

Inhaltsverzeichnis

Ehrenwörtliche Versicherung	3
Danksagung	4
Veröffentlichungen	5
Inhaltsverzeichnis	6
1 Zusammenfassung	10
2 Einleitung	12
2.1 Herpesviren	12
2.2 Das humane Zytomegalovirus (HCMV)	14
2.2.1 Entdeckung und Verbreitung von HCMV	14
2.2.2 CMV-assoziierte Erkrankungen.....	15
2.2.3 Genexpression und Replikation des HCMV	18
2.2.4 Das murine Zytomegalovirus (MCMV)	19
2.3 Micro-RNAs	20
2.3.1 Die Entdeckung von miRNAs und ihrer regulatorische Funktion.....	20
2.3.2 Biogenese und Wirkungsweise von miRNAs	21
2.3.3 Methoden der Identifizierung von Ziel-Genen viraler miRNAs	23
2.4 Herpesvirale microRNAs	25
2.4.1 miRNAs bei Alphaherpesviren.....	25
2.4.2 miRNAs bei Betaherpesviren.....	26
2.4.3 miRNAs bei Gammaherpesviren.....	27
2.4.4 Identifikation von miRNA Zielgenen mittels Immunopräzipitation von RISC-Komplexen gefolgt von Microarray Analysen (RIP-Chip)	27
2.5 Vorarbeiten und Ziele der Arbeit	28
2.5.1 Die Identifizierung der MCMV miRNAs	28
3 Material und Methoden	31
3.1 Material	31
3.1.1 Laborgeräte.....	31
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	31
3.1.3 Reagenzien	32
3.1.4 Enzyme	33
3.1.5 Kommerzielle Komplettsysteme (Kits).....	33
3.1.6 Bakterienstämme.....	33

3.1.7 Zellen und Zelllinien	33
3.1.7.1 Primäre Zellen	33
3.1.7.2 Zelllinien	33
3.1.8 Antikörper	33
3.1.9 Oligonukleotide und Primer	34
3.1.10 Kulturmedien/Seren	36
3.1.10.1 Grundmedien	36
3.1.10.2 Zusätze/Seren	36
3.1.11 Antibiotika	36
3.1.12 Puffer und selbst hergestellte Medien/Nährböden	36
3.2. Methoden	38
3.2.1 Arbeiten mit Bakterien	38
3.2.1.1 Kultivierung von Bakterien	38
3.2.1.2 Anfertigen von Glycerolstocks	38
3.2.1.3 Transformation von Bakterien	38
3.2.2 DNA- und RNA-Techniken	39
3.2.2.1 Präparation von Plasmid- und BAC-DNA aus E.coli	39
3.2.2.1.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)	40
3.2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA (Midipräparation)	40
3.2.2.1.3 Analytische Isolierung von BAC-DNA (Minipräparation)	41
3.2.2.1.4 Präparative Isolierung von BAC-DNA (Midipräparation)	41
3.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA	41
3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren und deren Reinheit	42
3.2.2.4 Klonierungen und Konstrukt-Analysen	42
3.2.2.4.1 Restriktionsenzymverdau und Aufreinigung	42
3.2.2.4.2 Gelelektrophorese und DNA-Isolierung aus dem Gel	43
3.2.2.4.3 Dephosphorylierung des Vektors	43
3.2.2.4.4 Ligatton	43
3.2.2.4.5 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
3.2.2.4.6 Oligoklonierung (Annealing von synthetischen Oligonukleotiden)	45
3.2.2.4.7 Sequenzierung	45
3.2.2.5 Reverse Transkription und Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR	45
(real-time PCR, qPCR)	45
3.2.2.5.1 Real-time PCR-Quantifizierung von miRNAs im Light-Cycler™	45
3.2.2.5.2 Real-time Quantifizierung von RNA Transkripten mittels TaqMan™ PCR	47
3.2.3.1 Kultivierung von Zellen	49
3.2.3.2 Auftauen von Zellen	49
3.2.4 Arbeit mit MCMV	49
3.2.4.1 Herstellung von rekombinanten MCMV-BACs	50
3.2.4.1.1 BAC-Mutagenese	50

