B., et al., *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1*. Blood, 1996. 87(8): p. 3336-43.
538. Clauss, M., et al., *Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration*. J Exp Med, 1990. 172(6): p. 1535-45.
539. Reinhardt, B., et al., *HCMV infection of human vascular smooth muscle cells leads to enhanced expression of functionally intact PDGF beta-receptor*. Cardiovasc Res, 2005. 67(1): p. 151-60.
540. Zhou, Y.F., et al., *The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 256(3): p. 608-13.
541. Koskinen, P.K., et al., *Cytomegalovirus infection accelerates cardiac allograft vasculopathy: correlation between angiographic and endomyocardial biopsy findings in heart transplant patients*. Transpl Int, 1993. 6(6): p. 341-7.
542. Speir, E., et al., *Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis*. Science, 1994. 265(5170): p. 391-4.
543. Streblov, D.N., et al., *The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration*. Cell, 1999. 99(5): p. 511-20.
544. Grotendorst, G.R., et al., *Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells*. J Cell Physiol, 1982. 113(2): p. 261-6.
545. Ross, R., et al., *Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis*. Science, 1990. 248(4958): p. 1009-12.
546. Wilcox, J.N., et al., *Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization*. J Clin Invest, 1988. 82(3): p. 1134-43.
547. Melnick, J.L., E. Adam, and M.E. Debakey, *Cytomegalovirus and atherosclerosis*. Eur Heart J, 1993. 14 Suppl K: p. 30-8.
548. Zhou, Y.F., et al., *Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy*. N Engl J Med, 1996. 335(9): p. 624-30.

549. Rahbar, A., et al., *Evidence of active cytomegalovirus infection and increased production of IL-6 in tissue specimens obtained from patients with inflammatory bowel diseases*. *Inflamm Bowel Dis*, 2003. 9(3): p. 154-61.
550. Docke, W.D., et al., *Subclinical activation of latent cytomegalovirus (CMV) infection and anti-CMV immune response in patients with atopic dermatitis*. *Br J Dermatol*, 2003. 148(5): p. 954-63.
551. Kutza, A.S., et al., *High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients*. *Clin Infect Dis*, 1998. 26(5): p. 1076-82.
552. George, M.J., et al., *The independent role of cytomegalovirus as a risk factor for invasive fungal disease in orthotopic liver transplant recipients*. *Boston Center for Liver Transplantation CMVIG-Study Group. Cytogam, MedImmune, Inc. Gaithersburg, Maryland*. *Am J Med*, 1997. 103(2): p. 106-13.
553. Nichols, W.G., et al., *High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection*. *J Infect Dis*, 2002. 185(3): p. 273-82.
554. Harkins, L., et al., *Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer*. *Lancet*, 2002. 360(9345): p. 1557-63.
555. Samanta, M., et al., *High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma*. *J Urol*, 2003. 170(3): p. 998-1002.
556. Hjelmesaeth, J., et al., *Asymptomatic cytomegalovirus infection is associated with increased risk of new-onset diabetes mellitus and impaired insulin release after renal transplantation*. *Diabetologia*, 2004. 47(9): p. 1550-6.
557. van der Werf, N., et al., *Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2007. 23(3): p. 169-83.
558. Fowler, K.B., et al., *The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status*. *N Engl J Med*, 1992. 326(10): p. 663-7.
559. Sygdelou, A., et al., *Congenital cytomegalovirus infection*. *Ann N Y Acad Sci*. 1205: p. 144-7.
560. Soderberg-Naucler, C., et al., *Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent*. *J Virol*, 2001. 75(16): p. 7543-54.
561. Katryniok, C., et al., *Role of DNA methylation and methyl-DNA binding proteins in the repression of 5-lipoxygenase promoter activity*. *Biochim Biophys Acta*. 1801(1): p. 49-57.
562. Baldick, C.J., Jr., et al., *Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle*. *J Virol*, 1997. 71(6): p. 4400-8.
563. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
564. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
565. Heltweg, B., et al., *Nonisotopic substrate for assaying both human zinc and NAD+-dependent histone deacetylases*. *Anal Biochem*, 2003. 319(1): p. 42-8.
566. Heltweg, B., J. Trapp, and M. Jung, *In vitro assays for the determination of histone deacetylase activity*. *Methods*, 2005. 36(4): p. 332-7.
567. Heltweg, B., et al., *Subtype selective substrates for histone deacetylases*. *J Med Chem*, 2004. 47(21): p. 5235-43.
568. Zufferey, R., et al., *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo*. *Nat Biotechnol*, 1997. 15(9): p. 871-5.