3.2.4.1.2	Positiv- und Negativselektion anhand der galk/Kn-Kassette.....	51
3.2.4.2	Virusrekonstituierung.....	56
3.2.4.3	Virusstockpräparation.....	57
3.2.4.4	Erstellen einer Wachstumskurve.....	59
3.2.4.5	Virusiterbestimmung mittels Plaque-Assay.....	59
3.2.5	Pull Down von RISC-Komplexen und Isolierung von RNA.....	60
3.2.6	<i>In vivo</i> Arbeiten.....	61
3.2.6.1	Vorarbeiten.....	61
3.2.6.1.1	Infektion und Organentnahme.....	61
3.2.6.1.2	Homogenisation der Mausorgane und Titration (Plaque Assay).....	62
3.2.6.2	Hauptexperimente.....	62
3.2.6.2.1	Mausaufzucht und Behandlung.....	62
3.2.6.2.2	<i>In vivo</i> Depletion von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen, sowie NK- Zellen.....	63
3.2.7	Dual Luciferase Assays.....	63
4.1	Der Genlocus m21/m22/M23 des murinen CMV.....	64
4.2	Die Herstellung der Knock-out Mutanten und deren Revertanten.....	64
4.2.1.	Revertierung der publizierten Mutanten.....	65
4.2.2	Herstellung einer zweiten („subtilen“) Mutante von miR-M23-2/m21-1 sowie deren Revertante.....	66
4.3	Charakterisierung der Mutanten.....	71
4.3.1	Das Gen m22 und die miRNAs des m21/m22/M23 Clusters sind für das Virus nicht essentiell.....	71
4.3.2	Der subtile miR-M23-2 Knock-out zeigt <i>in vitro</i> keinen Effekt.....	72
4.3.3	Beide miR-M23-2 knock-out Viren sind spezifisch in der Speicheldrüse von C57BL/6 Mäusen attenuiert.....	73
4.3.4	Das Ausmaß der Attenuierung ist abhängig von der Virusdosis.....	76
4.3.5	Das Ausmaß der Attenuierung variiert mit dem genetischen Background.....	77
4.3.6	Der Phänotyp in den Speicheldrüsen wird durch eine kombinierte Depletion von NK-Zellen und CD4 ⁺ T-Zellen revertiert.....	78
4.4	Identifikation von Zielgenen der MCMV-miRNAs mittels RIP-Chip.....	80
4.4.1	Etablierung der RISC-Immunopräzipitation.....	81
4.4.2	Virale miRNAs akkumulieren in RISC-Komplexen.....	82
4.4.3	Anreicherung von miRNAs in der RISC-IP.....	83
4.4.4	Identifizierung von zellulären und viralen miRNA Zielgenen.....	85
4.4.4.1	Microarray-Analysen der RISC-IP (RIP-Chip).....	85
4.4.4.2	Validierung zellulärer MCMV miRNA Zielgene durch TaqMan PCR.....	87
4.4.5	GO-Analysen (Gen-Ontologie) der identifizierten Zielgene.....	89
4.4.6	Virale miRNAs sind während der lytischen Infektion funktional.....	90

5	<i>Diskussion</i>	94
5.1	Kinetik miRNA bedingter Regulationsmechanismen.....	94
5.2	Das Ausmaß der Attenuierung zeigt Abhängigkeit von Mausstamm und Dosierung.....	95
5.3	Kombinierte Depletion von NK- Zellen und CD4 ⁺ T-Zellen revertiert den Phänotyp aber beeinflusst die infizierten Zelltypen in den Speicheldrüsen.....	97
5.4	Identifizierung von miRNA Zielgenen mittels RIP-Chip.....	98
5.4.1	Kooperation von viralen Proteinen und miRNAs bei der Regulation von aktivierenden NK-Zell Liganden.....	99
5.4.2	Identifikation von viralen miRNAs in KSHV/EBV mittels RIP-Chip.....	100
5.4.3	Ausblick.....	101
6	<i>Anhang</i>	102
6.1	Abkürzungen.....	102
6.2	Lebenslauf.....	104
7	<i>Referenzen</i>	106