569. Oberg, B., *Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium)*. *Pharmacol Ther*, 1989. 40(2): p. 213-85.

570. Boehme, K.W., M. Guerrero, and T. Compton, *Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells*. J Immunol, 2006. 177(10): p. 7094-102.
571. Botto, S., et al., *IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin*. Blood. 117(1): p. 352-61.
572. Lischka, P., et al., *The UL69 transactivator protein of human cytomegalovirus interacts with DEXD/H-Box RNA helicase UAP56 to promote cytoplasmic accumulation of unspliced RNA*. Mol Cell Biol, 2006. 26(5): p. 1631-43.
573. Toth, Z., P. Lischka, and T. Stamminger, *RNA-binding of the human cytomegalovirus transactivator protein UL69, mediated by arginine-rich motifs, is not required for nuclear export of unspliced RNA*. Nucleic Acids Res, 2006. 34(4): p. 1237-49.
574. Kim, E.T., et al., *Cleavage specificity of the UL48 deubiquitinating protease activity of human cytomegalovirus and the growth of an active-site mutant virus in cultured cells*. J Virol, 2009. 83(23): p. 12046-56.
575. Tandon, R. and E.S. Mocarski, *Control of cytoplasmic maturation events by cytomegalovirus tegument protein pp150*. J Virol, 2008. 82(19): p. 9433-44.
576. Ray, R., et al., *Mithramycin blocks protein binding and function of the SV40 early promoter*. J Clin Invest, 1989. 83(6): p. 2003-7.
577. Miller, D.M., et al., *Mithramycin selectively inhibits transcription of G-C containing DNA*. Am J Med Sci, 1987. 294(5): p. 388-94.
578. Chun, R.F., et al., *Modulation of Sp1 phosphorylation by human immunodeficiency virus type 1 Tat*. J Virol, 1998. 72(4): p. 2615-29.
579. Wymann, M.P., et al., *Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction*. Mol Cell Biol, 1996. 16(4): p. 1722-33.
580. Arcaro, A. and M.P. Wymann, *Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses*. Biochem J, 1993. 296 (Pt 2): p. 297-301.
581. Sarkaria, J.N., et al., *Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin*. Cancer Res, 1998. 58(19): p. 4375-82.
582. Katso, R., et al., *Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. 17: p. 615-75.
583. Zhang, Y., M. Liao, and M.L. Dufau, *Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase C ζ -induced phosphorylation of Sp1 and p107 repressor release have a critical role in histone deacetylase inhibitor-mediated derepression [corrected] of transcription of the luteinizing hormone receptor gene*. Mol Cell Biol, 2006. 26(18): p. 6748-61.
584. Smith, G.C. and S.P. Jackson, *The DNA-dependent protein kinase*. Genes Dev, 1999. 13(8): p. 916-34.
585. Anderson, C.W. and S.P. Lees-Miller, *The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1992. 2(4): p. 283-314.
586. Ptak, R.G., et al., *Phosphorylation of triciribine is necessary for activity against HIV type 1*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998. 14(15): p. 1315-22.
587. Wotring, L.L., et al., *Dual mechanisms of inhibition of DNA synthesis by triciribine*. Cancer Res, 1990. 50(16): p. 4891-9.
588. Davis, S., et al., *The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo*. J Neurosci, 2000. 20(12): p. 4563-72.
589. Selcher, J.C., et al., *A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning*. Learn Mem, 1999. 6(5): p. 478-90.
590. Wang, X., et al., *Significant neuroprotection against ischemic brain injury by inhibition of the MEK1 protein kinase in mice: exploration of potential mechanism associated with apoptosis*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. 304(1): p. 172-8.

591. Caltagirone, S., et al., *Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential*. Int J Cancer, 2000. 87(4): p. 595-600.
592. Sato, F., et al., *Apigenin induces morphological differentiation and G2-M arrest in rat neuronal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. 204(2): p. 578-84.
593. Trochon, V., et al., *Apigenin inhibits endothelial-cell proliferation in G(2)/M phase whereas it stimulates smooth-muscle cells by inhibiting P21 and P27 expression*. Int J Cancer, 2000. 85(5): p. 691-6.
594. Wang, I.K., S.Y. Lin-Shiau, and J.K. Lin, *Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells*. Eur J Cancer, 1999. 35(10): p. 1517-25.
595. Yin, F., A.E. Giuliano, and A.J. Van Herle, *Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO)*. Anticancer Res, 1999. 19(5B): p. 4297-303.
596. Fu, Y., et al., *The p38 MAPK inhibitor, PD169316, inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling in human ovarian cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 310(2): p. 391-7.
597. Eckly-Michel, A.E., A. Le Bec, and C. Lugnier, *Chelerythrine, a protein kinase C inhibitor, interacts with cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Eur J Pharmacol, 1997. 324(1): p. 85-8.
598. Herbert, J.M., et al., *Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. 172(3): p. 993-9.
599. Lundmark, J.L., et al., *Chelerythrine increases Na-K-ATPase activity and limits ischemic injury in isolated rat hearts*. Am J Physiol, 1999. 277(3 Pt 2): p. H999-H1006.
600. Sacchetti, B. and E. Bielavska, *Chelerythrine, a specific PKC inhibitor, blocks acquisition but not consolidation and retrieval of conditioned taste aversion in rat*. Brain Res, 1998. 799(1): p. 84-90.
601. Serrano, P.A., et al., *Protein kinase C inhibitor chelerythrine disrupts memory formation in chicks*. Behav Neurosci, 1995. 109(2): p. 278-84.
602. Yu, R., et al., *Activation of p38 and c-Jun N-terminal kinase pathways and induction of apoptosis by chelerythrine do not require inhibition of protein kinase C*. J Biol Chem, 2000. 275(13): p. 9612-9.
603. Hagiwara, M., M. Inagaki, and H. Hidaka, *Specific binding of a novel compound, N-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-8) to the active site of cAMP-dependent protein kinase*. Mol Pharmacol, 1987. 31(5): p. 523-8.
604. Hidaka, H., et al., *Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C*. Biochemistry, 1984. 23(21): p. 5036-41.
605. Homsy, J. and A.I. Daud, *Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors*. Cancer Control, 2007. 14(3): p. 285-94.
606. Crescenzi, E., G. Palumbo, and H.J. Brady, *Roscovitine modulates DNA repair and senescence: implications for combination chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2005. 11(22): p. 8158-71.
607. Mgbonyebi, O.P., J. Russo, and I.H. Russo, *Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells*. Cancer Res, 1999. 59(8): p. 1903-10.
608. Mohapatra, S., et al., *Roscovitine inhibits STAT5 activity and induces apoptosis in the human leukemia virus type 1-transformed cell line MT-2*. Cancer Res, 2003. 63(23): p. 8523-30.
609. Schang, L.M., A. Rosenberg, and P.A. Schaffer, *Roscovitine, a specific inhibitor of cellular cyclin-dependent kinases, inhibits herpes simplex virus DNA synthesis in the presence of viral early proteins*. J Virol, 2000. 74(5): p. 2107-20.
610. Joiakim, A., et al., *The Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 is a ligand and antagonist of the aryl hydrocarbon receptor*. Drug Metab Dispos, 2003. 31(11): p. 1279-82.
611. Shin, M., C. Yan, and D. Boyd, *An inhibitor of c-jun aminoterminal kinase (SP600125) represses c-Jun activation, DNA-binding and PMA-inducible 92-kDa type IV collagenase expression*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1589(3): p. 311-6.

612. Vaishnav, D., et al., *SP600125, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase, activates CREB by a p38 MAPK-mediated pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 307(4): p. 855-60.
613. Wang, W., et al., *SP600125, a new JNK inhibitor, protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease*. Neurosci Res, 2004. 48(2): p. 195-202.
614. Davies, S.P., et al., *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J, 2000. 351(Pt 1): p. 95-105.
615. Klein, P.S. and D.A. Melton, *A molecular mechanism for the effect of lithium on development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(16): p. 8455-9.
616. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev, 2001. 81(2): p. 807-69.
617. Lambert, P.J., et al., *Targeting the PI3K and MAPK pathways to treat Kaposi's-sarcoma-associated herpes virus infection and pathogenesis*. Expert Opin Ther Targets, 2007. 11(5): p. 589-99.
618. Ramsden, J.J., *MARCKS: a case of molecular exaptation?* Int J Biochem Cell Biol, 2000. 32(5): p. 475-9.
619. Lee, M.R., L. Li, and T. Kitazawa, *Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase*. J Biol Chem, 1997. 272(8): p. 5063-8.
620. Heldin, C.H., A. Ostman, and L. Ronnstrand, *Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors*. Biochim Biophys Acta, 1998. 1378(1): p. F79-113.
621. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Prolif, 2003. 36(3): p. 131-49.
622. Trepiccione, F. and B.M. Christensen, *Lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus: new clinical and experimental findings*. J Nephrol. 23 Suppl 16: p. S43-8.
623. Awasthi, S., J.A. Isler, and J.C. Alwine, *Analysis of splice variants of the immediate-early 1 region of human cytomegalovirus*. J Virol, 2004. 78(15): p. 8191-200.
624. Cinatl, J., et al., *In vitro inhibition of human cytomegalovirus replication in human foreskin fibroblasts and endothelial cells by ascorbic acid 2-phosphate*. Antiviral Res, 1995. 27(4): p. 405-18.
625. Petrik, D.T., K.P. Schmitt, and M.F. Stinski, *Inhibition of cellular DNA synthesis by the human cytomegalovirus IE86 protein is necessary for efficient virus replication*. J Virol, 2006. 80(8): p. 3872-83.
626. Walker, D. and J. Hudson, *Analysis of immediate-early and early proteins of murine cytomegalovirus in permissive and nonpermissive cells*. Arch Virol, 1987. 92(1-2): p. 103-19.
627. Lindner, S.C., et al., *TLR2 ligands augment cPLA2alpha activity and lead to enhanced leukotriene release in human monocytes*. J Leukoc Biol, 2009. 86(2): p. 389-99.
628. Dolken, L., et al., *Cytomegalovirus microRNAs facilitate persistent virus infection in salivary glands*. PLoS Pathog. 6(10): p. e1001150.
629. Dykxhoorn, D.M., *MicroRNAs in viral replication and pathogenesis*. DNA Cell Biol, 2007. 26(4): p. 239-49.
630. Ghosh, Z., B. Mallick, and J. Chakrabarti, *Cellular versus viral microRNAs in host-virus interaction*. Nucleic Acids Res, 2009. 37(4): p. 1035-48.
631. Gottwein, E. and B.R. Cullen, *Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity*. Cell Host Microbe, 2008. 3(6): p. 375-87.
632. Moens, U., *Silencing viral microRNA as a novel antiviral therapy?* J Biomed Biotechnol, 2009. 2009: p. 419539.
633. Sullivan, C.S. and D. Ganem, *MicroRNAs and viral infection*. Mol Cell, 2005. 20(1): p. 3-7.

634. Lee, A.W., et al., *Human cytomegalovirus decreases constitutive transcription of MHC class II genes in mature Langerhans cells by reducing CIITA transcript levels*. Mol Immunol, 2011. 48(9-10): p. 1160-7.
635. Lepage, C., et al., *Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways in diosgenin-induced apoptosis in HT-29 and HCT-116 colon cancer cells*. Int J Oncol. 36(5): p. 1183-91.
636. Seuter, S., B.L. Sorg, and D. Steinhilber, *The coding sequence mediates induction of 5-lipoxygenase expression by Smads3/4*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. 348(4): p. 1403-10.
637. Ghosh, M., et al., *Properties of the Group IV phospholipase A2 family*. Prog Lipid Res, 2006. 45(6): p. 487-510.
638. Lin, L.L., et al., *cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase*. Cell, 1993. 72(2): p. 269-78.
639. Abramovitz, M., et al., *5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase*. Eur J Biochem, 1993. 215(1): p. 105-11.
640. Genis, P., et al., *Cytokines and arachidonic metabolites produced during human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophage-astroglia interactions: implications for the neuropathogenesis of HIV disease*. J Exp Med, 1992. 176(6): p. 1703-18.
641. Flamand, L., et al., *Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B4 to humans*. J Infect Dis, 2004. 189(11): p. 2001-9.
642. Wade, M., et al., *E2F mediates dihydrofolate reductase promoter activation and multiprotein complex formation in human cytomegalovirus infection*. Mol Cell Biol, 1992. 12(10): p. 4364-74.
643. Karlseder, J., H. Rotheneder, and E. Wintersberger, *Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F*. Mol Cell Biol, 1996. 16(4): p. 1659-67.
644. Cao, A.R., et al., *Genome-wide analysis of transcription factor E2F1 mutant proteins reveals that N- and C-terminal protein interaction domains do not participate in targeting E2F1 to the human genome*. J Biol Chem, 2011. 286(14): p. 11985-96.
645. Romano, M., et al., *5-lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor*. FASEB J, 2001. 15(13): p. 2326-36.
646. Ishov, A.M., R.M. Stenberg, and G.G. Maul, *Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment*. J Cell Biol, 1997. 138(1): p. 5-16.
647. Tavalai, N., et al., *Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections*. J Virol, 2006. 80(16): p. 8006-18.
648. Ahn, J.H., W.J. Jang, and G.S. Hayward, *The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10)*. J Virol, 1999. 73(12): p. 10458-71.
649. Hauser, A.T. and M. Jung, *Assays for histone deacetylases*. Curr Top Med Chem, 2009. 9(3): p. 227-34.
650. Gredmark-Russ, S., et al., *Active cytomegalovirus infection in aortic smooth muscle cells from patients with abdominal aortic aneurysm*. J Mol Med, 2009. 87(4): p. 347-56.
651. Blume, S.W., et al., *Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo*. J Clin Invest, 1991. 88(5): p. 1613-21.
652. http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/8/bc/proteindynamik/gif_pdb_jpg/uv_spektrum3.gif. [cited.